

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

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

Mayara Galatti Tedesque

Jaboticabal, São Paulo
-2019-

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

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

Mayara Galatti Tedesque

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

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

Jaboticabal, São Paulo

-2019-

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

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

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

CDU 639.64



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

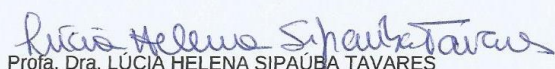
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

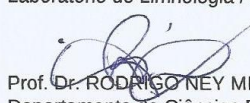
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DE MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR "IN NATURA" E HIDROLISADO
NO CULTIVO DA MICROALGA ANKISTRODESMUS GRACILIS (REINSCH)
KORSHIKOV EM MEIOS ALTERNATIVOS

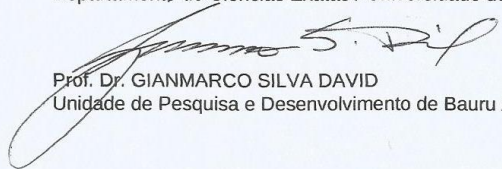
AUTORA: MAYARA GALATTI TEDESQUE

ORIENTADORA: LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES

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


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


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


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

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APOIO FINANCEIRO

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

SUMÁRIO

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REVISÃO DE LITERATURA

Importância das Microalgas

As microalgas são microrganismos presentes em todos os ambientes como água doce, salgada, salobra e solo úmido. Esses microrganismos podem ser unicelulares, filamentosos ou coloniais (GONG e JIANG, 2011). As microalgas são divididas em classes, que inicialmente foram baseadas no tipo de pigmento e posteriormente, com a microscopia eletrônica sua classificação foi baseada em aspectos de estrutura biológica e bioquímica (BEN-AMOTZ et al., 2009).

As microalgas como produtoras primárias tem a capacidade de transformar energia solar em energia biológica, tornando sua biomassa suporte de inúmeras cadeias tróficas de ambientes aquáticos (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

As microalgas realizam fotossíntese, chegando a consumir cerca de duas toneladas de CO₂ para a produção de toneladas de biomassa algal (MALLICK et al., 2012). Além disso, são responsáveis por manter o equilíbrio ecológico com elevada importância econômica, sendo fonte de alimento para microrganismos (zooplâncton) e também para larvas e alevinos de peixes, em função de seu pequeno tamanho e alto teor de ácidos graxos polisaturados (SUH et al., 2015).

Existem inúmeras variedades de espécies de microalgas de água doce e marinha cultivadas em sistema “indoor” e “outdoor”, com finalidades múltiplas seja na indústria alimentícia, de cosméticos ou mesmo na sua aplicação para tratamento de água e geração de combustíveis (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2013). As microalgas apresentam, portanto, uma ampla variedade de aplicações uma vez que assimilam os nutrientes existentes no meio de cultura, incorporando-os à sua biomassa e proporcionando um produto nutricionalmente rico (MORIOKA et al., 2014). Essa diversidade de aplicações está ligada ao fato de que as microalgas apresentam composição bioquímica diversificada, os quais variam de acordo com a espécie cultivada onde os nutrientes podem afetar a biomassa algal (CHISTI, 2007).

A maioria das microalgas apresenta teores proteicos iguais ou superiores aos vegetais convencionais. Por exemplo, *Cyanobacteria Spirulina* contém em sua biomassa cerca de 68% de proteína, aminoácidos essenciais três vezes mais elevados quando comparado a carne bovina (BECKER, 2007). Milovanovic et al. (2012) verificaram que o teor de proteína na biomassa seca de algumas cepas de *Cyanobacteria* variam de 42,8% a 76,5% na biomassa algal. Além de proteínas, as microalgas também possuem alto teor

de fibras e polissacarídeos, como ágar alginatos (PULZ e GROSS, 2004; PLAZA et al., 2008). As microalgas são ricas em fontes de vitaminas e minerais, no entanto, algumas espécies do gênero *Chlorella* contêm mais vitaminas do que plantas terrestres (BLAZENCIC, 2007). O gênero *Spirulina* contém mais β -caroteno que qualquer outro alimento, como cenouras e, mais vitamina B₁₂ em comparação aos alimentos frescos ou verduras (MOHAMMED e MOHD, 2011). Os fatores biológicos e químicos influenciam no crescimento da microalga, podendo alterar o metabolismo celular afetando a biomassa algal e consequentemente, a fotossíntese, a taxa de crescimento, a atividade metabólica e a composição celular das microalgas (HUANG et al., 2010).

Através de estudos taxonômicos as microalgas podem apresentar as seguintes formas de metabolismo: fotoautotrófico: quando a energia é obtida de fonte luminosa e o carbono de fonte inorgânica, pela fotossíntese; heterotrófico: quando a energia e o carbono são obtidos de fonte orgânica externa, em geral pela oxidação de açúcares; mixotrófico: quando a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos ocorrem concomitantemente e fotoheterotrófico: quando a fonte de energia é a luz, e a fonte de carbono são compostos orgânicos (BUMBAK et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). O uso diversificado da biomassa algal com fins biotecnológicos para a produção de substâncias específicas já é uma realidade, sendo que na aquicultura esta biomassa poderá ser um importante aditivo alimentar para os organismos aquáticos.

Descrição da Espécie de Microalga Estudada

Chlorophyceae ou algas verdes, envolvem um grupo amplo de microrganismos com enorme variabilidade morfológica. Possuem clorofila a e b e vários carotenoides, que podem ser sintetizados e acumulados fora do cloroplasto sob condições de deficiência de nitrogênio e/ou outro tipo estresse, conferindo às microalgas uma coloração laranja ou vermelha. O produto de armazenamento é o amido, composto de amilase e amilopectina, que ao contrário das outras algas, é formado no interior do cloroplasto (DANTAS, 2013).

O grupo inclui organismos cocóides, flagelados unicelulares, coloniais, filamentosas multicelulares ou multinucleados. As algas verdes são cosmopolitas principalmente, dulciaquícolas (seres que vivem em água doce), com elevado número de espécies e se desenvolvem em terras úmidas. Algumas espécies ocorrem em associações simbióticas, geralmente com líquens. A exploração comercial de algas verdes microscópicas compreende relativamente poucos gêneros da classe Chlorophyceae entre

os quais: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Botryococcus* e *Ankistrodesmus* (TOMASELLI, 2004).

O gênero *Ankistrodesmus* possui células raramente solitárias, em geral reunidas em colônias sob a forma de tufo (menos organizados) ou de feixes frouxos (mais organizados). Algumas vezes, as células se torcem espiraladamente umas sobre as outras ao formar o feixe. Não existe mucilagem para manter as células juntas. O único cloroplastídeo é parietal, localiza-se lateralmente nas células e tem a forma de lâmina pirenóides podem ou não estar presentes, variando em número de um (mais comum) a vários (raro). Essas microalgas só ocorrem solitárias em sistema de cultivo (BICUDO e MENEZES, 2006).

Classificação da microalga *Ankistrodesmus gracilis* segundo VAN-DE-HOEK et al. (1997).

