

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA

**MEIO DE CULTURA MISTO DE MACRÓFITAS
NO CULTIVO DE *Messastrum gracile***

Lívia Clara Colla

Jaboticabal, São Paulo

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**MEIO DE CULTURA MISTO DE MACRÓFITAS NO
CULTIVO DE *Messastrum gracile***

Livia Clara Colla

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena Sipaúba-Tavares

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

Jaboticabal, São Paulo
2024

C697m Colla, Livia Clara
Meio de cultura misto de macrófitas no cultivo de *Messastrum gracile* / Livia Clara Colla. -- Jaboticabal, 2024
48 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal
Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba Tavares

1. Extrato de macrófita misto. 2. Biomassa. 3. *Messastrum gracile*.
4. Microalga. 5. Macrófita. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal.

Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MEIO DE CULTURA MISTO DE MACRÓFITAS NO CULTIVO DE
Messastrum gracile

AUTORA: LÍVIA CLARA COLLA


ORIENTADORA: LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES (Participação Presencial)
Laboratório de Limnologia / Centro de Aquicultura da Unesp, CAUNESP, Jaboticabal-SP


Prof. Dr. CLAUDENIR ACINCANI FRANCO (Participação Virtual)
/ Fatec, Jaboticabal-SP

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

Documento assinado digitalmente
 RODRIGO NEY MILLAN
Data: 21/02/2024 07:56:28-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua bondade em me encaminhar até aqui e por ter mostrado que os caminhos que segui eram exatamente o que eu precisava para cada ensinamento e crescimento pessoal, e que de todas as vezes que duvidei, ele me mostrou que a confiança no processo é essencial.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Sipaúba Tavares a qual sou eternamente grata pelas suas lições valiosas, tanto dentro como fora do laboratório. Gostaria de expressar minha profunda gratidão por todo o apoio e orientação que a senhora me proporcionou ao longo do meu mestrado. Foram ações fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal durante este período.

Agradeço aqueles que passaram pelo laboratório durante esta trajetória e contribuíram com o meu trabalho. Aos meus fiéis escudeiros, Tutu e Iago, por toda ajuda durante os experimentos, conversa jogada fora e risadas, à Mayara que sempre ofereceu apoio e palavras que eram necessárias, além das risadas que eram a melhor parte, e as colegas de pesquisa que se tornaram amigas, Débora e Juliane. Obrigada Ju, por toda sua ajuda, conversas sobre a vida e por toda sua amizade, você emana luz e é genuinamente boa, pessoas como você são raridade. Obrigada Débora, você foi companheira de experimento, pegar carrapato e atolar o carro, tão parecida comigo que até irrita, mais ainda quando tínhamos nossos momentos “tico e teco”. Agradeço também os “vizinhos” de laboratório, Mag e Thalys, vou sentir falta das horas de análises que ficamos cansados, mas que mesmo assim saíamos rindo. Obrigada a todos por tudo.

Agradeço a minha família, que foi rede de apoio em muitos momentos difíceis, minha mãe que se mostrou orgulhosa sempre, minha tia que sempre me apoiou, a minha irmã que acompanhou de perto toda minha trajetória e foi meu porto seguro em muitas horas, e ao meu namorado Olavo, que mesmo antes de se tornar namorado, já fazia parte de tudo, e hoje é minha fonte de inspiração e incentivo.

Agradeço ao Caunesp, que em muitos momentos foi um lugar para refletir e ser grata.

Agradeço a cada um que de alguma forma contribuiu para que este trabalho fosse realizado, e que foi de suma importância para chegar até este momento.

APOIO FINANCEIRO

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

Sumário

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância da macrófita	3
2.2 Microalga estudada	5
2.3 Aspectos gerais do cultivo da microalga	7
2.4 Escolha das macrófitas como meio de cultura	11
2.5 Procedimento da coleta da alga e preparação de cultivo da <i>Messastrum gracile</i>	15
3. OBJETIVOS	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
5. ARTIGO	28
5.1 Resumo	29
5.2 Summary	30
5.3 Introdução	31
6. Material e métodos	32
6.1 Planejamento experimental	32
6.2 Meios de cultura	34
6.3 Crescimento da microalga, parâmetros dos meios de cultura e composição bioquímica	34
6.4 Análise estatística dos dados	35
6.5 Composição de meios de cultura de macrófitas	36
7. Resultados	36
7.1 Condições de cultivo, meios de cultura e crescimento da microalga	36
7.2 Proteína e lipídio	39
7.3 Nutrientes dos meios de cultura misto de macrófitas	41
8. Discussão	42
9. Conclusão	45
10. Referências	45

RESUMO

As diversas formas de aplicação e desenvolvimento das microalgas destacam-se e chamam atenção para atuação de pesquisas e inserção na área comercial e industrial. A biomassa extraída a partir desses microrganismos é fonte de matéria prima para diversos produtos, como suplemento na alimentação humana, insumos farmacêuticos, fonte de alimentação animal, produtos cosméticos, produção de bioenergia, biocombustíveis, além de sua utilização na agricultura e entre muitos outros produtos. O meio de cultura desempenha papel fundamental na multiplicação e desenvolvimento adequado das microalgas. Com o custo elevado do meio de cultura, nos últimos anos ocorreu um crescimento do uso alternativo de elementos que permitam o desenvolvimento das microalgas, e, nesse contexto, destaca-se as macrófitas aquáticas cuja biomassa é rica em nutrientes essenciais. Melhorar a aplicação de plantas aquáticas como meio de cultura pode reduzir significativamente os custos de produção, abrindo caminho para novas biotecnologias. As macrófitas na manutenção e equilíbrio do ambiente aquático, contribuem nas transformações físicas, químicas e processos biológicos. O meio de cultura de macrófitas para as microalgas Chlorophyceae contendo biomassa de plantas aquáticas e NPK, pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nutrientes essenciais para a microalga. Nesse estudo, foi avaliado o crescimento da microalga *Messastrum gracile* em quatro meios de cultura mistos compostos por diferentes combinações de macrófitas aquáticas. O principal objetivo foi identificar qual desses meios proporciona melhor rendimento no crescimento da microalga. Os resultados demonstraram que os meios de cultura mistos contendo *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes* e *Eichhornia azurea* (L+C+A) e o meio de *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor* (C+L), destacaram-se como os mais eficientes. Apresentaram benefícios notáveis, como um rápido crescimento da biomassa e teores significativamente mais elevados de proteína e lipídios. Além disso, os meios L+C+A e C+L demonstraram maior capacidade de absorção de nitrogênio e fósforo, dois elementos essenciais na produção de mais de 40% de proteínas e entre 5 e 9% de lipídios. Esses resultados enfatizam a importância de desenvolver protocolos inovadores para meios de cultura alternativos no cultivo de microalgas, visando alcançar maior biomassa e a produção de subprodutos de interesse industrial.

Palavras-chave: *Messastrum gracile*; *Eichhornia crassipes*, *E. azurea* e *Lemna minor*; biomassa; Extrato de macrófita misto; crescimento.

ABSTRACT

Macrophyte mixed culture medium in the cultivation of *Messastrum gracile*

The various applications and development of microalgae stand out and draw attention to research and integration into the commercial and industrial sectors. The biomass extracted from these microorganisms serves as a raw material for various products, such as supplements in human nutrition, pharmaceutical inputs, animal feed, cosmetic products, bioenergy production, biofuels, and their use in agriculture, among many other applications. The culture medium plays a crucial role in the proper multiplication and development of microalgae. Given the high cost of the culture medium, there has been a growth in the alternative use of elements that enable the development of microalgae. In this context, aquatic macrophytes, whose biomass is rich in essential nutrients, stand out. Improving the application of aquatic plants as a culture medium can significantly reduce production costs, paving the way for new biotechnologies. Aquatic macrophytes contribute to the maintenance and balance of the aquatic environment, participating in physical, chemical, and biological processes. The culture medium of macrophytes for Chlorophyceae microalgae containing biomass of aquatic plants and NPK can serve as an important alternative source due to its high concentrations of essential nutrients for microalgae. In this study, the growth of the microalga *Messastrum gracile* was evaluated in four mixed culture media composed of different combinations of aquatic macrophytes. The main objective was to identify which of these media provided the best yield in microalga growth. The results showed that the mixed culture media containing *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes*, and *Eichhornia azurea* (L+C+A) and the medium of *Eichhornia crassipes* and *Lemna minor* (C+L) stood out as the most efficient. They demonstrated notable benefits, such as rapid biomass growth and significantly higher levels of protein and lipids. Additionally, the L+C+A and C+L media showed a higher capacity to absorb nitrogen and phosphorus, two essential elements in the production of over 40% of proteins and between 5 and 9% of lipids. These results emphasize the importance of developing innovative protocols for alternative culture media in microalgae cultivation, aiming to achieve higher biomass and the production of industrially relevant by-products.

Keywords: *Messastrum gracile*; *Eichhornia crassipes*, *E. azurea* and *Lemna minor*; biomass; mixed macrophyte extract; growth

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microalga <i>Messastrum gracile</i> em lente de aumento de 50X; Mensuração do tamanho e diâmetro da microalga.....	06
Figura 2 - Metabolismo algal.....	09
Figura 3 - Macrófita <i>Eichhornia crassipes</i>	12
Figura 4 - <i>Eichhornia azurea</i>	13
Figura 5 - <i>Lemna minor</i>	14
Figura 6 -Diferentes etapas no procedimento do cultivo utilizado em laboratório para o crescimento de <i>M. gracile</i> em meios mistos de macrófita : (A) Microalgas em tubos de ensaio proveniente de cepário específico; (B) Preparação dos meios de cultura em 2 L; (C) Esterilização do meio de cultura em autoclave em 2 L; (D) Erlenmeyers com microalga e meio de cultura em câmara de assepsia; (E) Cultivo de <i>M. gracile</i> em volume em meio misto de macrófita.....	16
Figura 7 - Procedimentos para obtenção da biomassa algal.....	17
Figura 8 - Confeção do meio de cultura de macrófita.....	17
Figura 9 - Diagrama esquemático do preparo da microalga <i>Messastrum gracile</i> em volume de 2L, para o cultivo em meio misto de macrófita onde: (A) Manutenção da cepa 10 mL em meio CHU12; (B) Cultivo inicial em 2L somente em meio NPK (20:5:20); (C) Cultivo em meio NPK em volume de 2 L; (D) Frascos experimentais nas diferentes associações de macrófitas como meio de cultura, onde: L+C+A = <i>Lemna minor</i> + <i>Eichhornia crassipes</i> + <i>E. azurea</i> ; A+C= <i>Eichhornia azurea</i> + <i>E. crassipes</i> ; C+L = <i>Eichhornia crassipes</i> + <i>Lemna minor</i> ; A+L = <i>E. azurea</i> + <i>Lemna minor</i>	33
Figura 10 - Curva de crescimento da microalga <i>Messastrum gracile</i> em meio de cultura misto de macrófita onde: L+C+A = <i>L. minor</i> + <i>E. crassipes</i> + <i>E. azurea</i> ; A+C= <i>E. azurea</i> + <i>E. crassipes</i> ; C+L = <i>E. crassipes</i> + <i>L. minor</i> ; A+L = <i>E. azurea</i> + <i>L. minor</i>	37
Figura 11 - Conteúdo de fósforo total (TP) e nitrogênio inorgânico total (TIN) (mgL^{-1}) do meio de cultura no cultivo da microalga <i>Messastrum gracile</i> nos dias de coleta.....	40
Figura 12 - Conteúdo de proteína e lipídio (% de biomassa seca) da microalga <i>Messastrum gracile</i> , nos dias de coleta.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de nutrientes (mg l^{-1}) em diferentes meios de cultura: LM = <i>Lemna minor</i> ; EC = <i>Eichhornia crassipes</i> ; EA = <i>Eichhornia azurea</i>	15
Tabela 2 - Médias e desvio padrão das variáveis biológicas da microalga <i>Messastrum gracile</i> . Médias em cada linha seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$), ANOVA (teste) entre os meios de cultura e os dias de crescimento.....	38
Tabela 3 - Médias e desvio padrão das variáveis abióticas do meio de cultura. Médias em cada linha seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$), ANOVA (teste) entre os meios de cultura e os dias de crescimento.....	39
Tabela 4 - Composição dos nutrientes (g L^{-1}) nos meios de cultura mistos de macrófitas....	42

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos tanto de ambientes aquáticos, quanto de ambiente terrestre úmidos, são fontes versáteis de diversos bioprodutos, e representam uma alternativa de âmbito mundial para utilização como matéria-prima. Elas são capazes de produzir biomassa, lipídios e proteínas, que por sua vez podem ser usados na geração de energia, alimentos funcionais, fármacos, cosméticos, tintas, biocombustíveis e muito mais (CHEN et al., 2018; FERNÁNDEZ et al., 2021).

As microalgas verdes fazem parte da classe das Chlorophyceae, com presença de clorofila-a e clorofila-b que são responsáveis pela fotossíntese desses microrganismos. A microalga *Messastrum gracile* faz parte desse grupo de microalgas, com rica composição em produtos de interesse industrial, como proteínas, lipídios, pigmentos e polissacarídeos, além de ser comumente utilizada como modelo de divisão celular e crescimento algal (KOBAYASHI; ITO, 1977; KILHAM et al., 1997; DO NASCIMENTO et al., 2013).

O fornecimento dos nutrientes essenciais para a microalga são a base para alcançar uma produção elevada de biomassa, sendo eles compostos nitrogenados, fósforo, carbono e enxofre, além de metais como ferro, cobalto, níquel, molibdênio e selênio (CARVALHO et al., 2006). Em alguns casos, a adição de componentes adicionais, como vitaminas do tipo B₁₂, B₁, biotina, vitamina C e E, são necessárias para auxiliar na divisão celular das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Esses nutrientes são ofertados através do meio de cultura, que é um dos principais fatores que influenciam o crescimento das microalgas. O meio de cultura é composto por substâncias químicas que fornecem os nutrientes essenciais para o cultivo, podendo estimular ou inibir o crescimento das microalgas, afetando assim a composição química das células e a produção de outros compostos, incorporando os nutrientes à sua biomassa (IMAMOGLU et al., 2007; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

A produção de microalgas envolve altos custos, sendo o meio de cultura comercial uma das principais despesas (BAUMGÄRTNER, 2011). A busca por meios de cultura alternativos surge como uma maneira de reduzir os custos de produção e fornecer os nutrientes necessários para o crescimento das microalgas. Exemplos incluem o uso de fertilizantes agrícolas, como o NPK, e meios compostos por extrato de macrófitas, que têm sido desenvolvidos para cultivos de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009; 2015; 2018).

A utilização de macrófitas aquáticas como base para a confecção de meio de cultura para o cultivo de microalgas se destaca devido à sua riqueza natural em nutrientes essenciais,

como nitrogênio, fósforo e potássio, fundamentais para o crescimento das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2014). Esse enriquecimento nutricional oferece uma alternativa econômica em comparação com meios de cultura comerciais, resultando em concentrações mais elevadas de proteínas, carotenoides e clorofilas nas microalgas, tornando-as valiosas para a alimentação e biotecnologia (LOURENÇO, 2006; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

O uso de macrófitas para fabricação de meios de cultura é uma abordagem ecológica, uma vez que aproveita plantas aquáticas abundantemente disponíveis, muitas vezes consideradas resíduos ou até mesmo pragas em sistemas de aquicultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011, 2015, 2017). Dessa forma, o uso para produção de meios de cultura promove a reciclagem de resíduos orgânicos naturais e contribui para a gestão eficiente de nutrientes em ecossistemas aquáticos, reduzindo assim o problema crítico da eutrofização (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2014).

Na natureza, as macrófitas assimilam nutrientes para o seu crescimento, enquanto suas raízes quando são flutuantes, servem como abrigo e fonte de alimento para microrganismos, e quando são fixas essa função passa a ser da sua biomassa aparente na água. Elas liberam carboidratos, açúcares, aminoácidos, enzimas e outros compostos, e ainda contribuem para a melhoria da qualidade da água em ecossistemas aquáticos, atuando como filtros naturais que removem nutrientes em excesso e reduzem a poluição da água (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011, 2015). As macrófitas também podem absorver metais pesados e óleos, melhorando substancialmente a qualidade da água (POMPÊO, 2008; SOOD et al., 2012; KASTRATOVIC et al., 2018).

Estudos recentes (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2017; 2019; 2022) demonstraram que o cultivo de microalgas em meios compostos por extrato de macrófitas apresentam vantagens significativas em relação aos meios tradicionais, mostrando resultados notáveis em termos de qualidade e eficiência do cultivo, destacando-se como uma alternativa promissora, embora as tecnologias para produção de microalgas estejam em constante evolução. Nestes estudos, os resultados com os meios alternativos com macrófitas e NPK em relação a crescimento e biomassa foram similares aos meios de cultura comerciais como CHU₁₂ e WC.

O Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton desenvolveu um protocolo para o uso de macrófitas como meio de cultura, e por meio de vários estudos envolvendo microalgas da classe Chlorophyceae, identificou três plantas aquáticas que se destacaram: *Eichhornia crassipes* (C), *Eichhornia azurea* (A) e *Lemna minor* (L), comprovando que essa

biotecnologia pode ser aplicada no cultivo da microalga *Messastrum gracile*. Até o presente momento, as pesquisas envolvendo a produção de meios de cultura alternativos com base em macrófitas consistia no uso de apenas uma espécie de planta aquática. Este trabalho visa utilizar uma mistura de extratos de macrófitas, formando um meio misto, que pode contribuir com a manipulação dos nutrientes presentes em cada planta e auxiliar no desenvolvimento da microalga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da macrófita

As macrófitas são plantas aquáticas que podem ser vistas a olho nu, com partes fotossinteticamente ativas permanentemente ou presentes por alguns meses, sendo elas submersas ou flutuantes, presentes em todo tipo de água, mesmo com baixo nutrientes e biomassa (COOK, 1974; WETZEL 1993). Essas plantas apresentam papel fundamental no metabolismo dos ecossistemas aquáticos, assimilando nutrientes tanto presentes no sedimento quanto na água, retirando o excesso que causariam desequilíbrio do ambiente aquático (ESTEVES, 1998). As plantas aquáticas como produtoras primárias absorvem nutriente do meio para incorporação à sua biomassa, além disso, as macrófitas aquáticas configuram habitat para perifiton, zooplâncton, peixes e rãs, além de servirem como fonte de alimento para diversas espécies (PETR, 2000; BORNETTE; PUIJALON, 2009).

Desempenhando papel importante na produção de biomassa, as plantas aquáticas atuam de forma direta nos ciclos biogeoquímicos, auxiliando na produção de carbono orgânico, associação do fósforo e influenciando na hidrologia e na dinâmica dos sedimentos através de seus efeitos sobre o fluxo de água dos ecossistemas de água doce (DEMARTY; PRAIR, 2009; ESTEVES; SUZUKI, 2010), desenvolvendo-se de forma rápida na região tropical por conta do clima propício (ESTEVES; CAMARGO, 1986). Quando ocorre variações nos fatores ambientais e climáticos, podem afetar a distribuição e abundância de plantas aquáticas, revelando desequilíbrios ambientais, interações biológicas e fatores relacionados as características da água e do substrato, podendo ser avaliados por meio de propriedades físicas e químicas (LACOU; FREEDMAN, 2006).

Sua função ecológica está ligada a melhoria da qualidade de água, promovendo vantagens como a prevenção do aumento do pH, redução da temperatura da água e da volatilização da amônia, além do controle da proliferação de outras plantas (BHUVANESHWARI; SINGH, 2015). Apresenta benefícios para organismos próximos,

servindo como fontes de oxigênio, alimento e proteção para vidas aquáticas ou que vivem ao entorno da água, como pássaros, insetos e outros animais (MARCONDES et al., 2002). As macrófitas na manutenção e equilíbrio do ambiente aquático, contribuem nas transformações físicas, químicas e processos biológicos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2003; RODELLA et al., 2006).

Pedalli e Teixeira (2003) ressaltam a importância da função das macrófitas como bioindicadoras de qualidade de água, com característica de acumuladoras de poluentes, rápida adaptabilidade ao ambiente e taxonomia conhecida são fatores para facilitar o biomonitoramento através dessas plantas. A característica acumulativa de metais pesados, por essas plantas aquáticas, as torna excelente elemento em realizar tratamentos de efluentes domésticos e industriais (POTT; POTT, 2000). Trabalhos realizados com macrófitas para tratamento de água de piscicultura por meio de “wetlands” apresentaram a melhora da qualidade da água filtrando materiais particulados, sedimentos, nutrientes e metais pesados, além da redução da DBO (Demanda bioquímica de oxigênio) (SIPAÚBA-TAVARES, 2001; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2002).

Essa função despoluidora chama atenção de empresas que realizam tratamento de água, exemplos como a descontaminação por metais pesados e por descarte de agrotóxicos ou produtos químicos, reduzem a qualidade da água segundo Tundisi (2013), e com o auxílio das macrófitas, isso pode ser contornado, quando realizado o manejo para evitar o crescimento desenfreado das plantas, que pode causar outros problemas na água.

Na aquicultura, as plantas aquáticas podem reduzir impactos nos ecossistemas, utilizando-as no tratamento de efluentes. Os estudos com macrófitas em tratamento de viveiros de piscicultura mostram a viabilidade no criadouro de camarões e alevinos de peixes como forma de melhorar a qualidade de água (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2002; HENRY-SILVA; CAMARGO, 2008; SIPAÚBA-TAVARES; BRAGA, 2008). Além disso, as macrófitas podem ser aproveitadas como fertilizantes da água e fonte de alimento dentro da produção de peixes, proporcionando maiores taxas de crescimentos para alevinos de tilápia do Nilo (SANTIAGO et al., 1988; SIPAÚBA-TAVARES; BRAGA, 2007). Em peixes como o *Pterophyllum escalare*, a biomassa de *Eichhornia crassipes* como suplemento alimentar proporcionou uma taxa de sobrevivência de 100% dos indivíduos alimentados, fato que não ocorre sem a suplementação com macrófita, beneficiando a produção (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2019).

A disponibilidade de iluminação e nutrientes são fatores essenciais para crescimento e desenvolvimento das macrófitas, porém cada espécie apresenta suas necessidades

nutricionais necessárias (BORNETTE; PUJALON, 2011; AERTS; CHAPIN, 2000). A composição e estrutura das comunidades de macrófitas estão ligadas aos nutrientes, mas, avaliação da influência desses nutrientes na planta muitas vezes, é difícil de verificar por conta da variação temporal e espacial destes elementos e a ampla ecologia de algumas espécies. Fatores como a turbidez da água e profundidade também são prejudiciais a absorção de nutrientes pela macrófita (ZHONG et al., 2017; SØNDERGAARD et al., 2022).

A rápida proliferação das macrófitas preocupa incentivando a procura de alternativas e utilização dessas plantas para outras finalidades. Como forma de aproveitamento da biomassa produzida pelas macrófitas, alternativas como produção de biogás, alimentação de animais e fertilizante de solos podem ser aplicadas (PIETERSE; MURPHY, 1990; EL – SAYED, 1999), além de serem estudadas para uso de cosméticos e produtos farmacêuticos como antioxidante, produção de biocombustíveis, e biofertilização e diversos outros produtos que podem aproveitar sua rica composição nutricional (BHUVANESHWARI; SINGH, 2015; GUSAIN; SUTHAR, 2017).

2.2 Microalga estudada

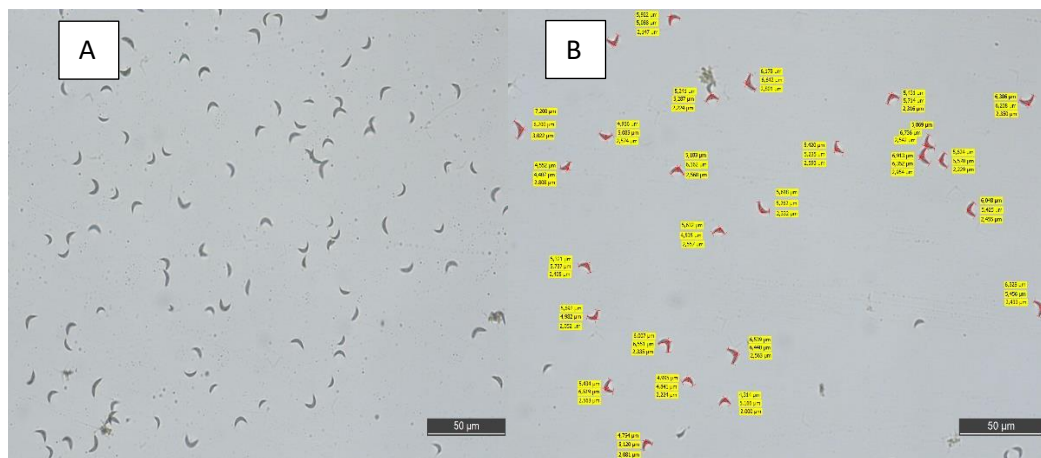
As algas verdes fazem parte do filo Chlorophyta, abrigando espécies que estão presentes na terra a milhões de anos, com tamanhos de macro e microrganismos. A classificação de cada alga depende das suas características, e por conta de cada espécie apresentar diferenças entre elas, esse filo possui a maior diversidade de espécies, com cerca de 17 mil tipos, diferenciando-se em estrutura, ciclo de vida e habitats. A principal característica desse grupo é apresentar o cloroplasto com dupla membrana, tilacoides empilhados, reserva de amido e clorofila a e b, além da presença de alguns pigmentos como: carotenoides α , β e γ e diversas xantofilas. podendo ser encontradas tanto em ambientes variados com dulcícolas, salobros e marinhos, além de outros habitats tais como neve, troncos de árvores, folhas, plantas terrestres, dentre outros diversos locais (LOURENÇO, 2006)

A microalga *Messastrum gracile* (Figura 1), que é encontrada em água doce, faz parte da classe das Chlorophyceae, que podem ser algas unicelulares, de vida colonial e filamentosas. São presentes em ambientes eutrofizados, crescendo abundantemente e podendo originar “blooms” ou florescimento, às vezes aderindo-se a pequenos grupos, como fungos (liquens) (BOLD; WYNNE, 1985). São muito utilizadas para cultivo em massa para serem destinadas a alimentação de organismos aquáticos, com sua rica composição em fibras, minerais, proteínas, ácidos graxos, antioxidantes, entre outros, trazendo benefícios na

produção de zooplâncton, peixes, camarões e outros (PANIANGUA, 2003; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

A *M. gracile* tem células em forma semilunadas, estreitas e pontiagudas, sua reprodução é assexuada, não produz zoósporos e são células raramente solitárias (BOLD; WYNNE, 1985). Considerada como um organismo modelo para estudar o crescimento e a divisão

Figura 1: A – Microalga *Messastrum gracile* em aumento de 50X; B – Mensuração do tamanho e diâmetro da microalga.



Ao longo dos anos a *Messastrum gracile* sofreu alterações na sua classificação, a partir dos estudos realizados com o gene 18S rDNA (SILVA, 2007) houve o aparecimento de dois novos gêneros, a *Messastrum* gen. nov. e *Curvastrum* gen. nov. (FAWLEY et al. 2006; KRIENITZ et al., 2001, 2011; GARCIA, 2017). Anteriormente a este estudo, essa microalga era denominada *Ankistrodesmus gracilis*, atualmente sua classificação é a seguinte (GUIRY; GUIRY, 2021):

Domínio: Eukaryota

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Filo: Chlorophyta

Subfilo: Chlorophytina

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Sphaeropleales

Família: Selenastraceae

Gênero: *Messastrum*

Espécie: *Messastrum gracile*

2.3 Aspectos gerais do cultivo da microalga

As diversas formas de aplicação e desenvolvimento das microalgas destacam-se e chamam atenção para atuação de pesquisas e inserção na área comercial e industrial. A biomassa extraída a partir desses microrganismos é fonte de matéria prima para diversos produtos, como suplemento na alimentação humana, insumos farmacêuticos, fonte de alimentação animal, produtos cosméticos, produção de bioenergia, biocombustíveis, além de sua utilização na agricultura e entre muitos outros produtos (BARNABÉ, 1989; SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA., 1993; DENER et al., 2006; CHISTI, 2007). Além disso, as microalgas são capazes de fixar grandes quantidades de CO₂ atmosférico, tornando-se uma alternativa sustentável para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa (ZHANG et al., 2020).

Segundo Zhang et al. (2020), o cultivo de microalgas pode ser realizado em diversos sistemas, desde a cultura em pequena escala em laboratório até sistemas de produção em grande escala, como fotobiorreatores e lagoas de cultivo. Esses sistemas apresentam vantagens e desvantagens em relação ao custo, produtividade, facilidade de operação,

controle de qualidade da biomassa, entre outros fatores, e a escolha do sistema mais adequado deve ser baseada nas características da espécie cultivada e no objetivo da produção.

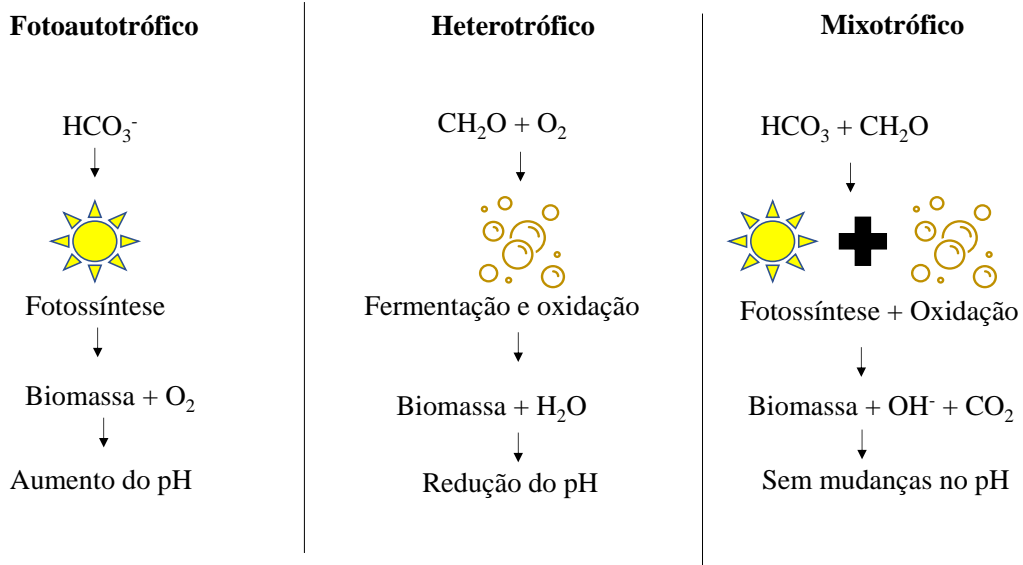
De acordo com Kumari e Kumar (2021), o sucesso do cultivo de microalgas depende de vários fatores, como a escolha da espécie mais adequada para o objetivo da produção, o controle de temperatura, pH e nutrientes na cultura, a seleção de métodos eficientes de colheita e extração de biomassa, entre outros. A produção de nutrientes e metabolitos varia ao longo das fases de crescimento da microalga, produzindo os nutrientes necessários para seu metabolismo. A composição bioquímica diversificada das células de microalgas influencia nos teores de produção de carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos, entre outros (MIAO et al., 2004).

Embora o cultivo de microalgas apresente grandes promessas em várias áreas, ainda há desafios a serem superados para a sua viabilização em larga escala, como o aumento da produtividade e eficiência do processo, a redução de custos de produção e o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes de colheita e processamento da biomassa (SINGH et al., 2021).