Reino: Plantae

Divisão: Chlorophyta

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Sphaeropleales

Família: Oocystaceae

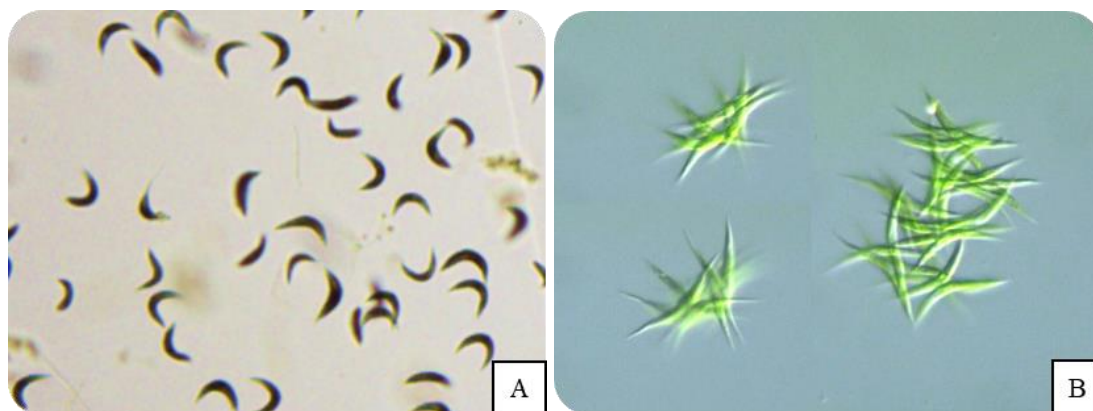
Gênero: *Ankistrodesmus*

Espécie: *Ankistrodesmus gracilis*

A microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Figura 1), pertence à classe das Chlorophyceae da ordem Chlorococcales, e no gênero *Ankistrodesmus* estão incluídas 11 espécies distribuídas em todo mundo (BICUDO e MENEZES, 2006). *Ankistrodesmus gracilis* caracteriza-se por ser unicelular imóvel, não possui flagelos de movimentação e também, não produz zoósporos; apresentando aproximadamente 17 µm de comprimento e células que possuem os formatos fusiformes, lunadas, retas ou até sigmoides, com extremidades em forma de agulhas (BOLD e WYNNE, 1985).

A microalga *A. gracilis* cresce em água doce, e muitas vezes agrega-se em pequenos grupos, mostrando-se bastante promissora como um incremento da atividade aquícola, sendo resistente ao manejo de cultivo (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999). Esta microalga faz parte do fitoplâncton de lagos e lagoas, sendo um dos gêneros mais comuns entre as algas verdes. O gênero *Ankistrodesmus* possui um verde intenso devido a clorofila a e b que mascaram os carotenóides e xantofilas (BOLD e WYENE, 1985).

Figura 1: Microalga *Ankistrodesmus gracilis* observada na objetiva de 10x em sistema de cultivo a qual se apresenta de forma solitária (A) e como é encontrada no meio ambiente (B).



Fonte: (A) Imagem do autor, (B) http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Ankistrodesmus/sp_5b.html.

A reprodução assexuada ocorre por clivagem da célula parietal em 1-16 autoesporos que são liberados pela ruptura da parede celular da célula parietal, e estágio flagelar ou reprodução sexuada são desconhecidos (GRAHAM e WILCOX, 2000).

A espécie *Ankistrodesmus gracilis* tem sido muito utilizada na alimentação de muitos organismos. Macedo e Pinto-Coelho (2008) verificaram que *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda* utilizadas na alimentação de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*, promoveram aumento no teor proteico e ótimo crescimento desses organismos zooplanctônicos.

Dentre as microalgas de água doce cultivadas, as unicelulares da classe Chlorophyceae têm sido amplamente utilizadas na alimentação de organismos planctônicos e larvas de peixes, principalmente *Ankistrodesmus gracilis* demonstrando grande aceitação, devido ao tamanho, forma, espessura da parede celular e fácil captura (HARDY e CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES e BACHION, 2002; SIPAÚBA-TAVARES e BRAGA, 2007; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2014, BERCHIELLI-MORAIS et al., 2016).

Meios de Cultura

Os nutrientes encontrados nos meios de cultura devem ser adequados para cada espécie de microalga a ser cultivada, pois elas requerem macro e/ou micronutrientes específicos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015). Um dos principais obstáculos do cultivo em massa de microalgas é o alto custo dos meios comerciais e dos reagentes químicos

necessários para a preparação de meios de cultura específicos sendo essenciais às necessidades nutricionais das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al, 1999; XU et al., 2006). Para espécies de microalgas de ambientes mais eutróficos o meio comercial CHU₁₂ contém uma variedade de macro e micronutrientes e, o fertilizante inorgânico NPK-20:5:20 vem sendo utilizado com frequência no cultivo de *A. gracilis* não só pelo baixo custo mas também, pela presença dos nutrientes essenciais ao crescimento desta microalga como nitrogênio, fósforo e potássio (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018a).

O nitrogênio é um elemento importante para as microalgas, sendo constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário como proteínas e material genético e fundamental para a vida destes microrganismos. Este nutriente tem grande benefício no aumento das concentrações proteicas, carotenoides e clorofila-*a*. Se o fornecimento de nitrogênio é limitado em proporção a outros elementos, a fotossíntese pode continuar, mas os compostos resultantes incluirão uma proporção menor de componentes ricos em nitrogênio, pigmentos acessórios como carotenoides e componentes mais ricos em energia, como lipídios (SHEEHAN et al., 1998; BENAVENTE-VALDÉS et al., 2016).

O fósforo participa de todos os processos de trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais para o crescimento celular (LOURENÇO, 2006; QU et al., 2008). Este composto é considerado o nutriente com maior probabilidade de limitar a produção do fitoplâncton e, o principal elemento da célula que desempenha um papel crítico na produção de ATP para o metabolismo de ácidos nucleicos, na biossíntese de fosfolipídios e produção de outros componentes celulares. O ortofosfato inorgânico na célula regula atividade enzimática e vias metabólicas bem como, os processos de transporte afetando vários aspectos da fotossíntese (MIMURA, 1995; DIETZ e HARRIS, 1997).

O potássio, é o mineral catiônico mais abundante entre os constituintes das microalgas, presente como íon livre (K^+) em altas concentrações, o que torna o maior agente osmótico catiônico, junto com concentrações equivalentes de ânions inorgânicos e orgânicos. As funções específicas do potássio requerem apenas uma pequena fração da concentração total encontrada nas microalgas. Essas funções estão relacionadas a ativação de enzimas, a participação no transporte por meio de membranas, a neutralização de ânions e a manutenção do potencial osmótico das microalgas (BICUDO e MENEZES, 2006). Para que haja um crescimento adequado e elevado teor proteico das microalgas, o sistema de cultivo deve fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento e

síntese celular (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001). O crescimento das microalgas é derivado de diversas reações químicas e interações biológicas, entre elas as condições biológicas da cepa, a temperatura, agitação e a concentração de nutrientes que contribuem para o desenvolvimento do cultivo e elevada biomassa algal (SIPAÚBA-TAVARES, et al., 2009).