De acordo com o estudo de Borowitzka e Moheimani (2013), as condições ideais para o cultivo de microalgas incluem temperatura entre 20 e 30°C, intensidade de luz na faixa de 50-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, que pode ser fornecida por lâmpadas de LED ou tubos fluorescentes, e pH entre 6,5 e 8,5. Além disso, é importante manter a agitação do meio de cultivo para garantir a distribuição homogênea de nutrientes e luz.

As microalgas são organismos fotossintéticos, podendo adaptar-se ao ambiente de água doce ou água salgada (VELASQUES-ORTA et al., 2013). A luz é o fator mais limitante para a microalga, atuando diretamente em seu crescimento e desenvolvimento (DRAGONE et al., 2010). O cultivo da microalga é realizado em condições fototróficas, heterotróficas e mixotróficas, a escolha para o tipo de cultivo depende da espécie da alga ou produtos gerados como lipídio e proteína. A Figura 2 abaixo mostra o metabolismo de cada tipo de condição de cultivo.

O cultivo mais comumente utilizado é o fototrófico, sendo utilizado em laboratório ou em produções de larga escala. Tem obrigatoriedade de apresentar fontes de luz, sendo ela natural ou artificial, realizando a transformação da energia luminosa em energia química (LAWOR, 2002). A fonte de carbono é provida do CO_2 presente no ambiente como fonte de carbono inorgânico realizando a síntese das células (WEN; CHEN, 2003). Nesse tipo de

Figura 2: Metabolismo algal.

Fonte: Adaptada de Chojnacka e Marquez-Rocha (2004).

cultivo é dispensável a utilização de fontes de carbono alternativas, apresentando baixo risco de contaminação por não ser adicionado fontes de nutrição externas (AMARO et al., 2011; ELUMALAI et al., 2011).

O cultivo heterotrófico utiliza fontes de energia orgânicas como fonte de carbono e substratos orgânicos para suprir a absorção de elementos vitais para realizar a produção celular, e, a fonte de luz é dispensável neste cultivo (CHEN et al., 2006; ZHANG et al., 1999). A fonte de carbono disponível no meio é um fator limitante para o crescimento algal, resultando em baixa produção quando o elemento se torna escasso no cultivo (ABALDE et al., 1995). As vantagens deste cultivo são sua fácil operacionalidade e baixo custo de produção, uma vez que não utiliza energia para a iluminação. No entanto, nem todas as espécies de microalgas se adaptam à falta de luz, por conta disso, não é um tipo de cultivo universal para microalgas (HUANG et al., 2010).

No cultivo mixotrófico, ocorre a ação simultânea de duas rotas de captação de energia para os microrganismos cultivados, sendo elas a rota metabólica da fotossíntese, atuando por meio da oferta de iluminação, e a rota heterotrófica, realizando a oxidação dos compostos orgânicos presentes no meio para respiração (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Alguns estudos mostraram que o crescimento das microalgas foi maior em cultivo mixotrófico do que heterotrófico (BONINI; BASTOS, 2012), e a biomassa produzida neste cultivo também apresenta produtividade superior ao cultivo fotoautotrófico, sendo de 5,4

vezes maior (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; YANG et al., 2014; LI et al., 2014).

A abordagem tradicional para identificar os fatores requeridos para uma elevada biomassa de microalga inicia com a utilização de um meio de cultura definido, no qual a adição de outros elementos contribuirá para o aumento do valor nutricional e conseqüentemente, o crescimento da microalga. A escolha do meio de cultura depende de vários fatores, como a presença de elementos necessários ao crescimento da microalga e, se estes elementos podem afetar a qualidade do produto final e, o custo-benefício do meio utilizado (DALAY et al., 2007). O procedimento mais comum para o cultivo de microalgas é o crescimento fotoautotrófico, possuindo maior eficácia na conversão de energia solar, podendo ser cultivadas em ambientes iluminados naturalmente ou artificialmente (PEREZ-GARCIA, 2011).

Outro fator importante é a composição do meio de cultura. O meio de cultura deve conter nutrientes essenciais para o crescimento das algas, como nitrogênio, fósforo, potássio e oligoelementos. Podem ser utilizados meios comerciais ou preparar um meio próprio, dependendo das necessidades específicas da espécie de microalga utilizada. As principais considerações para o desenvolvimento de um meio de cultura são: a concentração total de sal, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentração de outros elementos como: potássio, fósforo, magnésio, sódio, sulfato, microelementos e a adição de componentes orgânicos e de substâncias que promovam o crescimento (LOURENÇO, 2006).

O meio de cultura é uma preparação química que possui nutrientes necessários para que os microrganismos se multipliquem e se desenvolvam de forma adequada, permitindo seu estudo, identificação e análise. Quando se trata de meio de cultura para microalgas, o mais utilizado e que apresenta resultados satisfatórios é o meio líquido, já o meio de cultura em estado sólido é utilizado para crescimento e desenvolvimento de microrganismos como fungos e bactérias (BAUMGARTNER, 2011).

Os nutrientes minerais inorgânicos fornecidos pelo meio de cultura são de suma importância para os organismos fotossintetizantes, tendo uma quantidade mínima e máxima para cada organismo, além da necessidade nutricional exigida pela microalga, diferindo para cada espécie (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Para uma elevada biomassa, é necessário ter os nutrientes essenciais, como: nitrogênio, fósforo, carbono e enxofre, além dos metais como ferro, cobalto, níquel, molibdênio e selênio (CARVALHO et al., 2006).

O carbono é um dos elementos essenciais para desenvolvimento e crescimento da microalga, o nitrogênio, auxilia na síntese proteica, elevando a taxa de proteína encontrada

na biomassa e no aumento da ação fotossintética ligado a um maior número de células clorofiladas presentes no meio (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984). A falta de nitrogênio no meio de cultura para as microalgas pode ocasionar a limitação do crescimento (TUNDISI et al., 1977) e desvio do fluxo de carbono para a produção das proteínas para a produção de carboidratos e lipídios (FORNJÁN et al., 2007).

O fósforo é encontrado no organismo de produtores primários como elemento essencial para processos celulares, transferência de energia e biossíntese de ácidos nucleicos como o DNA, sendo que a sua forma mais absorvida pelas microalgas é o ortofosfato (GROBBELLAR, 2004). Quando o fósforo é ausente no meio de cultivo, torna-se um fator limitante para crescimento, afetando diretamente na produção de carboidratos e lipídios (BOROWITZKA, 1988).

Micronutrientes, ou elementos secundários, são importantes para o crescimento das microalgas, como os sulfatos, que é ligado ao transporte de elétrons por meio da sua característica condutível, dando origem a cisteína e metionina, além de outros micronutrientes que são necessários, porém em menores quantidades, como ferro, boro, cobre, cobalto, zinco, vanádio, molibdênio e sódio (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

2.4 Escolha das macrófitas para produção de meio de cultura

Uma das formas de utilizar resíduos orgânicos provenientes da aquicultura é o meio de cultura a base de macrófita, com alto potencial fertilizante, tendo em sua composição altas quantidades de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco, e outros elementos que são de suma importância para o crescimento algal (SAHU, 2002; SIPAÚBA-TAVARES; BRAGA, 2007). O meio de cultura de macrófitas para as microalgas Chlorophyceae contendo biomassa de plantas aquáticas e NPK, pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nitrogênio, fósforo e potássio, essenciais ao desenvolvimento e crescimento da microalga apresentando baixo custo e contribuindo para a reciclagem de resíduos de produtos biológicos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2014).

Plantas como a *Eichhornia crassipes* (Figura 3), da família Pontederiaceae, conhecida como aguapé, apresenta em sua biomassa macro e micronutrientes, elevados valores de cálcio, magnésio, manganês, zinco, ferro e cobre quando comparada a outras plantas aquáticas (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2006). A *E. crassipes* é eficiente na remoção das impurezas que proporcionam alterações da condutividade elétrica, temperatura e turbidez da

água, sendo aplicada para tratamento de águas residuais e pode ser reutilizada na produção agrícola sem prejudicar o solo (FRANÇA et al., 2014).

Estudos com *E. crassipes* afirmam que o crescimento microalgal com meio de cultura da planta tem resultados iguais ou até superiores ao cultivo com meio de cultura comercial. Os resultados nutricionais também são superiores, resultando em um acréscimo de até 10% na quantidade de proteína na biomassa seca, enquanto para o teor de lipídio esse acréscimo pode chegar até 3 vezes mais de quando cultivado no meio de cultura comercial. O uso de macrófita como meio de cultura tem benefícios, como o fato de ser uma planta regional do estado de São Paulo e ser facilmente encontrada, com grande capacidade de crescimento, sendo desnecessário uma elevada biomassa para o meio de cultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009; 2014; 2015).

Figura 3: Macrófita *Eichhornia crassipes*.



Fonte: Imagem da autora.

Plantas como a *Eichhornia azurea* (Figura 4), da família Pontederiaceae como a *E. crassipes*, também tem sido estudada por seu papel na ecologia de comunidades aquáticas. Um estudo realizado por Carniatto et al. (2020) avaliou a dinâmica populacional da *E. azurea* em um reservatório brasileiro e como essa espécie influencia a estrutura da comunidade de macroinvertebrados, mostrando resultados que a planta é de grande importância para a estruturação de comunidades em ambientes aquáticos.

Os resultados com o meio de cultura de *E. azurea* são similares aos resultados com meio de *E. crassipes*, com a vantagem de ter maior quantidade de massa que as outras

Figura 4: *Eichhornia azurea*.

Fonte: <https://sib.gob.ar/especies/eichhornia-azurea>.

plantas, chegando a medir de 1 a 8 metros de comprimento por conta de sua raiz que cresce levemente em zigzague (POTT; POTT, 1997). Estudos com a *E. azurea* mostraram que produtos de alto valor como lipídio, proteína e a rápida duplicação celular são características da biomassa da microalga cultivada em meio de cultura a base da planta (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018b).

Outra macrófita é a *Lemna minor* (Figura 5), da família Araceae, também conhecida como lentilha d'água, é um excelente bioindicador para água com excesso de nutrientes e metais pesados, podendo ser identificada em um intervalo de tempo de 24 até 72h, com mudanças visíveis em suas características, e assim apontado o desequilíbrio no ambiente aquático de forma rápida (LI et al., 2020). Além disso, a *L. minor* é uma macrófita de rápida replicação, podendo dobrar a sua biomassa em até uma semana, e por conta da sua excelente capacidade de remoção de metais pesados e excesso de nutrientes presentes no meio, também pode ser usada para tratamento de águas residuais (BASSI et al., 1990; RAHMANI; STERNBERG, 1999).

O meio de cultura de *L. minor* é rico em diversos nutrientes, disponibilizando uma composição rica em nitrogênio, além dos micronutrientes como cálcio e magnésio, que são elementos essenciais influenciando na atividade enzimática e proporcionando rápida duplicação celular, além da rica biomassa e contribuição para o aumento de clorofila-a que é responsável pela acumulação de lipídios (DONG et al., 2020).

Figura 5: *Lemna minor*.

Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lemna>.

A Tabela 1 a seguir, mostra a composição bioquímica dos meios de cultura comercial e alternativos, comparando os elementos presentes em cada macrófita em relação aos outros meios utilizados. Todas apresentam macro e micronutrientes essenciais para a microalga, porém cada planta tem seu elemento de maior abundância, *E. crassipes* destaca-se pelo maior conteúdo de nitrogênio, a *L. minor* que apresenta maior presença de cálcio e magnésio e a *E. azurea*, que apresenta maior teor de fósforo. A junção dessas plantas apresenta uma complementação de todos os elementos necessários para o crescimento da microalga que estão presentes em cada uma de forma diferente.

2.5 Isolamento da microalga e manutenção da cultura da *Messastrum gracile*

Independente do trabalho que vai ser realizado com a microalga existe um padrão específico de coleta para esses microrganismos. No caso da microalga para cultivo e produção de biomassa em laboratório, há a necessidade de materiais e equipamentos básicos como autoclave, microscópio, lupa binocular, bico de Bunsen, pinça, algodão, gaze, luz artificial, prateleiras vazadas, câmara de assepsia, entre outros. Todo material utilizado para o cultivo deve ser específico para este fim, por conta de qualquer contaminação que pode acarretar a perda da cultura (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

Em geral, o inóculo vem de uma população natural, que deve ser isolado dentro de um curto período, evitando contaminações e morte das microalgas. No laboratório as microalgas são inoculadas em meio de cultura específico para cada espécie a ser cultivada.

Tabela 1. Composição de nutrientes (mg l^{-1}) em diferentes meios de cultura: LM = *Lemna minor*; EC = *Eichhornia crassipes*; EA = *Eichhornia azurea* (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018a, 2018b).

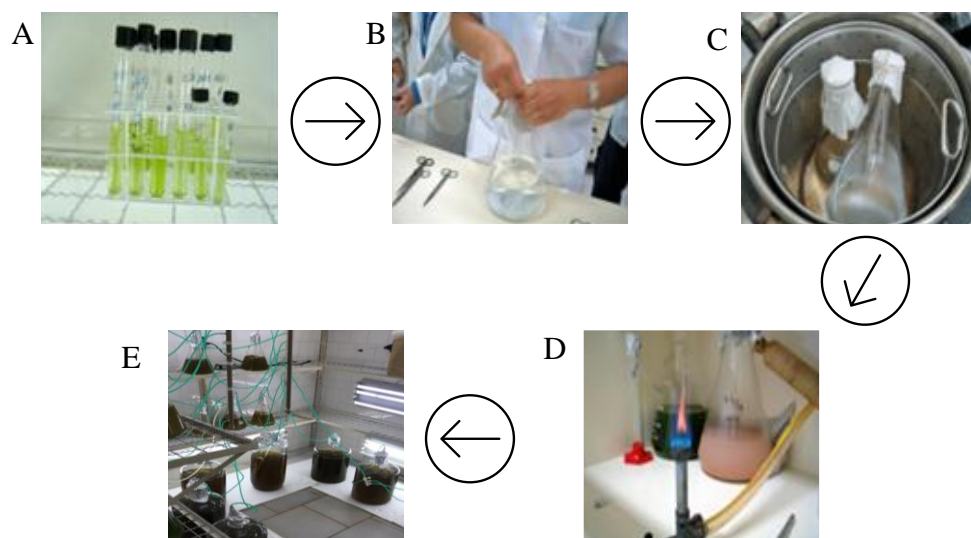
Composição	Meios de cultura				
	Comercial CHU ₁₂	NPK	Alternativo		
			EC	EA	LM
P ₂ O ₅	-	25.10 ³	-	-	-
K ₂ O	-	10.10 ³	-	-	-
N	-	10.10 ³	35,1.10 ²	28,4.10 ²	3.10 ²
P	-	-	56,4.10 ²	70,7.10 ²	2.10 ²
K	-	-	73.10 ³	76,2. 10 ²	2.10 ³
Ca	-	-	36,9	68,8	550
Mg	-	-	23	4,3	190
S	-	-	3.10 ⁻¹	3.10 ⁻²	4.10 ⁻²
B	-	-	34.10 ⁻²	41.10 ⁻²	21.10 ⁻³
Cu	-	-	18.10 ⁻²	22.10 ⁻²	31.10 ⁻³
Fe	-	-	6.10 ⁻²	56.10 ⁻²	71.10 ⁻³
Zn	-	-	3.10 ⁻²	12.10 ⁻²	0,1
Tiamina	-	7	7	7	7
Vit B ₂	-	7	7	7	7
Vit B ₆	-	5	5	5	5
Vit B ₁₂	-	33.10 ³	33.10 ³	33.10 ³	33.10 ³
Vit H	-	10	10	10	10
Biotina (B ₁)	-	1	1	1	1
Ca(NO ₃) ₂	3,0	-	-	-	-
Na ₂ CO ₃	2,0	-	-	-	-
KCl	0,5	-	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	0,5	-	-	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5	-	-	-	-
Biomassa (Kg m ²)	-	-	3	4,5	96

Quanto ao método de isolamento pode ser do tipo líquido ou sólido (ágar) em placa de petri. A escolha dependerá da espécie e do tamanho da microalga a ser cultivada (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

As células algais são preparadas uma a uma, para isso são utilizados meios e pipetas, onde as células microalgais são passadas por diversas lavagens em uma placa escavada. Todo esse processo de isolamento é feito no microscópio, cerca de 12 a 15 células devem ser isoladas e lavadas cuidadosamente de 6 a 12 vezes em água ou meio estéril. Uma nova micropipeta ou capilar deve ser utilizado a cada lavagem, todas esterilizadas. Posteriormente, são colocados em tubos com meio estéril, sob luz de LED para estimular o crescimento. Todo esse processo é realizado com vidraria esterilizada para evitar contaminação (SIPAÚBA-TAVAVARES; ROCHA, 2001).