Macrófitas: Aplicação na Aquicultura e Utilização Como Meio de Cultura

As macrófitas aquáticas se originam de plantas terrestres que sofreram alterações adaptativas colonizando ambientes aquáticos, classificadas como submersas, emergentes e flutuantes. Essas plantas se proliferam de forma indesejada exigindo técnicas de controle (ESTEVES, 1998). Na aquicultura as macrófitas crescem de forma desordenada e muitas vezes tornando-se prejudicial ao cultivo de peixe, pois os tanques de piscicultura são ricos em N e P elementos essenciais aos produtores primários. Como os tanques de piscicultura não são poluídos e sim eutróficos, o aproveitamento destas plantas, como meio de cultura para a microalga *A. gracilis* tem promovido elevada biomassa, alto valor nutricional com baixo custo de produção (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2015, 2018a). As macrófitas aquáticas são definidas como vegetais visíveis a olho nu, com partes fotossintetizantes ativas e suas principais características são: acumular biomassa; acelerar a ciclagem de nutrientes; atuar como substrato para perifiton; sustentar a cadeia de detritos e herbívora; fornecer oxigênio; oferecer alimento e abrigo para a vida aquática (MARCONDES et al., 2002).

A plantas aquáticas são produtoras primárias, absorvendo os nutrientes para a incorporação à sua biomassa. Muitas macrófitas removem mais nutrientes do que necessitam ajudando no controle destes elementos químicos e melhorando a qualidade de água em piscicultura. Além disso, comunidades associadas às plantas, atuam de forma conjunta e harmônica no metabolismo do ecossistema (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015). O fósforo e nitrogênio, têm papel fundamental na composição de moléculas que atuam em processos metabólicos constituinte de proteínas e ligados ao armazenamento de energia da célula (ATP) (SALISBURY e ROSS, 1992; LARCHER, 2000). A disponibilidade de nitrogênio e fósforo é considerada um dos principais fatores que controla a ocorrência e a produção primária das macrófitas aquáticas (VAN et al., 1999).

O gênero *Eichhornia* possui apenas 6 espécies, dentre elas a *Eichhornia crassipes*, (Figura 2) conhecida como aguapé. É uma planta flutuante, com capacidade de armazenar nutrientes além do necessário, contém elementos químicos que são utilizados para o seu

desenvolvimento (DENÍCULI et al., 2000). *Eichhornia crassipes* pode dobrar de peso rapidamente e alcançar uma produtividade de 150 toneladas/hectare/ano (WESTLAKE, 1963) (Figura 2). Esta planta aquática é encontrada em represas, lagos ou viveiros de piscicultura, apresentando elevado valor proteico e lipídico essenciais para o crescimento de microalgas. O sistema radicular de *E. crassipes*, funciona como um filtro, retirando o material particulado da água e armazenando para seu metabolismo (POTT e POTT, 2000). A *E. crassipes*, pode ser excelente fonte de aminoácidos, vitaminas e minerais na dieta alimentar de muitos organismos (WOLVERTON e McDONALD, 1979); no caso do excesso de biomassa vegetal esta planta pode ser aproveitada na produção de papel (MORTON, 1975), na produção de biogás (WOLVERTON e McDONALD, 1979) e atualmente, na produção de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

Figura 2: Macrófita *Eichhornia crassipes*.



Fonte: Imagem do autor

Outra espécie deste gênero, *E. azurea* (Sw.) Kunth (Figura 3), é flutuante e ocorre em represas, lagos ou viveiros de piscicultura (THOMAZ e BINI, 2003). *Eichhornia. azurea* também pode ser usada como fonte de alimento para capivaras, suínos e outros herbívoros, suas flores são vistosas muito visitadas por vários insetos atingindo uma altura de até 70 centímetros (POTT e POTT, 2000). Segundo Moretti et al. (2003), esta macrófita associa-se à macroinvertebrados que ficam distribuídos entre seus ramos ou em sua área de superfície foliar e, na indústria, esta planta aquática pode ser utilizada como tapete, corda e afins (BARKO; SMART, 1980; POTT; POTT, 2000).

As plantas do gênero *Eichhornia* estão espalhadas em águas de mais de 50 países distribuídos pelo mundo com invasão rápida, afetam recursos hídricos obstruindo o fluxo de água das navegações e podem causar problemas na geração de energia. No entanto

possuem muitas vantagens pois são utilizadas em tratamentos de águas residuais, na agricultura e horticultura como fertilizante, e, na produção de biogás (NESIC e JOVANOVIC, 1996; PATEL, 2012).

Figura 3: Macrófita *Eichhornia azurea*.



Fonte: Imagem do autor

Salvinia auriculata é uma Pteridophyta da família Salviniaceae da ordem Hydropteridales, o gênero *Salvinia* apresenta dez espécies. Sua estrutura consiste de folhas livres flutuantes, o rizoma é horizontal facilitando à planta manter-se na superfície (BEYRUTH, 1992) (Figura 4).

Figura 4: Macrófita *Salvinia auriculata*.



Fonte: Imagem do autor

S. auriculata cresce na superfície da água em um curto espaço de tempo, apresentando amplo compartilhamento geográfico, sendo considerada uma espécie

indesejada por se disseminar rapidamente em muitos ecossistemas aquáticos (HENRY-SILVA e CAMARGO, 2006; WOLFF et al., 2012). Também são utilizadas como bioindicadoras de poluição em ecossistemas aquáticos devido à alta taxa de crescimento e grande sensibilidade aos agentes tóxicos (WOLFF et al., 2012). Essa planta tem a capacidade de absorver substâncias inorgânicas no corpo d'água, podendo ser encontrada em todo país (WOLFF et al., 2009). A macrófita *S. auriculata* Aublet (Figura 4) possui vida livre e flutuante, muito comum em água doce, com tempo reduzido de crescimento colonizando extensas superfícies de água e proliferando rapidamente. *S. auriculata* tem grande importância como biofertilizante em hortas e pomares, sendo capaz de remover e acumular metais pesados (JOYCE, 1990; AMARAL e BITTRICH, 2002; HENRY-SILVA e CAMARGO, 2006).

A família Lemnaceae, conhecida como família das lentilhas d'água consiste em 38 espécies que são classificadas em cinco gêneros *Spirodela*, *Londoltia*, *Wolffia*, *Wolffiella* e *Lemna* (WANG et al., 2012). De flutuação livre e rápido crescimento a macrófita *Lemna minor* adapta-se facilmente aos ambientes de água estagnadas ou com fluxo lento, é pequena com aproximadamente 2 a 4 mm de comprimento e 2 mm de largura, considerada uma das menores espécies de angiospermas existente no reino vegetal (POTT e CERVI, 1999; MOVAFEGHI et al., 2013; KHATAEE et al., 2012). Por ser de pequeno porte a *Lemna* tem capacidade de sobreviver vários dias em solos úmidos (POTT e POTT, 2000) (Figura 5).

Figura 5: Macrófita *Lemna minor*.



Fonte: Imagem do autor

A macrófita *L. minor* possui altas concentrações de proteínas e baixo teor de fibra assim sendo, é considerada excelente fonte de forragem (BEKCAN et al., 2009), esta macrófita também é utilizada em ensaios ecotoxicológicos uma vez que possui grande

potencial de bioindicador, sendo um dos primeiros organismos atingidos por poluentes lançados nos ambientes aquáticos (OECD, 2002).

Assim como a *Lemna*, a *Azolla filiculoides* (Figura 6), enriquece o ambiente com nitrogênio, e está associada com a espécie de Cyanobacteria, *Anabaena azollae*, que vive em simbiose nas cavidades dos lobos foliares, além de servir de adubo e de forragem. Também está associada ao controle de mosquitos e na purificação da água. Essas plantas aquáticas são características de águas calmas, normalmente não crescem em águas ácidas e pobres em fósforo; com crescimento é rápido podendo duplicar-se a cada 3-6 dias cobrindo rapidamente a superfície da água (KISSMANN e GROTH, 1995; KRAMER, 1974; POTT e POTT, 2000). A *Azolla* é rica em micronutrientes e minerais, e considerada uma fonte rica em proteínas e aminoácidos (PARASHURAMULU et al., 2013). Segundo Gouri et al. (2012), a *Azolla* pode ser utilizada como fonte de alimento para bovinos, ovinos, suínos, coelhos e peixes, devido ao alto teor de nutrientes.

Figura 6: Macrófita *Azolla filiculoides*



Fonte: Imagem do autor

Melaço da Cana-de-Açúcar

O melaço de cana-de-açúcar é uma matéria prima que apresenta em sua composição alto teor de carbono e baixo custo principalmente, nos países produtores desta matéria prima, como o Brasil (LEE e KIM, 2001; LAZARIDOU et al., 2002; JIMÉNEZ et al., 2003). O uso de melaço de cana-de-açúcar no cultivo de microalgas em sistema mixotrófico possibilita que o CO₂ e o carbono orgânico sejam assimilados simultaneamente, promovendo o aumento na produção de algumas espécies de microalgas (ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Nos cultivos de microalgas o carbono é considerado de grande importância como macronutrientes, uma vez que, constitui 50% de sua biomassa e está sempre disponível no ambiente nas formas de dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) ou carbonato (CO_3^{2-}). O CO_2 é a fonte preferida das microalgas, uma vez que se difunde rapidamente da água para o interior celular, usado nos processos de fixação (RAVEN, 1988). Microalgas autotróficas usam carbono inorgânico e produzem hidroxila como um metabólito, resultando no aumento de pH, enquanto microalgas heterotróficas usam carbono orgânico e produzem CO_2 , resultando em diminuição do pH. Microalgas mixotróficas usam simultaneamente carbono inorgânicos e orgânicos e produzem hidroxila e CO_2 como metabólitos com constante variação do pH (KIM et al., 2013).

A vantagem para a microalga neste tipo de crescimento é o uso do carbono como fonte de energia na ausência de luz, evitando problema associado à limitação de luz como também, maior produção de lipídio. No entanto, nem todas as espécies conseguem se desenvolver neste tipo de condição (HUANG et al., 2010). Ainda que a principal fonte de carbono seja o dióxido de carbono, vários estudos mostram que microalgas podem crescer em diversas fontes de compostos orgânicos como glicose, acetato, lactato, aminoácidos, dentre outros (RICHMOND, 1990). As principais fontes de carbono usadas para o crescimento das microalgas são carboidratos e ácidos orgânicos (LIANG, et al., 2009), destacando-se a glicose, o acetato (ácido acético) e o glicerol, como por exemplo o amido de mandioca (WEI et al., 2009). O processo fotossintético é a principal fonte de energia, apesar de que alguns organismos são capazes de assimilar compostos orgânicos como fonte de carbono, utilizando estas fontes como doador de elétrons (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Como fonte de carbono orgânico, os açúcares são os substratos mais utilizados nos cultivos mixotróficos de microalgas. No crescimento de *Tetraselmis suecica*, Radmann (2011), utilizou extrato de levedura, glicose e peptona como fonte de carbono orgânico, observando melhora significativa no crescimento desta microalga, superando em três vezes os dados obtidos sem a adição de fontes de carbono. A hidrólise é uma reação orgânica e inorgânica em que se efetua dupla troca com outro composto envolvendo a quebra de uma molécula com ajuda de um agente.

O cultivo mixotrófico com melaço de cana de açúcar é uma combinação entre condições autotróficas e heterotróficas, onde pode ser empregada luz e compostos orgânicos como fonte de energia (ANDRULEVICIUTE et al., 2014). O melaço da cana-

de-açúcar é um resíduo do processo de cristalização da fabricação do açúcar, e tem sido muito utilizado na cultura de leveduras para alimentação de animais e na produção de álcool, principalmente o etanol (MELO, 2003).

Este resíduo industrial possui cerca de 50% das proporções de açúcares totais (principalmente sacarose, glicose e frutose), água, proteína bruta e gordura (JIANG et al., 2009). Após o tratamento químico de fermentação, o melaço apresenta resultados notáveis como fonte de carbono em culturas heterotróficas e/ou mixotróficas de microrganismos, em função das vitaminas e minerais presentes, tais como nitrogênio, fosfato, cálcio, magnésio, zinco, manganês, carbono, cobre e ferro (YAN et al., 2011; MANTOVAN, et al., 2013).

Algumas espécies de microalgas com resultados satisfatórios em cultivo mixotrófico são *Chlorella vulgaris* (MITRA et al., 2012), *C. sorokiniana* (WANG et al., 2012), *C. zofingiensis* (LIU et al., 2011), *Haematococcus pluvialis* (KOBAYASHI et al., 1992), *Spirulina platensis* (MARQUEZ et al., 1993) e *Botryococcus braunii* (ZHANG et al., 2011). Muliterno et al. (2005) verificaram que o cultivo de *Spirulina platensis* a partir da adição de glicose concentrada (180 g L^{-1}) como fonte de carbono em cultivo mixotrófico nas concentrações de 0,5 a $1,0 \text{ g L}^{-1}$, obteve uma biomassa de $5,38 \text{ g L}^{-1}$. Enquanto que Andrade e Costa (2007) utilizando uma iluminação de 3.500 lux e melaço de cana-de-açúcar na concentração de $0,75 \text{ g L}^{-1}$ no crescimento de *S. platensis*, alcançou uma biomassa de $2,9 \text{ g L}^{-1}$.