A Figura 6 mostra as diferentes etapas no procedimento de preparação do cultivo algal utilizada neste estudo a partir de uma cepa proveniente da UFScar (CCMA-UFcar5), com diferentes vidrarias utilizadas para cultivo em volume de 2 litros. Todo esse procedimento requer muito cuidado sendo imprescindível a esterilização do material utilizado para evitar contaminação por bactéria ou outros microrganismos (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

Figura 6: Diferentes etapas no procedimento do cultivo utilizado em laboratório para o crescimento de *M. gracile* em meios mistos de macrófita; (A) Microalgas em tubos de ensaio proveniente de cepário específico; (B) Preparação dos meios de cultura em 2 L; (C) Esterilização do meio de cultura em autoclave em 2 L; (D) Erlenmeyers com microalga e meio de cultura em câmara de assepsia; (E) Cultivo de *M. gracile* em volume em meio misto de macrófita

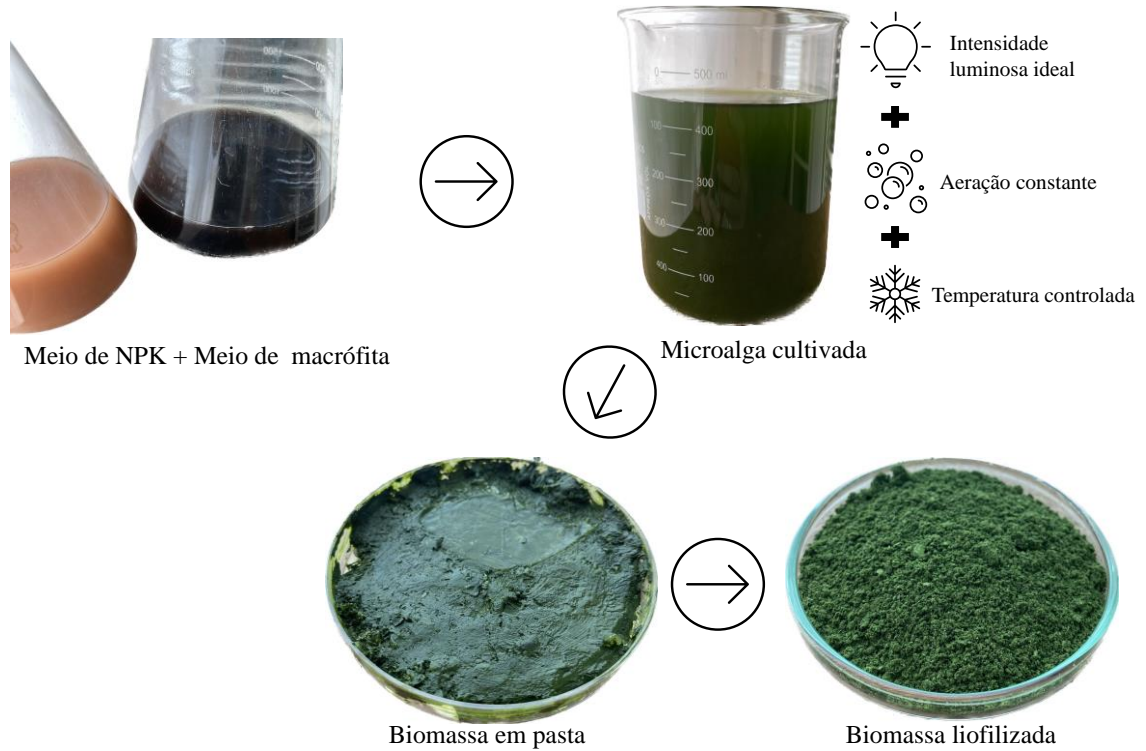


Fonte: Imagens cedidas pela professora Dr^a Lúcia Helena Sipaúba Tavares.

A Figura 7 mostra as etapas para obtenção de biomassa algal em sistema fechado de acordo com o procedimento seguido no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Caunesp) da Unesp de Jaboticabal, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena Sipaúba Tavares.

A Figura 8 mostra as etapas para confecção do meio de cultura a base de macrófita, seguindo o protocolo criado por Sipaúba-Tavares et al. (2009). O procedimento conta com a limpeza das macrófitas, secagem e moagem das plantas, extração com água destilada por meio de aquecimento, que posteriormente coado e autoclavado, seu armazenamento deve ser refrigerado.

Figura 7: Procedimentos para obtenção da biomassa algal



Fonte: Imagens do autor.

Figura 8: Confeção do meio de cultura de macrófita.



Fonte: Imagens do autor.

Mesmo com resultados positivos, os meios de cultura alternativos em certos casos necessitam de vitaminas como a tiamina, biotina e cianocobalamina para potencializar o

resultado do desenvolvimento microalgal (BEER et al., 2009), sendo que muitas das algas requerem vitaminas B₁₂ (SIPAÚBA-TAVARES; BACHION, 2002), além de vitamina C e E, que auxiliam na divisão celular das microalgas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As microalgas têm se destacado com meios de cultura não convencionais, embora as tecnologias para produção de microalgas estejam em constante desenvolvimento, são considerados recentes os subprodutos alternativos para produção de elevada biomassa como forma de baratear o custo de produção. Assim, estudos que possibilitem maior conhecimento sobre tecnologias alternativas para a produção vigorosa das microalgas com baixo custo de produção irão contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos para o cultivo de microalgas. Diferentes meios de cultura têm quantidades diferentes de nutrientes que podem alterar significativamente a quantidade de biomassa produzida durante o cultivo, sendo importante otimizar a composição do meio de cultura para alcançar o maior rendimento de produtos de valor agregado às microalgas.

Espera-se avaliar o efeito mais eficaz do uso misto de macrófitas no desenvolvimento da microalga *M. gracile* para a obtenção de valor nutricional e elevada biomassa. As macrófitas já são usadas para meio de cultura alternativo utilizando somente uma espécie de planta, de forma separada, porém ainda não há estudos com os melhores resultados das plantas misturados para servir como o uso de duas ou mais plantas compondo o meio de cultura, podendo formar um novo protocolo para cultivo de *M. gracile*. Com o presente trabalho espera-se o uso múltiplo das macrófitas como meio de cultura, verificação da melhor junção de macrófita como meio de cultura, aplicação de novas metodologias de meios de cultura alternativos com uso de planta aquática e uso de novos protocolos de cultivo reduzindo o custo e avaliando a melhora do cultivo com aumento da biomassa.

3. OBJETIVOS

- Verificar qual melhor combinação das três macrófitas (*Eichhoria crassipes*, *Eichhornia azurea* e *Lemna minor*) em relação a biomassa da microalga;
- Avaliar o potencial destes meios de cultura no crescimento de *Messastrum gracile*;
- Obter informações sobre o valor nutricional da espécie *M. gracile* em função do tratamento utilizado.

4. REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; CID, Á.; FIDALGO PAREDES, P.; TORRES, E.; HERRERO, C. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións, 1995.
- AERTS R. & CHAPIN F.S. The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv. Ecol. Res.* v. 30, p. 1–67, 2000.
- AMARO, H.M.; GUEDES, A.C.; MALCATA, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied energy*, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.
- BARNABE, G. Microalgae harvesting. 1989.
- BASSI, M.; CORRADI, M. G.; FAVALI, M. A. Effects of chromium in freshwater algae and macrophytes. ASTM International, 1990.
- BAUMGARTNER, T. R. S. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel. *PEQ/UEM*, p. 124, 2011.
- BEER, L.L.; BOYD, E.S.; PETERS, J.W.; POSEWITZ, M.C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 264-271, 2009.
- BHUVANESHWARI, K.; SINGH, P.K. Response of nitrogen-fixing water fern *Azolla* biofertilization to rice crop. *3 Biotech*, v. 5, p. 523-529, 2015.
- BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. Introduction to the Algae. p. 720. 1985
- BONINI, M. D. A.; BASTOS, R. G. Biomass production by *Aphanothece microscopica* and *Chlorella vulgaris* in heterotrophic growth from glucose. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde (Londrina)*, v. 33, n. 2, p. 151-160, 2012.
- BORNETTE, G.; PUIJALON, S. Macrophytes: ecology of aquatic plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, Chichester: John Wiley & Sons, p. 1-9, 2009.
- BORNETTE, G., PUIJALON, S. Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. *Aquatic sciences*, v. 73, p. 1-14, 2011.
- BOROWITZKA, M.A.; MOHEIMANI, N.R. Open pond culture systems. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, p. 133–152, 2013.
- BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. Micro-algal biotechnology, Cambridge University Press, 1988.
- CARNIATTO, N.; CUNHA, E.R.; THOMAZ, S.M.; QUIRINO, B.A.; FUGI, R. Feeding of fish inhabiting native and non-native macrophyte stands in a Neotropical reservoir. *Hydrobiologia*, v. 847, p. 1553–1563, 2020.

- CARVALHO, A.P; MEIRELES, L.A.; MALCATA, F.X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, v. 22, n. 6, p. 1490-1506, 2006.
- CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and purification technology*, v. 50, n. 3, p. 324-329, 2006.
- CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 90, p. 336-346, 2018.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.
- CHU, S.P., TRUUMES, I., ROTHOFKY, M.L., PATEL, M.G., GENTILE, F., DAS, P. R., PUAR, M.S., LIN, S. L. Inhibition of c-fos Proto-oncogene Induction by Sch 52900 and Sch 52901, Novel Diketopiperazines Produced by *Gliocladium* sp. *The Journal of antibiotics*, v. 48, n. 12, p. 1440-1445, 1995.
- COOK, C.D.K. *Water plants of the world*. The Hague: W. Junk, p. 561, 1974.
- DALAY, M. C.; IMAMOGLU, E.; DEMIREL, Z. Agricultural Fertilizers as Economical Alternative for Cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 17, n. 3, p. 393– 397, 2007.
- DEMARTY, M.; PRAIRIE, Y. T. In situ dissolved organic carbon (DOC) release by submerged macrophyte–epiphyte communities in southern Quebec lakes. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, v. 66, n. 9, p. 1522-1531, 2009.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. D.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1959-1967, 2006.
- DO NASCIMENTO, M.; DUBLAN, MDL. A.; ORTIZ- MARQUEZ, J. C. F.; CURATTI, L. High lipid productivity of an *Ankistrodesmus Rhizobium* artificial consortium. *Bioresource Technology*. v. 146, p. 400- 407, 2013.
- DONG, X.; HUANG, L.; LI, T.; XU, J.W.; ZHAO, P, YU, X. The Enhanced biomass and lipid accumulation in algae with an integrated treatment, strategy by waste molasses and Mg²⁺. *Energ Sourc A* v. 42, p. 1183–1192, 2020.

- DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Third generation biofuels from microalgae, 2010.
- EL - SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. Aquaculture, v.179, p.149-168, 1999.
- ELUMALAI, S.; SAKTHIVEL, R.; KUMAR, S. Ganesh. Ultra structural and analytical studies of biodiesel producing microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Senedesmis* sp.) collected from Tamil Nadu, India. Current Botany, v. 2, n. 6, 2011.
- ESTEVEES, F. A.; CAMARGO, A. F. M. Sobre o papel das macrófitas aquáticas na estocagem e ciclagem de nutrientes. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 1, n. 1, p. 273-298, 1986.
- ESTEVEES, B.S.; SUZUKI, M.S. Limnological variables and nutritional content of submerged aquatic macrophytes in a tropical lagoon. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 22, p. 187-198, 2010.
- ESTEVEES, F. A. Fundamentos de limnologia. Interciência, 1998.
- FAWLEY, M. W., DIMMER, S.K., FAWLEY, K.P. Evaluating the morphospecies concept in the *Selenastraceae* (Chlorophyceae, Chlorophyta) 1. Journal of Phycology, v. 42, n. 1, p. 142-154, 2006.
- FERNÁNDEZ, F. G. A.; REIS, A.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M.; VERDELHO, V.; LLAMAS, B. The role of microalgae in the bioeconomy. New Biotechnology, v. 61, p. 99-107, 2021
- FORJÁN, L.E.; NORES, I.G.; BEJARANO, C.C.; LOBATO, C.V. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation, FAO Fisheries Technical Paper No. 396 Rome, 2007.
- FRANÇA, J. B.A.; DE MORAES, T. V.; VAZ, D.C.; FERREIRA, A. A.; SOARES, F. A. L. Tratamento de efluente doméstico com macrófitas aquáticas para reuso na fertirrigação. IRRIGA, v. 1, n. 1, p. 85-93, 2014.
- GARCIA DA SILVA, T., BOCK, C., SANT'ANNA, C.L., BAGATINI, I.L., WODNIOK, S., VIEIRA, A.A.H. *Selenastraceae* (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcl, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. Fottea, v. 17, n.1, p. 1-19, 2017.
- GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition: mineral nutrition. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, p. 97-115, 2004.
- GUIRY, M.D., GUIRY, G.M. Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2021.

- GUSAIN, R.; SUTHAR, S. Potential of aquatic weeds (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* and *Eichhornia* sp.) in biofuel production. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 109, p. 233-241, 2017.
- HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquíicultura. *Planta daninha*, v. 24, p. 21-28, 2006.
- HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Tratamento de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 181-188, 2008.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, v. 87, p. 38-46, 2010.
- IMAMOGLU, E.; SUKAN, F.V.; DALAY, M.C. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, v. 1, n. 3, 2007.
- KASTRATOVIĆ, V.; BIGOVIĆ, M.; JAĆIMOVIĆ, Ž.; KOSOVIĆ, M.; ĐUROVIĆ, D.; KRIVOKAPIĆ, S. Levels and distribution of cobalt and nickel in the aquatic macrophytes found in Skadar Lake, Montenegro. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 26823-26830, 2018.
- KILHAM, S., KREEGER, D., GOULDEN, C., LYNN, S. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents on *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biol.* v.38, n. 3, p. 591-596, 1997.
- KOBAYASHI, M.; ITO, M. Studies on the control of cell division in a green alga *Ankistrodesmus gracilis* (chlorococcales) II. Control by nitrogen compounds. *The botanical magazine*. v. 90, n. 3, p. 211- 217, 1977.
- KRIENITZ, L., BOCK, C., DADHEECH, P.K., PRÖSCHOLD, T. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. *Phycologia*, v. 50, n. 1, p. 89-106, 2011.
- KRIENITZ, L., USTINOVA, I., FRIEDL, T., HUSS, V.A. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, v. 37, n. 5, p. 852-865, 2001.
- KUMAR, K. S., KUMARI, S., SINGH, K., & KUSHWAHA, P. Influence of seasonal variation on chemical composition and nutritional profiles of macro-and microalgae. *Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing: Food and Health Perspectives*, p. 14-71, 2021.