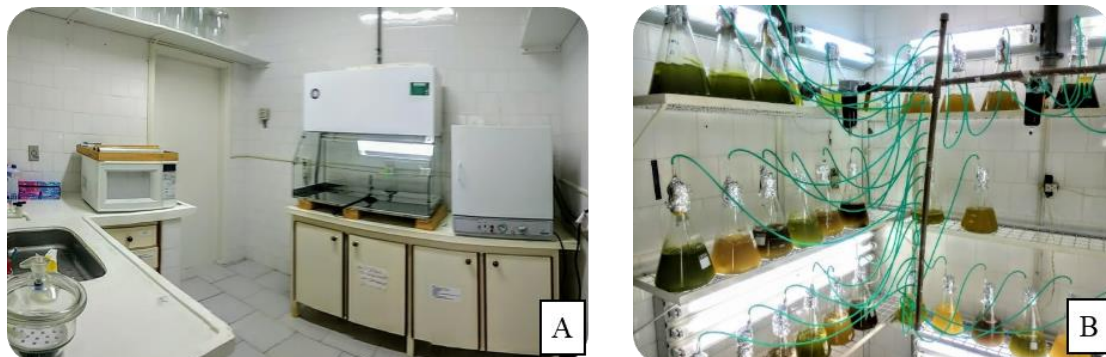
Descrição do Local de Cultivo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP. O laboratório é dividido em dois setores: um de análise química e outro de produção de microalgas, o setor de produção de microalgas conta com uma área total de $28,43 \text{ m}^2$, contendo uma sala de assepsia e uma sala de cepário, onde os experimentos foram realizados e as culturas de microalgas são mantidas (Figura 7).

O cepário possui pisos de cerâmica de cor gelo e as paredes são revestidas por azulejos brancos, contendo prateleiras de estrutura vazada, permitindo a máxima passagem de luz ao cultivo das microalgas. A iluminação do local é composta por lâmpadas fluorescentes, em toda a sala para que a iluminação é bem distribuída no ambiente, atingindo todos os ângulos do cepário. A temperatura é mantida de forma

constante por um ar condicionado e a aeração é fornecida por um sistema artificial de compressores e filtros de ar, diminuindo o risco de contaminação das culturas.

Figura 7: Sala de assepsia (A) e de cultivo de microalgas (B).



Fonte: Imagem do autor

A captação de água para o laboratório é proveniente de nascentes, localizadas na parte superior do Caunesp. Após a captação a água é armazenada em um reservatório de fibra de vidro que atua como um tanque de decantação de particulados sólidos e, posteriormente, a água passa por um sistema de dupla filtração através de filtros CUNO (5 e 1 μm) para a retenção de partículas contidas na água, seguindo para o laboratório por tubulação de PVC para evitar possíveis contaminações.

Descrição do Preparo dos Meios de Cultura

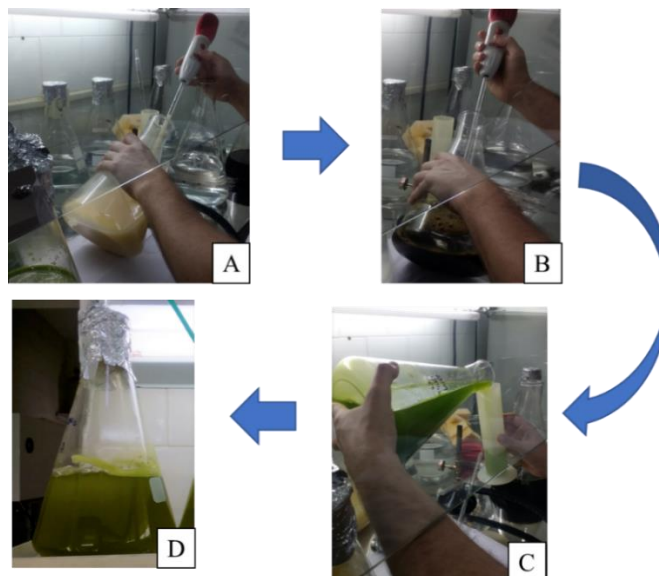
Sete meios de cultura foram utilizados nos experimentos: o meio comercial CHU₁₂, o fertilizante inorgânico NPK (20:5:20) e cinco meios de macrófitas com as plantas: *Azolla filiculoides*, *Eichhornia azurea*, *Eichhornia crassipes*, *Lemna minor* e *Salvinia auriculata*. Os meios CHU₁₂ e NPK (20:5:20) (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993) foram utilizados como fator de comparação. Em todos os cultivos mixotróficos foi adicionado 21 mL de melaço de cana-de-açúcar.

O meio de cultura CHU₁₂ é um meio comercial preparado à base de vários reagentes químicos: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , Na_2CO_3 , K_2SiO_3 . Para o preparo do meio CHU₁₂ os ingredientes foram diluídos em 1-L de água destilada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

Para o cultivo mixotrófico da microalga *A. gracilis* 10 mL do meio CHU₁₂ foi adicionado em 1,4 L de H₂O destilada autoclavada (Figura 8A), 21 mL do melaço de cana-de-açúcar (Figura 8B) e 190 mL do inóculo da microalga (Figura 8C), após este processo a microalga foi cultivada durante 28 dias.

O meio NPK (20:5:20) é um fertilizante químico composto por ureia (fonte de nitrogênio), super-fosfato simples (fonte de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio).

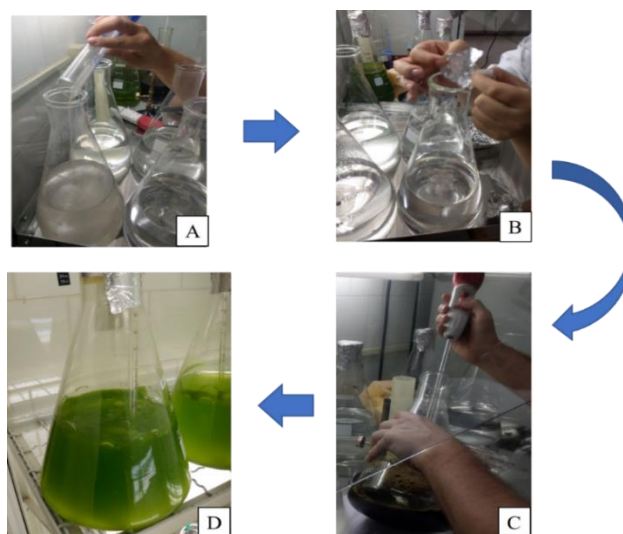
Figura 8: Preparo do meio de cultura CHU₁₂ em cultivo mixotrófico.



Fonte: Imagem do autor

Para o preparo do meio de cultura NPK primeiramente 70 g de fertilizante químico NPK (20:5:20) foi triturado e diluído em 1-L de água destilada e o produto foi autoclavado a 120°C durante 20 minutos (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001). Depois de esterilizado, 40 mL do meio foi adicionado em 1,4 L de H₂O destilada autoclavada e acrescentado 0,02 g de complexo vitamínico B (Figura 9 A e B), mais 21 mL do melaço de cana-de-açúcar (Figura 9C) e inóculo da microalga *A. gracilis* (190 mL) (Figura 9D).