- LACOU, P.; FREEDMAN, B. Environmental influences on aquatic plants in freshwater ecosystems. *Environmental Reviews*, v. 14, p. 89–136, 2006.
- LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of botany*, v. 89, n. 7, p. 871-885, 2002.
- LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, Oxford, v. 66, n. 1, p. 204-213, 2014
- LI, Y. L.; WANG, C.; CHAO, H.; YU, D. YU, C.; LIU. Submerged macrophytes successfully restored a subtropical aquacultural lake by controlling its internal phosphorus loading. *Environmental Pollution*, 2020.
- LOURENÇO, S.O. Cultivos de microalgas marinhas: Princípios e Aplicações. Universidade Federal Fluminense, RJ, BRASIL. p. 588, 2006.
- MARCONDES, D. A. S.; VELINI, E. D.; MARTINS, D.; TANAKA, R. H.; CARVALHO, F. T. D.; CAVENAGHI, A. L.; BRONHARA, A. A. Eficiência de fluridone no controle de plantas aquáticas submersas e efeitos sobre algumas características ambientais. *Planta Daninha*, v. 20, p. 63-71, 2002.
- MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 71, n. 2, p. 855-863, 2004.
- PANIANGUA, L. M. El Tecnitatl. Concentrado de algas *Spirulina* frente de proteínas comestibles Del pueblo de los Aztecas. México, p. 1-8, 2003.
- PEDRALLI, G.; TEIXEIRA, M.C.B. Macrófitas aquáticas como agentes filtradores de materiais particulados, sedimentos e nutrientes. In: Henry, R. *Ecótonos nas Interfaces dos Ecosistemas Aquáticos*. São Carlos, RiMa, 177-194, 2003.
- PÉREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.
- PETR, T. Interactions between Fish and Aquatic Macrophytes in Inland waters. A Reviewed, 2000.
- PIETERSE, AH.; MURPHY, KJ. Aquatic Weeds. The ecology and management of nuisance aquatic vegetation. Oxford: Oxford Science Publications. p. 616, 1990.
- PIORRECK, M.; BAASCH, K.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, v.23, p.207-216, 1984

- POMPÊO, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. *Oecologia brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 5, 2008.
- POTT, V.J.; POTT, A. Checklist das macrófitas aquáticas do Pantanal, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 11, n. 2, p. 215 – 227, 1997.
- POTT, V. J.; POTT, A. Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília: Embrapa, 404 p., 2000.
- RAHMANI, G. N. H.; STERNBERG, S. P. Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *Bioresource technology*, v. 70, n.3, p. 225-230, 1999.
- RODELLA, R. A.; COSTA, N. V.; COSTA, L. D. N. C.; MARTINS, D. Diferenciação entre *Egeria densa* e *Egeria najas* pelos caracteres anatômicos foliares. *PlantaDaninha*, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 211-220, 2006.
- 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.
- SANTIAGO, C. B.; ALDABA, M. B.; REYES, O. S.; LARON, M. A. Response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry to diets containing *Azolla* meal. In *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, v. 2, p. 377-382, 1988.
- SILVA, S.A.P. Biorremediação em águas residuais: remoção de fosfatos utilizando microalgas *Chlorella vulgaris* imobilizadas em meio de alginato de sódio. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia) – Universidade do Porto. Porto, 2007.
- SINGH, D. V.; BHAT, R. A.; UPADHYAY, A. K.; SINGH, R.; SINGH, D. P. Microalgae in aquatic environs: a sustainable approach for remediation of heavy metals and emerging contaminants. *Environmental Technology & Innovation*, v. 21, p. 101340, 2021.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes. São Carlos, UFSCar, pp.191. (Tese de doutorado), 1988.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I-algas clorofíceas. *Biotemas*, v. 6, n. 1, p. 93-106, 1993.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; FREITAS, A. M.; BRAGA, SOUZA, F. M. The use of mechanical aeration and its effects on water mass. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, p. 33-42, 1999.
- SIPAÚBA-TAVARES L.H.; ROCHA O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para a alimentação de organismos aquáticos. Editora Rima, São Carlos, p. 106, 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.; BARROS, A.F.; BRAGA, F.M.S. Effect of floating macrophyte cover on the water quality in fishpond. Acta Scientiarum: Biological Sciences, p. 101-106, 2003.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BRAGA, F. D. S. The feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishponds with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. Brazilian Journal of Biology, v. 67, p. 459-466, 2007.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; DE SOUZA BRAGA, F. M. Constructed wetland in wastewater treatment. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 30, n.3, p. 261-265, 2008 (a).
- 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 n.4 p.875-883, 2008 (b).
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; IBARRA, L.C.; FIORESI, T.B. *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyta) laboratory cultured in CHU12 and macrophyte with NPK media. Boletim do Instituto de Pesca, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2009.
- SIPAUBA-TAVARES, L.H.; MILLAN, R.N.; DE ALMEIDA, B.I.F.; DE SOUZA, F.M.B. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2011.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; DIAS, S. G.; TRAVAINI-LIMA, F.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; BOARETO, C. A. Macrophytes in neotropical aquaculture farms: Positive and negative effects. Macrophytes: Biodiversity, Role in Aquatic Ecosystems and Management Strategies, p. 59-83, 2014.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., SEGALLI A. M. D. L., SCARDOELLI-TRUZZI B. Aquatic Plants: Alternative medium for microalgae growth. Annals of Aquaculture Research. v. 2, p. 1009, 2015.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; SEGALI, A.M.D.L.; SCARDOELLI-TRUZZI, B. Development of lowcost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 29, e5, 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, n. 3, p. 579 - 587, 2018 (a).
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; GALATTI-TEDESQUE, M.; MELO-SANTO, G.L.; SCARDOELITRUZZI, B. Macrophytes to improve the cultivation of *Ankistrodesmus gracilis*. *Journal of Algal Biomass Utilization*. v. 9, n. 1, p. 18-25, 2018 (b).
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; FENERICK, D. C.; TEDESQUE, M. G. Comparison of photoautotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) in alternative culture media. *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, p. 914-920, 2019.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; TEDESQUE, M. G.; COLLA, L. C.; MILLAN, R. N.; SCARDOELI-TRUZZI, B. Effect of untreated and pretreated sugarcane molasses on growth performance of *Haematococcus pluvialis* microalgae in inorganic fertilizer and macrophyte extract culture media. *Brazilian Journal of Biology*, v. 82, 2022.
- SØNDERGAARD, M.; DAVIDSON, T. A.; LAURIDSEN, T. L.; JOHANSSON, L. S.; JEPPESEN, E. Submerged macrophytes in Danish lakes: impact of morphological and chemical factors on abundance and species richness. *Hydrobiologia*, p. 1-12, 2022.
- SOOD, A.; UNİYAL, P. L.; PRASANNA, R.; AHLUWALIA, A. S. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. *Ambio*, v. 41, p. 122-137, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.: *Fisiologia Vegetal*. Editora Artmed. 3ª edição. Porto Alegre, 2004.
- TEDESQUE, M. G.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) growth using sugarcane molasses-based macrophyte extract culture media. *Journal of Applied Phycology*, v. 33, n. 5, p. 2745-2754, 2021.
- TUNDISI, J. G. Governança da água. *Revista da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 20, n.2, p. 222-235, 2013.
- TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.; ROCHA, O.; GENTIL, J.G.; NAKAMOTO, N. Primary production, standing-stock of phytoplankton and ecological factors in a shallow tropical reservoir (Represa do Lobo, São Carlos, Brasil). In: *Seminario medio ambiente y represas: São Carlos*, v. 1, p.138-172, 1977.
- 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.
- WEN, Z.Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* v. 21, p. 273–294, 2003.

WETZEL, R. G. Microcommunities and microgradients: linking nutrient regeneration, microbial mutualism, and high sustained aquatic primary production. *Netherland Journal of Aquatic Ecology*, v. 27, p. 3-9, 1993.

YANG, S.; LIU, G.; MENG, Y.; WANG, P.; ZHOU, S.; SHANG, H. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, Essex, v. 172, n. 8, p. 180-185, 2014.

ZHANG, X.W.; CHEN, F.; JOHNS, M.R. Kinetic models for heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in batch and fed-batch cultures. *Process Biochem.* v. 5, p. 385 – 389, 1999.

ZHANG, B.; LI, W.; GUO, Y.; ZHANG, Z.; SHI, W.; CUI, F.; TAY, J. H. Microalgal-bacterial consortia: from interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 118, p. 109563, 2020.

ZHONG, P.; YU, G.; ZHENG, Y.; SUN, X.; WANG, Y. Spatial and temporal variations of nutrients composition and structure in the main estuaries of Jiaozhou Bay. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 64, p. 012045, 2017.

5. ARTIGO: Meio de cultura misto de macrófitas no cultivo de *Messastrum gracile*.

*Manuscrito a ser enviado a Algal Research, atendo as normas da mesma.

5.1 RESUMO

O presente estudo avaliou o crescimento e as condições biológicas da microalga *Messastrum gracile* a fim de comparar o efeito das misturas de extrato de macrofita na produção de biomassa e condições químicas. As taxas de crescimento (k) da *M. gracile* foram diferentes entre os meios de cultura mistos, sendo maiores no cultivo que apresentavam juntamente as plantas *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor*, enquanto os meios que apresentavam a planta *Eichhornia azurea*, seu crescimento foi inferior. Os teores de lipídios nos meios L+C+A (*L. minor*; *E. crassipes*; *E. azurea*) e C+L (*E. crassipes*; *L. minor*) ficaram entre 9 e 8,4% respectivamente da biomassa seca, enquanto nos meios A+C (*E. azurea*; *E. crassipes*) e A+L (*E. azurea*; *L. minor*) atingiram 4 e 6% respectivamente de lipídio da biomassa seca. Os teores de proteína nos meios L+C+A e C+L ficaram entre 44,5 e 42,1 % respectivamente, e os meios de A+C e A+L com 37,5 e 36,2% respectivamente. A *Messastrum gracile* cultivada nos meios de cultura mistos com as plantas *E. crassipes* e *L. minor*, que são os meios L+C+A e C+L apresentaram resultados melhores em relação aos teores de lipídeos e proteínas. A planta *E. azurea* mostrou-se incompatível para cultivo de forma mista.

Palavras-chave: *Messastrum gracile*; *Eichhornia crassipes*; *E. azurea*; *Lemna minor*; Extrato de macrófita misto; crescimento.

5.2 Summary

Mixed macrophyte culture medium in the cultivation of *Messastrum gracile*.

The present study evaluated the growth and biological conditions of the microalga *Messastrum gracile* in order to compare the effect of macrophyte extract mixtures on biomass production and chemical conditions. The growth rates (k) of *M. gracile* varied among the mixed culture media, with higher rates observed in the cultivation that included the plants *Eichhornia crassipes* and *Lemna minor* together, while the media containing the plant *Eichhornia azurea* showed lower growth. The lipid content in the L+C+A (*L. minor*; *E. crassipes*; *E. azurea*) and C+L (*E. crassipes*; *L. minor*) media ranged between 9% and 8.4%, respectively, of dry biomass, while in the A+C (*E. azurea*; *E. crassipes*) and A+L (*E. azurea*; *L. minor*) media, it reached 4% and 6%, respectively, of lipid in dry biomass. The protein content in the L+C+A and C+L media ranged between 44.5% and 42.1%, respectively, while the A+C and A+L media had 37.5% and 36.2%, respectively. *Messastrum gracile* cultivated in mixed culture media with *E. crassipes* and *L. minor*, specifically in the L+C+A and C+L media, showed better results in terms of lipid and protein content. The plant *E. azurea* proved to be incompatible for mixed cultivation.

Keywords: *Messastrum gracile*; *Eichhornia crassipes*; *Eichhornia azurea*; *Lemna minor*; mixed macrophyte extract; growth.

5.3 Introdução

As microalgas verdes constituem um grupo diverso e seus produtos são utilizados em várias vertentes da indústria, por exemplo, na aquicultura, farmacologia, para transformação de energia e muitos outros. Esses microrganismos assimilam carbono, nitrogênio, fósforo e micronutrientes, e posteriormente são transformados em compostos orgânicos que compõem as estruturas delas, com sua biomassa extremamente rica em produtos de alta qualidade, como proteínas, lipídios, vitaminas e antioxidantes, que são componentes principais de alimentação animal e humana, também biocombustíveis como biodiesel e biohidrogênio, e medicamentos suplementares (HASHEMIAN et al., 2019; CHAI et al., 2021).

A eficiência de crescimento das microalgas apresenta um grande potencial produtivo, e está diretamente ligado ao meio de cultura, que em sua grande maioria é utilizado meios comerciais com alto valor, o que pode afetar a viabilidade da produção, sendo composto por elementos químicos que fornecem os nutrientes essenciais para o cultivo, podendo estimular ou inibir o crescimento algal (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011). Na busca de maior conhecimento, combinações de meios de cultura com fontes alternativas que contenham nutrientes como nitrogênio, fósforo e micronutrientes, visam a maximização do crescimento e a produção de compostos específicos de interesse comercial (GAO et al., 2021; CHEN, et al., 2022).

O meio de cultura a base de macrófita têm demonstrado consistentemente o desempenho positivo para cultivo de *Messastrum gracile*, causando aumento significativo na produção da biomassa, e que quando utilizada em condições normais de cultivo fototrófico, apresenta resultados iguais ou superiores aos meios de cultura comerciais. O meio de cultura de macrófita fornece nutrientes essenciais, fundamentais para o desenvolvimento da microalga, como potássio, nitrogênio, fósforo e micronutrientes como cálcio e magnésio que são importantes para o desenvolvimento algal e resulta no aumento dos teores de lipídios e proteínas presentes nelas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2017; 2019; 2022).

Dentre as plantas utilizadas individualmente como meio de cultura para microalgas, a *Eichhornia crassipes*, *Lemna minor* e *Eichhornia azurea* são plantas que mostraram melhor atuação no cultivo. Nas condições experimentais, foi observado que os meios de cultura baseados nessas plantas se destacaram, proporcionando os valores mais altos de densidade celular e biomassa das microalgas, enfatizando assim o papel do extrato dessas plantas como facilitadoras do crescimento algal (TEDESQUE et al., 2021).

No entanto, é importante salientar que os experimentos utilizam apenas uma espécie de planta aquática como base para o meio de cultura, deixando uma lacuna significativa para investigações, explorando a possibilidade de combinar o extrato de diferentes plantas aquáticas para gerenciar de forma mais eficaz os nutrientes presentes em cada uma delas, demonstrando ser uma estratégia valiosa para otimizar o cultivo de microalgas. Por exemplo, a planta *Lemna minor*, de menor dimensão em comparação com outras macrófitas, utiliza-se maior volume de planta, causando um possível problema com a disponibilidade dela, no entanto, combinada a outras plantas pode ser uma alternativa viável para complementar o cultivo e melhorar a eficiência nutricional, especialmente em situações em que outras plantas apresentam resultados menos satisfatórios em diferentes parâmetros de análise. Este estudo avaliou: (1) qual meio misto de cultura promove melhor rendimento no crescimento de *Messastrum gracile*; (2) se ocorre diferenças do valor nutricional da *M. gracile* com os diferentes meios mistos de macrófita; (3) se o meio misto interfere nas variáveis físico-químicas do meio de cultura; (4) se o meio misto de macrófita promove maior biomassa de *M. gracile*.

6. Material e Métodos

6.1 Planejamento experimental

A microalga *Messastrum gracile* utilizada no experimento é proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem n° CCMA-UFSscar5, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil), posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (UNESP, Centro de Aquicultura) em sistema de cultivo estático não axênico com aeração constante e temperatura mantida entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido em torno de $6,4 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$. O experimento foi realizado na intensidade de luz de $60 \mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 24 horas. O experimento iniciou com volume de cultura de 10 mL em meio CHU₁₂ e foi transferido para volume de cultura de 250 mL na densidade de $0,75 \times 10^5$ células mL^{-1} também no meio de cultura CHU₁₂. Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento (7º dia), 10 mL (com densidade de 2×10^5 células mL^{-1}) foram transferidos para uma cultura contendo 2 L em meio de cultura NPK para adaptação da alga em meio alternativo. Após o 7º dia de crescimento exponencial, a cultura de *M. gracile* foi transferida para recipientes esterilizados de 2 L contendo densidade de $4,5 \times 10^5$ cells mL^{-1} , no volume de 190 mL da cultura, onde foram preparados meios de cultivo de macrófitas (Sipaúba-

Tavares et al., 2009). Para os tratamentos mistos foram selecionadas três plantas aquáticas: *Eichhornia azurea* (A), *Eichhornia crassipes* (C) e *Lemna minor* (L). Os quatro tratamentos foram elaborados com as seguintes misturas de plantas aquáticas: L+C+A; A+C; C+L; e A+L. A escolha destas macrófitas foi baseada em estudos anteriores onde foram obtidos resultados adequados para o crescimento destas *M. gracile*. Essas macrófitas são de fácil obtenção nas proximidades do laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton. Todos os meios de cultura foram autoclavados antes do uso e transferidos para frascos sob condições assépticas. A iluminação foi fornecida por lâmpadas LED (High CRI LED 6500 k) no topo de cada cultura. Os ensaios foram investigados durante 16 dias com triplicatas para cada dia de coleta (1, 4, 8, 12 e 16) sob a mesma condição de crescimento (Figura 1).