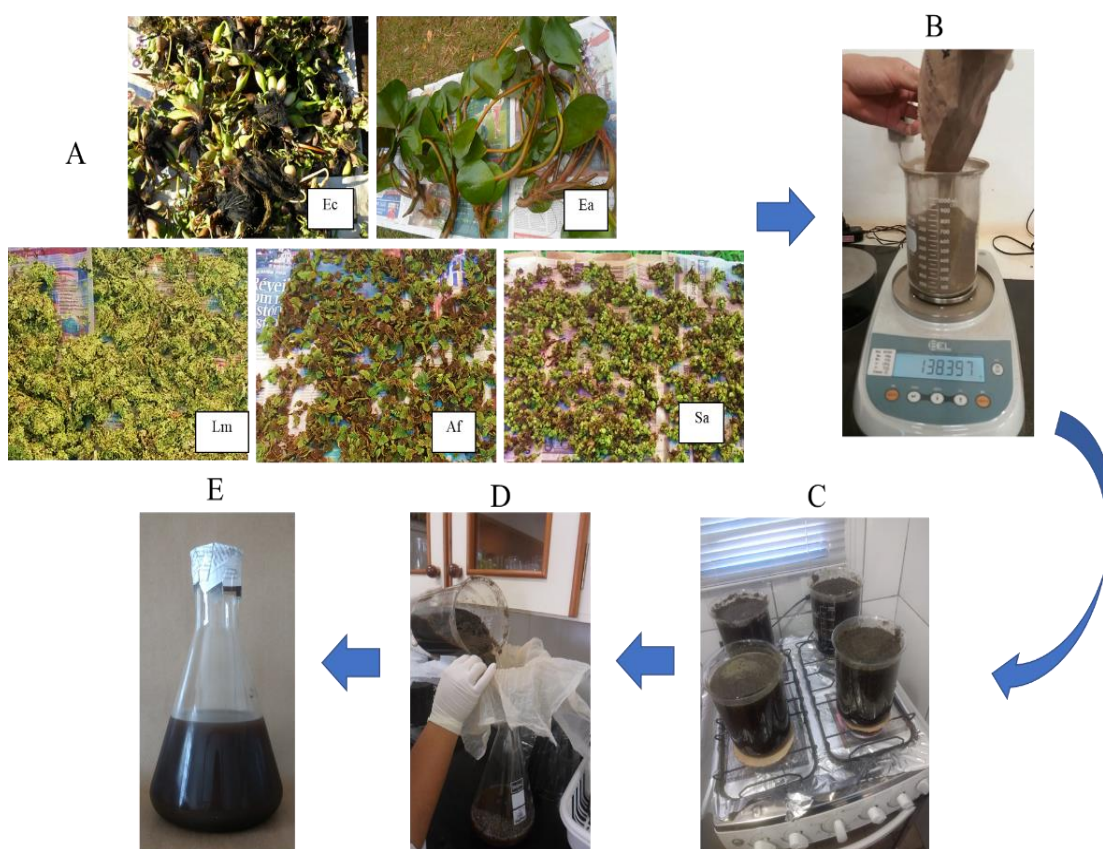
Figura 9: Preparo do fertilizante inorgânico NPK em cultivo mixotrófico.



Fonte: Imagem do autor

Os meios de macrófitas foram baseados nos estudos de SIPAÚBA-TAVARES et al. (2009), onde 5 kg de cada planta foram secos e triturados (Figura 10A e B) Posteriormente, o material foi fervido em um litro de água destilada por meia hora (Figura C) após um leve resfriamento foi filtrado em uma malha para a retirada das partículas sólidas e finalmente, autoclavada a 120°C durante 20 minutos (Figura 10 D e E).

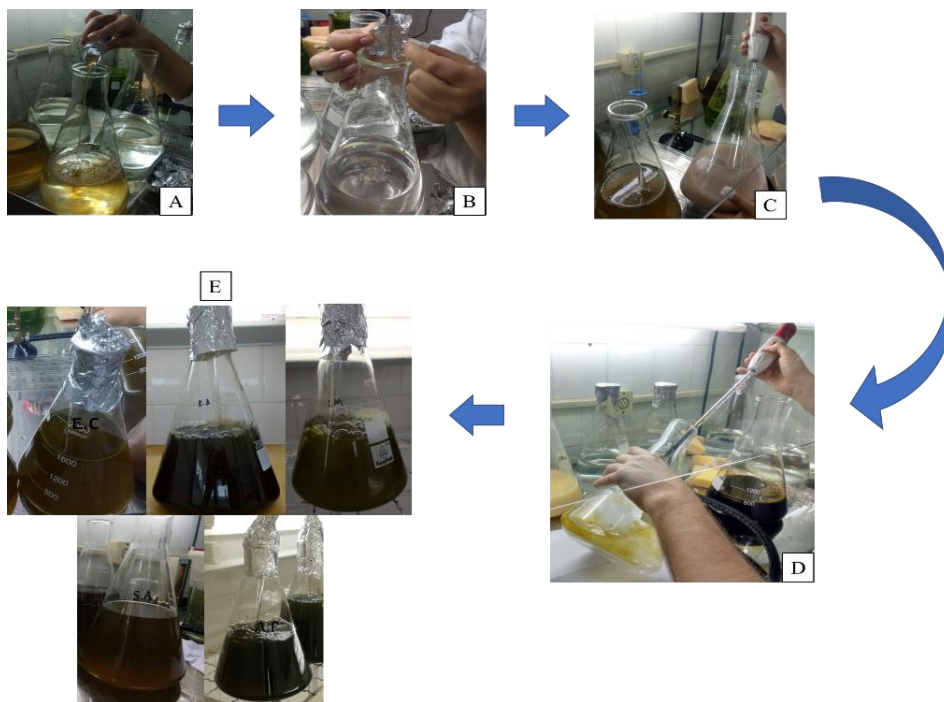
Figura 10: Metodologia do preparo dos meios de macrófitas A= plantas utilizadas (plantas secando ao ar livre); B = macrófita triturada; C = macrófita sendo fervido em água destilada; D = filtração do meio; E = meio pronto para uso.



Fonte: Imagem do autor

Posteriormente, para o cultivo mixotrófico da microalga, 70 mL deste material foi adicionado a 1,4 L⁻¹ de H₂O destilada autoclavada (Figura 11A); acrescentando também, mais 0,02 g do complexo vitamínico B (Figura 12B), 2,5 mL de meio NPK (20:5:20) (Figura 11C); 21 mL do melaço de cana-de-açúcar (Figura 11D) e 190 mL de inóculo da microalga *A. gracilis* (Figura 11E).

A Figura 12 apresenta uma vista panorâmica do cepário onde foram mantidos os cultivos de *A. gracilis* em erlenmeyer de 2 L nos diferentes meios de cultura.

Figura 11: Preparo do experimento com meios de macrófitas em cultivo mixotrófico.

Fonte: Imagem do autor

Figura 12: Imagem panorâmica do cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em diferentes meios de cultura na sala denominada de cepário, local onde fica armazenadas as cepas das microalgas.

Fonte: Imagem do autor

Para realização do experimento em condições mixotróficas, o melaço de cana-de-açúcar foi adicionado de forma “in natura” e hidrolisado (diluído em 0,4% de solução de HCl) como fonte alternativa de carbono (Figura 13).

Figura 13: Esquema do preparo da solução de melaço “in natura” e hidrolisado utilizado no cultivo mixotrófico.



Para a utilização do melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico, primeiramente foi realizado um teste piloto onde foram avaliadas várias concentrações do melaço para a escolha da melhor concentração. Este teste foi realizado em meio de cultura CHU₁₂ com melaço “in natura”, com duração de 15 dias. Dentre as cinco concentrações testadas (0,5-1,0-1,5-2,0-2,5 g L⁻¹) a que alcançou a maior densidade celular foi de 1,5 g L⁻¹. Assim, para a obtenção da concentração de 1,5 g L⁻¹ em 1,4 L de H₂O destilada foi adicionado 21 mL do melaço de cana-de-açúcar no cultivo da microalga.

OBJETIVOS

1- Avaliar o potencial do melaço de cana-de-açúcar “in natura” e hidrolisado como fonte de carbono orgânico no cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em meios de cultura de macrófitas, NPK e CHU₁₂.

2- Verificar qual meio de cultura associado ao melaço é mais adequado para o desenvolvimento e crescimento de *A. gracilis*.

3- Verificar se o uso do melaço de cana-de-açúcar (cultivo mixotrófico) apresenta resultados de teores de lipídio e proteína adequados para esta *A. gracilis*.

4- Comparar o cultivo autotrófico e mixotrófico avaliando qual a melhor forma de cultivo para uma elevada biomassa e os melhores parâmetros físicos e químicos para *Ankistrodesmus gracilis*.

As hipóteses são:

1- O cultivo mixotrófico apresenta condições necessárias para o crescimento da microalga quando comparado ao autotrófico;

2- *A. gracilis* terá maior rendimento em cultivo mixotrófico hidrolisado ou “in natura”;

3- O uso de melaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico é viável para o cultivo de *A. gracilis*.

4- A microalga *A. gracilis* apresentara mais lipídio em cultivo autotrófico ou mixotrófico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M.C.E.; BITTRICH, V. **Laguinhos - Mini-ecossistemas para escolas e jardins**. Ribeirão Preto: Ed. Holos. 2002.

ANDRADE, M.R.; COSTA, J.A. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1 - 4, p. 130 - 134, 2007.

ANDRULEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V; GUMBYTE, M. Biomass and oil content of *Chlorella sp.*, *Haematococcus sp.*, *Nannochloopsis sp.* and *Scenedesmus sp.* under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 83 - 90, 2014.

BARKO, J.W.; SMART, R.M. Mobilization of sediment phosphorus by submersed freshwater macrophytes. **Freshwater Biology**, v. 10, n.3, p. 229 - 38, 1980.

BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. A manual on the cultivation and processing of algae as a source of single cell protein. **Algae Project**, p. 5 - 35, 1971.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advence**, v. 25, n. 2, p. 207 - 210, 2007.

BEKCAN, S.; ATAR, H.H.; BEYAZ, A. Measurement of the effects of liquid fertilizers at the different levels on duckweed (*Lemna minor*) growth using image analysis technique. **Biotechnol & Biotechnological Equipmente**, v. 23, n. 2, p. 1205 - 1209, 2009.

BENAVENTE-VALDÉS, J.R.; AGUILAR, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 117 - 125, 2016.

BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J.; RAO D. A Alga *Dunaliella*: Biodiversidade, Fisiologia, Genômica e Biotecnologia. **Editores de Ciência**. p. 45 - 147, 2009.

BERCHIELLI-MORAIS, F.A.; FERNANDES, J.B.K.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration

of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882). *Aquaculture research*, v. 47, n. 10, p. 3061-3069, 2016.

BEYRUTH, Z. Macrófitas aquáticas de um lago marginal ao rio Embu-Mirim, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 272 - 282, 1992.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições**, Rima, 2006.

BLAZENCIC, J. **Sistematika algi. Beograd**: NNK Internacional. 2007.

BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. **Introduction to the Algae**. p. 720. 1985

BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S. end KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 31 – 46, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advence**, 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.

DANTAS, M.D.M. Atividade biológicas das preparações obtidas das clorófitas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Tese de Doutorado em Ciência Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, p-127, 2013.

DENÍCULI, W.; OLIVEIRA, R.A.; ITABORAHY, C.R.; CECON, P. R. Uso de aguapé na redução de sólidos totais de águas residuárias da suinocultura. **Engenharia na Agricultura**, v. 8, n. 1, p. 38 - 53. 2000.

DIETZ, K.J.; HARRIS, G.C. Photosynthesis under nutrient deficiency, in: M. Pessarakli (Ed.), Handbook of Photosynthesis, Marcel Dekker Inc., New York. p. 951 - 975 1997.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: FINEP/Interciência, p. 575, 1998.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 7, p. 1269 - 1284, 2011.

GOURI, M.D.; SANGANAL, J.S.; GOPINATH, C.R.; KALIBAVI, C.M.; Importance of azolla as a sustainable feed for livestock and poultry-a review. **Agricultural Reviews**, v. 33, n. 2, p. 93 - 103, 2012.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae. Prentice Hall**. Upper Saddle River, New Jersey, USA, 2000.

HARDY, E.R.; CASTRO, J.G.D. Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. **Acta amazônica**, v. 30, n. 1, p. 39 – 49, 2000.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 21 - 28, 2006.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, 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, p. 5 - 9, 2007.

JIANG, L.; WANG, J.; LIANG, S.; WANG, X.; CEN, P.; XU, Z. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3403 - 3409, 2009.

JIMÉNEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. Anaerobic–aerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. **Process Biochem**, v. 38, n. 9, p. 1275 - 1284, 2003.

JOYCE, J.C. Practical uses of aquatic weeds. In: Pieterse, A. H.; Murphy, K. J. (Ed.). *Aquatic weeds: the ecology and management of nuisance aquatic vegetation*. Oxford: Oxford University Press, p. 274 - 291, 1990.

KHATAEE, A.; MOVAFEGHI, A.; TORBATI, S.; LISAR, S.S.; ZAREI, M. Phytoremediation potential of duckweed (*Lemna minor*) in degradation of c. i. acid blue 92: artificial neural network modeling. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 291-298, 2012.

KIM, S.; PARK, J.E.; CHO, Y.B.; HWANG, S.J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource technology**, v. 144, p. 8 - 13, 2013.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf, Tomo III. p. 683, 1995.

KOBAYAH, M.; KAKIZONO, T.; YAMAGUCHI, K.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering** v. 74, n. 1, p. 17 - 20, 1992.

KRAMER, M. **Reality shock: Why nurses leave nursing**. Mosby, St. Louis, p. 3 - 11, 1974.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Rima, São Carlos, p.531. 2000.

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C.G.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, n. 1 - 2, p. 122 - 132, 2002.

LEE, B.; KIM, J.K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural. Engineering.**, v. 25, n. 2, p. 111 - 124, 2001.

LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 106 - 110, 2011

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** – princípios e aplicações, 1. ed. Rima, 2006.

MACEDO, C.F; PINTO-COELHO, R.M. Efeito das algas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda* no crescimento e no índice lipídico de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*. *Acta Scientiarum*, v. 22, n. 2, p. 397 - 401, 2008.

MALLICK, N.; MANDAL, S.; SINGH, A. K.; BISHAI, M.; DASH, A. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, v.87, n.1, 137 - 145, 2012.