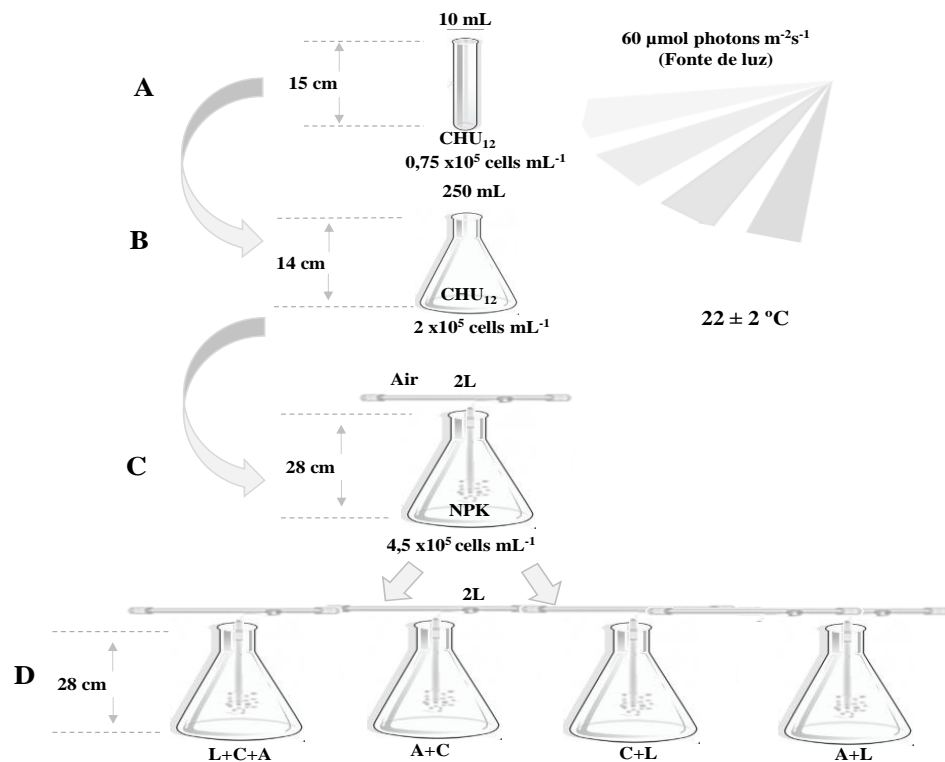


Figura 1. Diagrama esquemático do preparo da microalga *Messastrum gracile* em volume de 2L, para o cultivo em meio misto de macrófita onde: (A) Manutenção da cepa 10 mL em meio CHU₁₂; (B) Cultivo inicial em 2L somente em meio NPK (20:5:20); (C) Cultivo em meio NPK em volume de 2 L; (D) Frascos experimentais nas diferentes associações de macrófitas como meio de cultura, onde: L+C+A = *Lemna minor*+*Eichhornia crassipes*+*E. azurea*; A+C= *Eichhornia azurea*+*E. crassipes*; C+L = *Eichhornia crassipes*+*Lemna minor*; A+L = *E. azurea*+*Lemna minor*.

6.2. Meios de cultura

Para o preparo dos 4 tratamentos do meio de cultura misto com macrófitas foi realizado o seguinte procedimento. Primeiramente, cada planta aquática foi preparada individualmente seguindo a metodologia proposta por Sipaúba-Tavares et al. (2009), onde aproximadamente 5 kg (peso úmido) de biomassa vegetal foram lavados suavemente em água corrente para remover detritos e epífitas. Após secas ao sol, as macrófitas foram transferidas para estufa a 60°C por 24 horas. O material vegetal foi triturado e homogeneizado em moedor e fervido em água destilada por 1 hora. O extrato de macrófita foi filtrado em manta de microfibras e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Foram coletadas amostras de 70 mL que, após resfriamento, foram diluídas com água destilada até 1,4 L, quando foram adicionados 2,5 mL de NPK (20:5:20), confeccionado com 70 g de NPK (20:5:20) diluído em 1 L de água destilada e posteriormente autoclavado a 120°C por 20 minutos, a quantidade adicionada ao meio foi definida por meio de ensaios preliminares para definição do protocolo do meio de macrófita (SIPAÚBA-TAVARES, et al., 2009). Complexo de vitamina B foi adicionado ao meio de cultura extrato de macrófita na proporção de 0,02 gL⁻¹. Após o preparo de cada meio de cultura com macrófita, foram calculadas as porcentagens para misturar as 3 plantas, contendo os quatro tratamentos, onde: L+C+A foi utilizado 33% de cada planta, equivalente a 23,3 mL de meio extrato de macrófita, A+C, C+L e A+L, utilizou-se 50% de cada extrato de planta aquática, correspondendo a 35 mL de meio extrato de macrófita.

6.3 Crescimento da microalga, parâmetros dos meios de cultura e composição bioquímica

A densidade celular foi monitorada por 16 dias consecutivos e alíquotas de 1 mL foram removidas diariamente da cultura de microalgas em triplicata. Foi utilizada uma subamostra mínima de 2 x 1 µL⁻¹ para quantificação celular, com câmara de contagem de Neubauer. A taxa de crescimento e o tempo de duplicação foram obtidos de acordo com Guillard (1973), onde a taxa de crescimento (k, divisões por dia) foi calculada da seguinte forma:

$$k = (3,322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$$

Onde: N_2 e N_1 são o número de células nos dias t_2 e t_1 , respectivamente. O tempo de duplicação (tempo de divisão celular ou tempo de geração) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento pela fórmula:

$$TD = 1k^{-1}$$

Onde: $1k^{-1}$ é a divisão por dia. O volume celular foi calculado pelo tamanho médio das células com o uso da fórmula geométrica mais apropriada, ou melhor, da fórmula de dois cones no caso *M. gracile* (Hillebrand et al., 1999). O comprimento total de 50 espécimes foi determinado com microscópio Leica DFC 295 com sistema de análise de imagens LAS core (LAS V3.8) e objetiva micrométrica de 40X. O carbono orgânico total (COT) foi calculado por regressão seguindo Rocha e Duncan (1985):

$$COT: 0,1204 V^{1.051}$$

Onde: COT = teor de carbono orgânico total em $pg\ cell^{-1}$ e V = volume da célula.

A concentração de clorofila-a foi determinada pela extração dos pigmentos com álcool 90% e por espectrofotômetro (663 e 750 nm), seguindo metodologia de Nusch (1980). A biomassa seca foi determinada de acordo com Vollenweider (1974). A condutividade elétrica, o oxigênio dissolvido e o pH foram medidos com a sonda multisensor YSI 56 MPS. O fósforo total (TP) e o nitrogênio inorgânico total (TIN) foram quantificados por espectrofotômetro, seguindo Golterman et al. (1978) e Koroleff (1976). A biomassa de microalgas foi colhida, centrifugada e liofilizada para análise do teor de proteínas pelo método de combustão de Dumas, fornecido pela Leco (CN628). O conteúdo lipídico foi liofilizado e analisado extraindo pelo método de hidrólise ácida de Soxhlet (AOC, 2020). Os conteúdos de proteínas e lipídios foram expressos como peso seco de biomassa. A biomassa seca foi determinada de acordo com Vollenwaider (1974). As análises foram realizadas a cada 4 dias (1, 4, 8, 12 e 16 dias de crescimento).

6.4 Análise estatística dos dados

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada considerando um modelo fatorial (4X5) onde os fatores de variação foram os meios de cultura (4) para cada dia de amostragem (5) a fim de descrever o comportamento do crescimento das microalgas e as variáveis bióticas e abióticas do cultivo (Sokal e Rohlf, 1981). O teste de Tukey foi aplicado quando ocorreram

diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Os dados foram expressos como média \pm DP com RStudio. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

6.5 Composição de meios de cultura de macrófitas

As análises de macrominerais (Ca, K, Mg, N, P e S) e micronutrientes (B, Fe, Mn e Zn) dos meios de cultura foram processadas por extração dos nutrientes com ácido cítrico e neutralizadas com citrato de amônio, processadas de acordo com metodologia apresentada pelo MAPA (2007).

7. Resultados

7.1 Condições de cultivo, meios de cultura e crescimento da microalga

A densidade celular da microalga *Messastrum gracile* foi significativamente diferente entre os meios mistos estudados. No 16º dia de crescimento foi observado a maior densidade celular do experimento no meio de cultura C+L, com $163 \pm 2 \times 10^5$ cells mL⁻¹. A densidade celular de *M. gracile* no 16º dia do meio C+L comparada ao meio A+L, que foi o meio que obteve menor densidade, $57 \pm 4 \times 10^5$ cells mL⁻¹, foi aproximadamente 65% mais elevada. No meio de cultura C+L, foi observada as maiores densidades em relação aos outros meios em praticamente todos os dias de cultivo, porém o meio de L+C+A também apresentou desempenho positivo no crescimento celular, apresentando a maior densidade no 16º dia com $99 \pm 2 \times 10^5$ cells mL⁻¹ (Figura 2 e Tabela 1).

Em relação ao carbono orgânico total (COT), o maior teor foi observado no 4º dia no meio de cultura misto L+C+A, com 6 ± 3 pg cell⁻¹. A média dos teores de COT nos meios foi entre 1 ± 0 e 5 ± 0 pg cell⁻¹, e no 4º dia foi observado o maior teor para todos os meios utilizados, e os menores teores foram registrados no 8º e 12º dia também para todos os meios. No 16º dia de crescimento o aumento do teor de COT ocorreu somente no meio de cultura misto L+C+A com 3 ± 1 pg cell⁻¹ (Tabela 1).

O volume celular (VC), apresentou os maiores valores registrados no 1º e 4º dia de crescimento, e a partir do 8º dia o VC diminuiu. O 4º dia expressou os maiores valores para volume celular para todos os meios de cultura misto, contudo o meio de cultura misto L+C+A foi o maior valor do experimento, com 42 ± 22 μm^3 . Em comparação, o menor

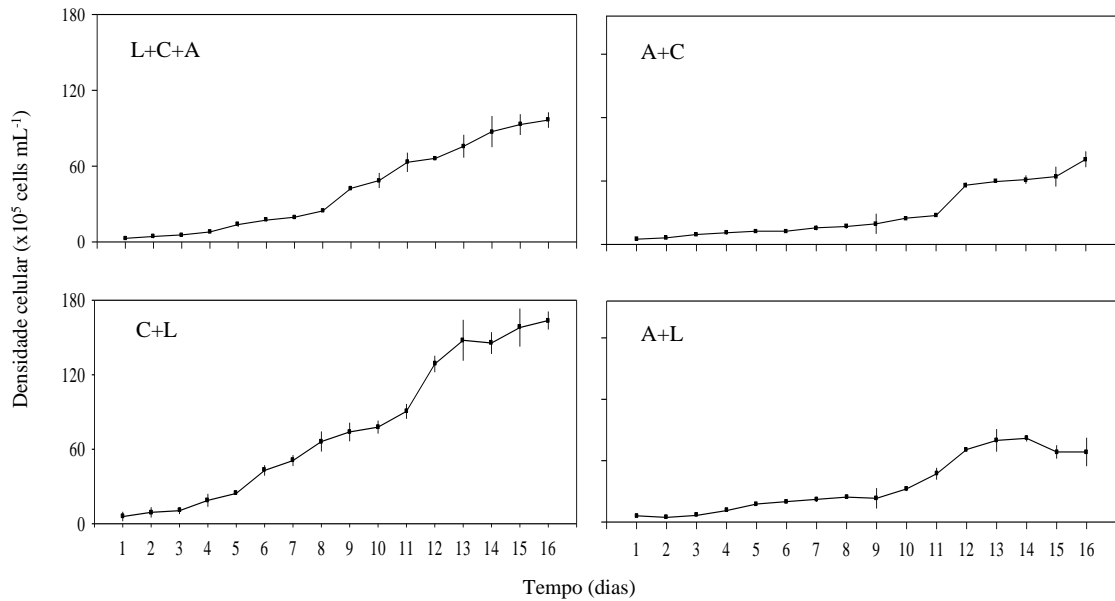


Fig 2. Curva de crescimento da microalga *Messastrum gracile* em meio de cultura misto de macrófita onde: L+C+A = *L. minor*+*E. crassipes*+*E. azurea*; A+C= *E. azurea*+*E. crassipes*; C+L = *E. crassipes*+*L. minor*; A+L = *E. azurea*+*L. minor*.

volume celular foi observado no 16^o dia no meio de cultura misto A+L, com média de $7 \pm 2 \mu\text{m}^3$ (Tabela 1).

As concentrações de clorofila-a foram mais elevadas no 16^o dia em todos os meios, com destaque para o meio de cultura misto C+L exibindo a maior concentração, com $3,2 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$. Por outro lado, o meio de cultura misto com a menor concentração de clorofila foi o meio A+L ao longo do crescimento de *M. gracile*, e no 16^o dia de cultivo, obteve a concentração de $0,3 \pm 0 \text{ g L}^{-1}$, aproximadamente 10 vezes menor do que o meio C+L (Tabela 1).

A biomassa foi significativamente diferente entre meios mistos de macrófita, onde no 16^o dia o meio de cultura C+L exibiu a maior biomassa, com $5,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, e o mesmo meio apresentou em quase todos os dias de coleta os maiores teores de biomassa. O meio de cultura misto que apresentou a menor biomassa foi A+L com $1,7 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ no 16^o dia de crescimento, cerca de 34% menor do que o maior valor do experimento (C+L) (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros dos meios de cultura, pH e condutividade variaram ao longo dos dias experimentais (Tabela 2). O menor valor encontrado para o pH foi no 16^o dia do meio de cultura misto A+L com 7 ± 0 sendo o único dia com variação relevante, enquanto os outros dias o valor do pH ficou entre 8 e 9, mostrando-se constante em todo o experimento (Tabela 2).

Tabela 1. Médias e desvio padrão das variáveis biológicas da microalga *Messastrum gracile*. Médias em cada linha seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$), ANOVA (teste) entre os meios de cultura e os dias de crescimento.

Parameters	Days	Culture media			
		L+C+A	A+C	C+L	A+L
Microalgae					
DCM	1	5 ± 0 ^j	5 ± 0 ^j	6 ± 0 ^j	5 ± 0 ^j
	4	8 ± 0 ^{ij}	9 ± 0 ^{ij}	10 ± 1 ^{ij}	9 ± 0 ^{ij}
	8	25 ± 0 ^g	14 ± 1 ^{hi}	70 ± 1 ^d	20 ± 0 ^{gh}
	12	66 ± 0 ^d	47 ± 1 ^f	131 ± 6 ^b	53 ± 5 ^{ef}
	16	99 ± 2 ^c	67 ± 2 ^d	163 ± 2 ^a	57 ± 4 ^e
K	1	-	-	-	-
	4	0,5 ± 0 ^{ab}	0,4 ± 0 ^{bc}	0,5 ± 0 ^a	0,3 ± 0 ^d
	8	0,4 ± 0 ^{bc}	0,2 ± 0 ^{de}	0,5 ± 0 ^a	0,3 ± 0 ^d
	12	0,4 ± 0 ^{bc}	0,3 ± 0 ^d	0,4 ± 0 ^{bc}	0,3 ± 0 ^d
	16	0,3 ± 0 ^{cd}	0,3 ± 0 ^d	0,3 ± 0 ^d	0,2 ± 0 ^e
TD	1	-	-	-	-
	4	2,1 ± 0,2 ^{fg}	2,3 ± 0,1 ^f	2,0 ± 0 ^g	3,4 ± 0,3 ^{cd}
	8	2,4 ± 0 ^f	3,9 ± 0,2 ^{ab}	2,0 ± 0 ^{fg}	3,5 ± 0,2 ^{cd}
	12	2,5 ± 0 ^f	3,1 ± 0,1 ^{de}	2,4 ± 0 ^f	3,2 ± 0,1 ^{de}
	16	2,9 ± 0,1 ^e	3,7 ± 0,2 ^{bc}	3,1 ± 0 ^{de}	4,3 ± 0,1 ^a
COT	1	3 ± 2 ^d	5 ± 3 ^b	2 ± 1 ^{ijk}	2 ± 1 ^{ijk}
	4	6 ± 3 ^a	2 ± 1 ^{fg}	4 ± 3 ^c	2 ± 1 ^{ghi}
	8	2 ± 1 ^{efg}	2 ± 1 ^{ghi}	2 ± 1 ^{ghij}	1 ± 0 ^{lm}
	12	2 ± 1 ^e	1 ± 1 ^{hij}	2 ± 1 ^{hij}	1 ± 1 ^{klm}
	16	3 ± 1 ^{ef}	1 ± 1 ^{kl}	2 ± 1 ^{hij}	1 ± 0 ^m
VC	1	23 ± 11 ^{bcd}	35 ± 21 ^{ab}	12 ± 5 ^{def}	11 ± 6 ^{def}
	4	42 ± 22 ^a	13 ± 7 ^{def}	28 ± 19 ^{bc}	13 ± 8 ^{def}
	8	15 ± 6 ^{cdef}	13 ± 6 ^{def}	13 ± 6 ^{def}	8 ± 3 ^f
	12	18 ± 7 ^{cdef}	10 ± 5 ^{def}	13 ± 6 ^{def}	9 ± 4 ^{ef}
	16	18 ± 5 ^{cdef}	10 ± 4 ^{cde}	12 ± 5 ^{def}	7 ± 2 ^f
Chlo-a	1	0,1 ± 0 ^j	0,1 ± 0 ^j	0,1 ± 0 ^j	0,1 ± 0 ^j
	4	0,2 ± 0 ^{hi}	0,1 ± 0 ⁱ	0,3 ± 0 ^{hi}	0,1 ± 0 ⁱ
	8	1,1 ± 0 ^{ef}	0,2 ± 0 ^{hi}	0,8 ± 0 ^g	0,2 ± 0 ^{hi}
	12	1,3 ± 0 ^d	0,9 ± 0 ^{fg}	1,6 ± 0,1 ^c	0,3 ± 0 ^{hi}
	16	2,1 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0 ^{de}	3,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0 ^h
Bio	1	0,5 ± 0,1 ^h	0,7 ± 0,2 ^{gh}	0,6 ± 0,1 ^h	0,6 ± 0,1 ^h
	4	1,1 ± 0,5 ^{efgh}	0,6 ± 0,1 ^h	0,8 ± 0,2 ^{gh}	1,0 ± 0,1 ^{fgh}
	8	1,9 ± 0,3 ^{def}	1,9 ± 0,3 ^{def}	2,0 ± 0,2 ^{def}	1,4 ± 0,3 ^{efgh}
	12	2,1 ± 0,4 ^{de}	1,4 ± 0,8 ^{efgh}	3,7 ± 0,4 ^b	1,2 ± 0,2 ^{efgh}
	16	3,4 ± 0,1 ^{bc}	2,7 ± 0,3 ^{cd}	5,0 ± 0,5 ^a	1,7 ± 0,3 ^{efg}

DCM – Densidade celular média ($\times 10^5$ cells mL⁻¹); K – Taxa específica de crescimento; TD – Tempo de duplicação (dias); COT – Carbono orgânico total (pg cell⁻¹); VC – Volume celular (μm^3); Clo-a – Clorofila (mgL⁻¹); Bio – Biomassa (mgL⁻¹); - = não analisado.

Tabela 2. Médias e desvio padrão das variáveis abióticas do meio de cultura. Médias em cada linha seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$), ANOVA (teste) entre os meios de cultura e os dias de crescimento.

Parâmetros	Dias	Meio de cultura			
		L+C+A	A+C	C+L	A+L
Meio					
pH	1	$8 \pm 0,1^{def}$	$9 \pm 0,1^{abc}$	9 ± 0^{abcd}	$8 \pm 0,1^f$
	4	$9 \pm 0,2^{cde}$	$9 \pm 0,1^{ab}$	9 ± 0^{cde}	$8 \pm 0,1^{ef}$
	8	$9 \pm 0,1^{bcde}$	9 ± 0^a	9 ± 0^{abcd}	9 ± 0^{cde}
	12	$8 \pm 0,1^{ef}$	$9 \pm 0,6^{abcd}$	$9 \pm 0,2^{cde}$	$9 \pm 0,6^a$
	16	9 ± 0^{cde}	9 ± 0^{abc}	9 ± 0^{cde}	7 ± 0^g
Cond	1	$573 \pm 0,1^{fgh}$	565 ± 12^{gh}	448 ± 13^k	563 ± 8^{hi}
	4	620 ± 28^{cde}	586 ± 9^{efgh}	515 ± 8^j	639 ± 17^{cd}
	8	604 ± 25^{defg}	616 ± 9^{cde}	524 ± 11^{ij}	756 ± 10^{ab}
	12	606 ± 12^{def}	647 ± 2^c	503 ± 2^j	707 ± 7^b
	16	632 ± 17^{cd}	641 ± 15^{cd}	511 ± 7^j	723 ± 14^{ab}

Cond – Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$).

A condutividade elétrica, foi menor no primeiro dia no meio de cultura misto C+L, com $448 \pm 13 \mu\text{S cm}^{-1}$, e ao longo do experimento, neste mesmo meio foi observado as menores concentrações para condutividade em comparação aos outros meios de cultura mistos. Em contrapartida, a maior condutividade ocorreu no meio de cultura misto A+L, com $756 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ no 8º dia de crescimento (Tabela 2).

O nitrogênio inorgânico total e o fósforo total não apresentaram grandes alterações ao longo dos dias de crescimento (Figura 3). A maior concentração foi no 16º dia do meio misto C+L com concentração de $2 \pm 0 \text{ mg L}^{-1}$ e a menor também no 16º dia no meio de cultura misto L+C+A com $1,3 \pm 0 \text{ mg L}^{-1}$. Todos os meios de cultura mistos iniciaram com praticamente o mesmo valor de nitrogênio, com poucas variações ao longo dos dias de crescimento (Figura 3).

O fósforo total foi maior no primeiro dia no meio misto L+C+A com valor de $1,5 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$, e ao longo dos dias de experimento foi absorvido pela alga, confirmando isso com a menor concentração no 16º dia com $1,4 \pm 0 \text{ mg L}^{-1}$. Porém, o menor valor de todo experimento foi observado no meio de cultura misto C+L com $1 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$, mostrando uma absorção de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ em relação ao primeiro dia de cultivo desse meio (Figura 2).

7.2 Proteína e Lipídio

Os teores de proteína (Figura 4) foram similares para os meios de cultura mistos, com o maior teor encontrado no meio de cultura L+C+A no 16º dia de cultivo, com 44,5% de

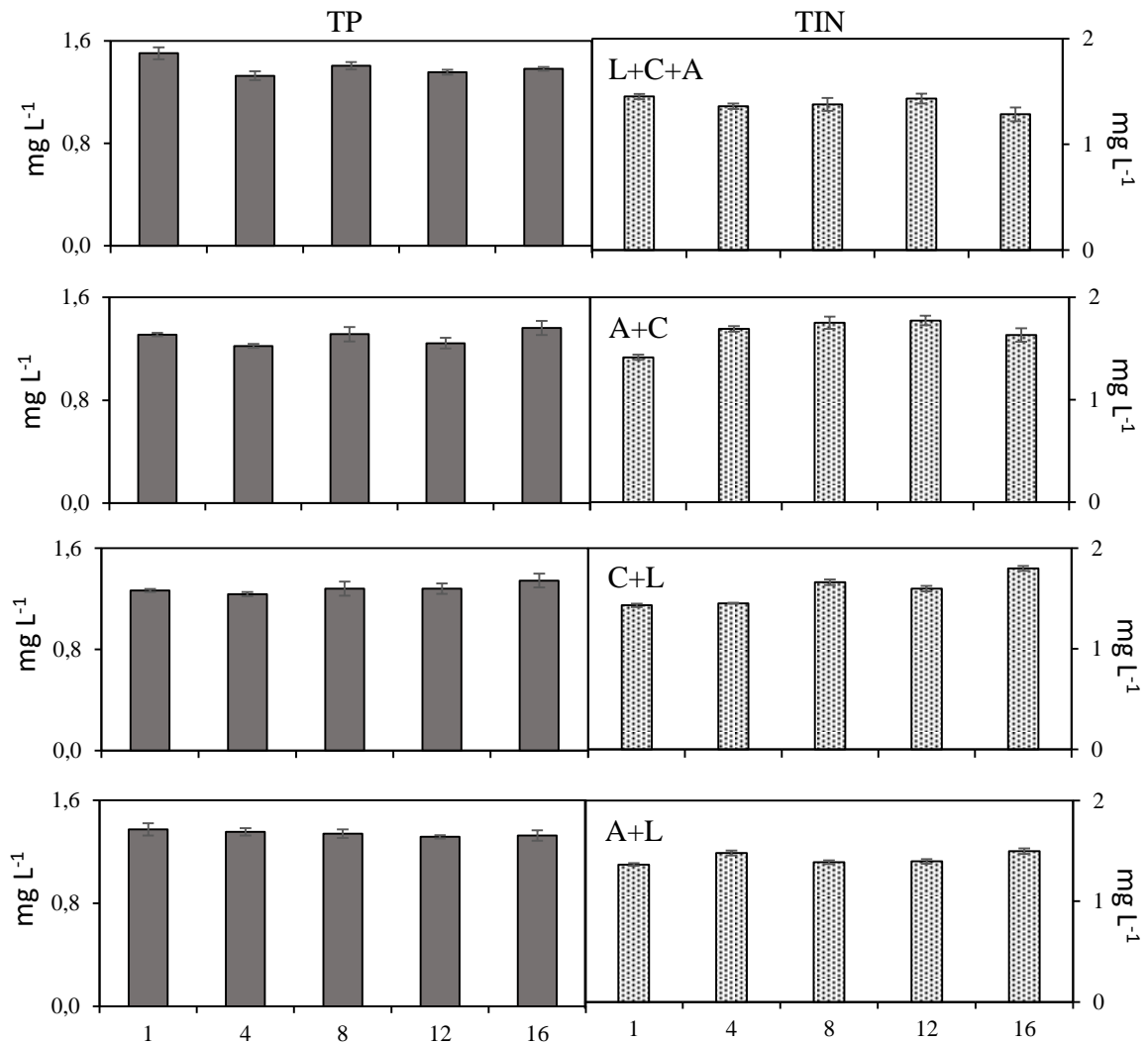


Fig 3. Conteúdo de fósforo total (TP) e nitrogênio inorgânico total (TIN) (mgL^{-1}) do meio de cultura no cultivo da microalga *Messastrum gracile* nos dias de coleta.

proteína, enquanto o menor valor foi observado no meio de cultura A+C com 31,9% de proteína no 8º dia de crescimento. Os valores de proteína apresentaram baixa variação, com alteração máxima de aproximadamente 7% de proteína e a mínima com menos de 1%, quando observado os valores obtidos no primeiro dia e no 16º de cultivo.

O lipídio apresentou valores abaixo de 10% (Figura 4), o maior valor foi observado no 16º dia do meio de cultura L+C+A com aproximadamente 9% de lipídio, e o menor valor no 4º dia do meio de cultura A+C, com 1,8% de lipídio. Ao longo dos dias de crescimento foi observado que os teores de lipídio ficaram sem muitas alterações no 8º e 12º dia de crescimento em todos os meios de cultura mistos, mostrando um resultado significativo somente no 16º dia de crescimento, com exceção para o meio de cultura A+C que apresentou uma queda neste mesmo dia de 1,5% (Figura 4).

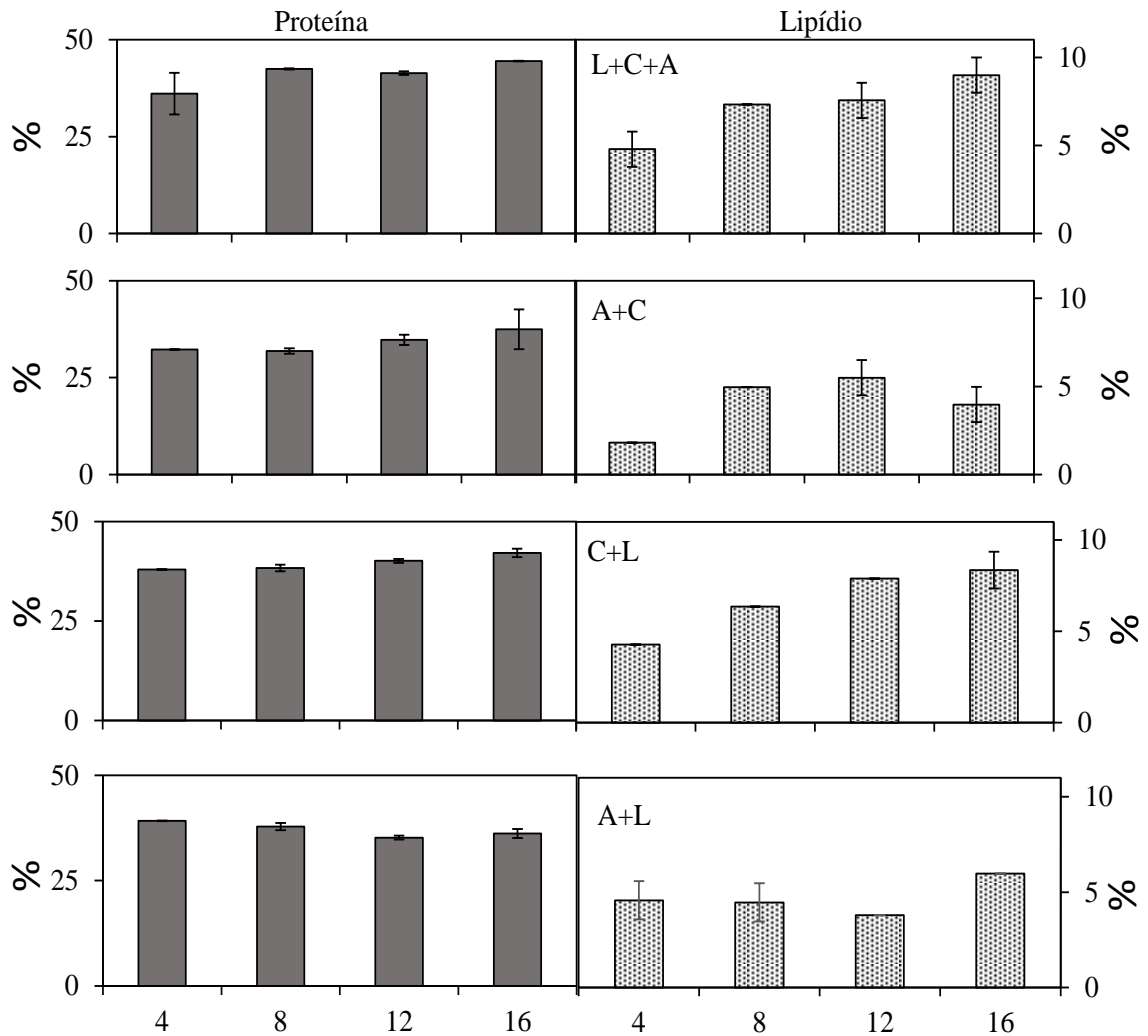


Fig 4. Conteúdo de proteína e lipídio (% de biomassa seca) da microalga *Messastrum gracile*, nos dias de coleta.

7.3 Nutrientes dos meios de cultura misto de macrófita

Os nutrientes dos meios de cultura apresentaram-se similares, com uma distribuição dos elementos presentes nas plantas, tornando os meios homogêneos entre si (Tabela 3). O elemento mais abundante em todos os meios foi o K, com a maior concentração encontrado, no meio A+C de $2,47 \text{ g L}^{-1}$ e o menor no meio C+L com $1,18 \text{ g L}^{-1}$. Os outros elementos mostraram pouca variação entre os meios avaliados. O cálcio foi o segundo maior nutriente do meio com $0,50 \text{ g L}^{-1}$ para o meio de C+L e o menor para o meio A+L com $0,35 \text{ g L}^{-1}$. Os outros macronutrientes variaram entre $0,15 \text{ g L}^{-1}$ no meio C+L e $0,22$ no meio A+C para N, e $0,07 \text{ g L}^{-1}$ no meio L+C+A e $0,09 \text{ g L}^{-1}$ para os meios C+L e A+L para o P. A consistência

Tabela 3. Composição dos nutrientes (g L^{-1}) nos meios de cultura mistos de macrófitas.

Nutrientes	Meio de cultura			
	L+C+A	A+C	C+L	A+L
N	0,20	0,22	0,15	0,19
P	0,07	0,05	0,09	0,09
K	2,12	2,47	1,18	1,99
Ca	0,42	0,46	0,50	0,35
Mg	0,18	0,19	0,19	0,17

na composição dos meios de cultura é fundamental para ter um ambiente propício ao crescimento da microalga.

8. Discussão

O meio de cultura misto de macrófitas influenciou no crescimento da microalga *M. gracile*, visto que a densidade celular apresentou valores significativos, após a fase de adaptação ao meio, demonstrando crescimento logarítmico para a alga. No meio de cultura misto com a junção das macrófitas *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor*, obteve-se densidades elevadas para todos os parâmetros de crescimento da microalga, mostrando que a combinação dos nutrientes presentes nas diferentes plantas tem vantagens de crescimento quando comparado ao meio de cultura de apenas uma macrófita.

Os meios que apresentaram melhor desenvolvimento em relação a densidade foram os meios de cultura misto L+C+A e C+L, a composição de ambos apresentou elevadas concentrações do P, Ca e Mg. Segundo Ghosh et al. (2017), os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} tem ligação direta com a absorção do P presente no meio, facilitando a absorção dos macronutrientes pela microalga, provocando o aumento da densidade celular, teor de proteína e lipídios. Por outro lado, o excesso de micronutrientes podem acarretar a acidificação do meio, prejudicando a ação enzimática da microalga e desacelerando o seu crescimento. Com isso, associa-se que os meios que apresentavam a planta *E. azurea* não apresentaram um resultado positivo com a planta associada a outras, por conta de um efeito antagônico ao crescimento causado provavelmente por excesso de algum micronutriente não detectado na análise.

O cultivo com a planta *E. azurea* pode ser prejudicado com a adição de fontes de carbono como melaço pré-tratado e alterações no tipo de cultivo utilizado como foi relatado por Tedesque et al., 2021, porém o cultivo de forma tradicional e com somente ela como base do meio de cultura, tem resultados positivos no cultivo da alga *M. gracile* (SIPAÚBA-

TAVARES, et al., 2018). Segundo Sipaúba-Tavares et al. (2019) o cultivo fototrófico apresenta resultados melhores do que quando cultivo em sistema mixotrófico, expressando valores significativamente maiores para densidade celular, clorofila e biomassa, influenciando também nos teores de lipídio e proteína presentes na *M. gracile*.

O tempo de duplicação (DT) da microalga sofre influência com os nutrientes disponíveis no meio. A duplicação celular mais rápida foi observada nos meios de cultura mistos de L+C+A e C+L, ricos em macronutrientes, mas que tem como principais nutrientes em suas composições o N e K. O potássio está presente no transporte de nutrientes para o interior da célula, sua disponibilidade no cultivo da alga é responsável por otimização da divisão celular rápida. Estudos com a microalga *Dunaliella salina* mostrou que o aumento de transportadores resultou no crescimento massivo das células da cultura em um curto período (WOYDA-PLOSZCZYCA et al., 2021).

Os parâmetros da microalga como carbono orgânico total (COT), volume celular (CV), conteúdo de clorofila-a e biomassa, seguiram a tendência da densidade e apresentaram melhores valores nos meios de cultura misto L+C+A e C+L, confirmando que sua composição química beneficiou seus resultados. De acordo com Sipaúba-Tavares et al. (2018), os resultados obtidos em relação aos parâmetros avaliados revelaram um desempenho satisfatório nos meios de cultura isolados de *E. crassipes* e *L. minor*. A presença simultânea dessas duas plantas no meio misto, com características favoráveis distintas, resultou em um significativo crescimento da microalga e na produção de seus produtos associados.

Estudos com as macrófitas *E. crassipes*, *E. azurea* e *L. minor* como meio de cultura de forma individual (SIPAÚBA – TAVARES et al., 2017, 2018, 2019, 2022) apresentaram valores iguais ou superiores ao meio de cultura comercial em relação ao crescimento da microalga e os parâmetros biológicos. A planta *L. minor* demonstrou um desempenho maior em termos de densidade celular, biomassa e teor de clorofila-a, indicando seu potencial como um meio de cultura altamente eficaz. Por outro lado, as plantas *E. crassipes* e *E. azurea* se destacaram pelo seu maior acúmulo de macronutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P), além de apresentarem maior volume celular.

O meio de macrófitas normalmente tem aceitação positiva com a alga *M. gracile*, porém quando comparado ao cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* em meio de extrato de macrófita, seu crescimento não atingiu valores próximo ao cultivo com meio comercial, como acontece com a *M. gracile*. Sua densidade celular, biomassa e clorofila foram reduzidas a metade do que normalmente é encontrado em outros meios de cultura nas

mesmas condições, levando ao entendimento que os processos metabólicos da *H. pluvialis* são prejudicados quando cultivada em meio de macrófita (SIPAÚBA- TAVARES et al., 2022).

O pH manteve-se alcalino em todos os meios, exceto no 16º dia do meio de cultura misto de A+L, com valor neutro e abaixo dos outros meios que apresentaram melhor crescimento da alga nesse mesmo dia. Um dos motivos que pode levar a redução do pH é a baixa absorção de íons pela alga, que em saturação acidifica o meio. Pesquisas com *Chlorella sorokiniana* variando o pH, mostrou que o crescimento realizado em baixo pH, tem pouco aproveitamento do CO₂, e aumento da produção de lipídio e, com pH mais elevado favorece a produção de carbono e proteína na biomassa (QIU, et al., 2017). Os elevados valores de condutividade elétrica no meio A+L, confirmam o possível excesso dos íons presentes, que também aumentam a condutividade elétrica. A acidificação do meio de A+L pode explicar a morte celular durante os dias os últimos dias de cultivo, interferindo no metabolismo da microalga.

Os meios de L+C+A e C+L demonstraram maior capacidade de absorção de nitrogênio e fósforo, ambos essenciais na produção de proteína e lipídios. Em contrapartida, os demais meios não apresentaram os mesmos resultados, mantendo-se praticamente inalterados em relação aos valores registrados no início do experimento. No estudo de Tossavainen et al. (2019) com microalgas Chlorophyceae cultivadas em águas residuais de piscicultura, a remoção de nutrientes inorgânicos como NH₄⁺ e PO₄⁺ ficaram entre 75% e 89% e 84% e 95% respectivamente, nos primeiros dias de cultivo, e proporcionando maior produção de proteína algal, que é diretamente ligada aos nutrientes disponíveis e a ambiente propício para absorção desses nutrientes pela alga. Em estudos com as plantas *E. crassipes* e *E. azurea* como meio de cultura de forma individual, foi apresentado valores indicando a rápida absorção da microalga de nutrientes presentes no meio, como nitrogênio e potássio, melhorando os parâmetros da microalga (SIPAÚBA-TAVARES, et al., 2018).

Os produtos gerados pela microalga, ou seja, a proteína e o lipídio, variaram entre 36% e 44% e 4% e 9% respectivamente no meio L+C+A e 37% e 42% e 4% e 8% para o meio de cultura misto C+L. Por outro lado, os outros meios apresentaram bons resultados para a proteína, com 31% e 37% para o meio de cultura misto A+C e 35% e 40% para o meio A+L. No entanto, os resultados para o teor de lipídios foram inferiores quando comparados aos outros dois meios, situando-se entre 1% e 5% para o meio de cultura misto A+C e 4% e 6% para o meio A+L. Sipaúba-Tavares et al. (2018) obtiveram valores semelhantes para proteína e lipídio com os meios de cultura das macrófitas *Eichhornia*

crassipes e *Eichhornia azurea*, com porcentagens próximas a 47% para proteína e 8% para lipídio. O mesmo resultado de proteína e lipídio também foi obtido por Sipaúba – Tavares et al. (2019) quando utilizados meios de cultura das macrófitas *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor*.

Os nutrientes presentes nos meios de cultura afirmaram a composição homogeneizada apresentadas pelos meios e a capacidade de ministrar as substâncias que cada planta disponibiliza, com valores semelhantes para todos os meios. O elemento de destaque foi o potássio, estudos com adição de potássio no cultivo de microalgas mostraram que o teor lipídico acumulado pelas células é maior que quando cultivado em meio pobre nesse nutriente (WANG et al., 2020). Em relação aos micronutrientes, como mencionado acima, atua diretamente na densidade celular e maior acúmulo de biomassa. A composição rica dos meios de cultura mistos, principalmente em micronutrientes, auxiliou a produção dos produtos gerados pela alga.

9. Conclusão

O presente estudo ressalta a importância do desenvolvimento de novos protocolos para meios de cultura alternativos para cultivo de microalgas com finalidade de obter maior teor de biomassa e valor nutricional. O meio de cultura misto de macrófitas proporciona a possibilidade de gestão dos compostos que podem ser complementados com a junção das plantas, suprimindo a demanda necessária que a microalga possui. Dentre os diversos meios de cultura mistos avaliados, destacaram-se os meios de L+C+A e o C+L como mais eficientes, promovendo melhor rendimento no crescimento acelerado da *M. gracile*, apresentando benefícios nutricionais da biomassa significativos e maiores teores de proteína e lipídio. Os meios que apresentavam a planta *E. azurea* associado a uma segunda planta na composição causou a morte celular antecipada, provocando alterações nos parâmetros físico-químicos, este resultado ressalta a importância da seleção cuidadosa dos componentes do meio de cultura misto para evitar os efeitos adversos. Contudo, pode-se considerar que o meio de cultura misto com macrófita *E. crassipes* e *L. minor* é viável para o cultivo de microalgas com biomassa de alta qualidade.

10. Referências

- CHAI, W. S.; TAN, W. G.; MUNAWAROH, H. S. H.; GUPTA, V. K.; HO, S. H.; SHOW, P. L. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: a review. *Environmental Pollution*, v. 269, p. 116236, 2021.
- CHEN, H.; WANG, Q. Microalgae-based green bio-manufacturing—how far from us. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 832097, 2022.
- GAO, F., YANG, Z. Y., ZHAO, Q. L., CHEN, D. Z., LI, C., LIU, M.; YANG, J.S.; LIU, J.Z.; GE Y.M.; CHEN, J. M. Mixotrophic cultivation of microalgae coupled with anaerobic hydrolysis for sustainable treatment of municipal wastewater in a hybrid system of anaerobic membrane bioreactor and membrane photobioreactor. *Bioresource Technology*, v. 337, p. 125457, 2021.
- GUILLARD, R.R.L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). *Handbook of phycolgical methods: culture methods and growth measurements*, London: Cambridge University Press, p. 289-311, 1973.
- GHOSH, M.; SHARMA, N.; GERA, M.; KIM, N.; HUYNH, D.; ZHANG, J.; MIN, T.; QIU, R.; GAO, S.; LOPEZ, P. A.; OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal research*, v. 28, p. 192-199, 2017.
- GOLTERMAN H.L.; CLYMO R.S.; OHNSTAD, M.A.M. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. Blackwell Scientific Publication, n.8, p.113, 1978.
- HASHEMIAN, M.; AHMADZADEH, H.; HOSSEINI, M.; LYON, S.; POURIANFAR, H. R. Production of microalgae-derived high-protein biomass to enhance food for animal feedstock and human consumption. In *Advanced bioprocessing for alternative fuels, biobased chemicals, and bioproducts*. Woodhead Publishing, p. 393-405, 2019.
- HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C. D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, v. 35, n. 2, p. 403-424, 1999.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In Grassnof, K. (Ed.). *Methods of seawater analysis*, Verlag Chemie, 1976.
- MAPA, S. R. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasil) Cadeia Produtiva da Agroenergia. Brasília: IICA, MAPA, SPA, 2007.
- NUSCH, E.A. Of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 14, n. 1, p. 14-36, 1980.

- QIU, R., GAO, S., LOPEZ, P. A., & OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal research*, v. 28, p. 192-199, 2017.
- ROCHA, O.; DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research*, v. 7, n. 2, p. 279-294, 1985.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; IBARRA, L.C.; FIORESI, T.B. *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyta) laboratory cultured in CHU12 and macrophyte with NPK media. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2009.
- SIPAUBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; DE ALMEIDA BERCHIELLI, F.; DE SOUZA BRAGA, F. M. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 33(3), p. 247-253, 2011.
- 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, 2017.
- SIPAÚBA-TAVARES L.H., FLORÊNCIO T., TRUZZI B.S. Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. *Brazilian Journal of Biology*, v. 78, p. 579-587, 2018.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; FENERICK, D. C.; TEDESQUE, M. G. Comparison of photoautotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) in alternative culture media. *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, p. 914-920, 2019.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., TEDESQUE, M. G., COLLA, L. C., MILLAN, R. N., & SCARDOELI-TRUZZI, B. Effect of untreated and pretreated sugarcane molasses on growth performance of *Haematococcus pluvialis* microalgae in inorganic fertilizer and macrophyte extract culture media. *Brazilian Journal of Biology*, v. 82, 2022.
- SOKAL, R.R., ROHLF F.J. *Biometry. The principles and practices on statistics in biological research*. W.H. Freeman and Company, San Francisco. p. 857, 1981.
- TEDESQUE, M. G.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) growth using sugarcane molasses-based macrophyte extract culture media. *Journal of Applied Phycology*, v. 33, n. 5, p. 2745-2754, 2021.
- TOSSAVAINEN, M.; LAHTI, K.; EDELMANN, M.; ESKOLA, R.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V.; KORVONEN, P.; OJALA, A.; ROMANTSCHUK, M. Integrated

utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. *Journal of Applied Phycology*, v. 31, p. 1753-1763, 2019.

VOLLENWEIDER, R.A. A manual on the methods for measuring primary production in aquatic environments. Oxford Blackwell Scientific Publ., p. 225, 1974.

WANG, Y.; LIU, X.; LIU, Y.; WANG, D.; XU, Q.; LI, X.; YANG, Q.; WANG, Q.; NI, B.J.; CHEN, H. Enhancement of short-chain fatty acids production from microalgae by potassium ferrate addition: feasibility, mechanisms and implications. *Bioresource Technology*, p. 124266, 2020.

WOYDA-PLOSZCZYCA, A. M., & RYBAK, A. S. How can the commercial potential of microalgae from the *Dunaliella* genus be improved? The importance of nucleotide metabolism with a focus on nucleoside diphosphate kinase (NDPK). *Algal Research*, v. 60, p. 102474, 2021.