MANTOVAN, J.; ALVES, D.S., CELLIGOI, M.A.P.C. Produção de Levana por *Bacillus subtilis* natto utilizando melaço de cana-de-açúcar. BBR- **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.3, p. 328 - 330, 2013.

MARCONDES, D.A.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; TANAKA, R. H.; CARVALHO, F.T.; CAVENAGHI, A.L.; BRONHARA, A.A. Fluridone efficacy in controlling submersed aquatic weeds and its effects on some environmental characteristics. **Planta Daninha**, v.20 p. 63 - 71, 2002.

MARQUEZ, F.J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering** v. 76, n. 5, p. 408 - 410, 1993.

MELO, F.A.D. Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea sp* em melaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, acesso em: <http://www.fineprint.com>, último acesso: 20/10/2018, 2003.

MILOVANOVIC, I.; MISAN, A.; SARIC, B.; KOS, J.; MANDIC, A.; SIMEUNOVIC, J.; KOVAC, D. Evaluation of protein and lipid content and determination of fatty acid profile in selected species of cyanobacteria. In Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, CEF, Novi Sad, Serbia. 2012.

MIMURA, T. Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants, **Plant Cell Physiol**, v. 36, n. 1, p. 1 - 7, 1995.

MITRA, D., LEEUWEN, J., LAMSAL, B., 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 40 -48, 2012.

MOHAMMED, M.K.; MOHD, M.K. Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in *Spirulina platensis* in response to indole acetic acid (IAA). **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 6, p. 4973 - 4979, 2011.

MORETTI, M.S.; GOULART, M.D.C.; CALLISTO, M. *Eichornia azurea* (Swartz) Juanth, 1843 e *Pontederia lanceolata* Nutt., 1818 (Pontederiaceae) na Baía do Coqueiro, Pantanal de Poconé (MT/ Brasil). **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 5, n.1, p. 7 - 21, 2003.

MORIOKA, L.R.I.; Matos, Â.P.; Olivo, G.; Sant'Anna, E.S. Flocculação de *Chlorella sp.* produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares, **Química Nova**, v.37, n.1, p.44 - 49, 2014.

MORTON, J. F. Cattails (*Typha spp.*). Weed problem or potential crop? Society for **Economic Botany**, v. 29, n. 1, p.7 - 29, 1975.

MOVAFEGHI, A.; KHATAEE, A.; TORBATI, S.; ZAREI, M.; LISAR, S. Bioremoval of c. i. basic red 46 as an azo dye from contaminated eater by *Lemna minor* L.: modeling of key factor by neural network. **Environmental Progress Sustainable. Energy**, v. 32, n. 4, p. 1082 - 1089, 2013.

MULITERNO, A.; MOSELE, P.C.; COSTA, J.A.V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1132 - 1138, 2005.

NESIC, N.; JOVANOVIC, L. Potential use of water hyacinth (*E. crassipens*) for wastewater treatment in Serbia. Journal of Wastewater treatment using. **Aquatic plant**, n. 13, p. 1 - 8, 1996.

OECD. **Organization for Economic Cooperation and Development**. *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. In GUIDELINE for testing os chemical, 2002. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf>

ORDOG, V. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogenstressed *chlorella minutíssima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v.24, n.4, p. 907 - 914, 2012.

PARASHURAMULU, S.; SWAIN, P. S.; NAGALAKSHMI, D. Protein fractionation and in vitro digestibility of *Azolla* in ruminants. **Online J. Anim. Feed Res**, v. 3, n. 3, p. 129 - 132, 2013.

PATEL, S. Ameaças, manejo e uso de erva daninha aquática *Eichhornia crassipes*: uma visão geral. **Avaliações em Ciências Ambientais e Bio/Tecnologia**. v. 11, n. 3, p. 249 - 259, 2012.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science y Tech-nology**, v. 19, n.1, p. 31 - 39, 2008.

POTT, V.J.; CERVI, A.C., A família Lemnaceae Grey no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 2, p. 153 - 174, 1999.

POTT, V.J.; POTT A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília, Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 2000.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635 - 648, 2004.

QU, C.B.; WU. Z.F.; SHI, X.M. Phosphate assimilation by *Chlorella* and adjustment of phosphate concentration in basal medium for its cultivation, **Biotechnology Letter**, v. 30, n. 10, p. 1735 - 1740, 2008.

RADMANN, E.M. Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes. Tese de Doutorado pelo programa de pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 2011.

RAVEN, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). *Microalgal Biotechnology*, Cambridge: Cambridge University, p. 331 - 356. 1988.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: C.R.C. Press. 1990.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. *Plant physiology*. 4. ed, Wadsworth Publishing Company, Edn. Belmont, CA. Wadsworth p. 682, 1992.

SHEEHAN J.; DUNAHAY T.; BENEMANN J.; ROESSLER P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program Biodiesel From Algae, Golden, CO, **National Renewable Energy Institute**, p. 328, 1998.

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.; DE MORAES, M.A.G.; BRAGA, F.M. de S. Dynamics of some limnological characteristics in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) culture tanks as function of handling. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 4, p. 543 - 551, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton** (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Rima, 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.; BRAGA, F.M. de S. Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishpond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 459 - 466, 2007.

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

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; NEY MILLAN, R., 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. 111 - 118, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; MILLAN, R.N.; BERCHIELLI-MORAIS, F.A. Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 3, p. 585 - 591, 2013.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; BERCHIELLI-MORAIS, F.A. Growth and development time of subtropical Cladocera *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 fed with different microalgal diets. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p. 464-471, 2014.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; SEGALLI, A.M.D.L.; SCARDOELLI-TRUZZI B. Alternative médium for microalgae growth. **Annals of Aquaculture and Research**, v. 2, p. 1009 - 1011, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; SEGALI, A. M. D. L.; SCARDOELLI-TRUZZI, B. Aquatic Plants: Alternative Medium for Microalgae growth. **Ann. Aquac. Res**, v. 2, p. 1009-1011, 2015.

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).

SUH, S. S.; KIM, S. J.; HWANG, J.; PARK, M.; LEE, T.K.; KIL, E. J.; LEE, S. Fatty acid methyl ester profiles and nutritive values of 20 marine microalgae in Korea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 3, p.191 - 196, 2015.

THOMAZ, S.M.; BINI, L.M. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Maringá: EDUEM, v. 6, p. 145 - 162, 2003.

TOMASELLI, L. The microalgal Cell. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell, Oxford, p. 3 - 19, 2004.

VAN, T. K.; WHEELER, G. S.; CENTER, T.D. Competition between hydrilla verticillata and Vallsneria Americana as influenced by soil fertility. **Aquatic Botany**, v. 62, n. 4, p. 225 - 233, 1999.

VAN-DE-HOEK, C.; MANN, D.G.; JANHS, H.M. Algae: na introduction to phycology. Cambidge: Univrsity of Cambridge Press, v.32, p. 203 - 205, 1997.

WANG, H.; XIONG, H.; HUI, Z.; ZENG, X.; Mixotrophic cultivation of Chlorella pyrenoidosa with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology** v. 104, p. 215 - 220, 2012.

WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S.T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Berkley**, v. 36, n. 11, p. 1383 - 1389, 2009.

WESTLAKE, D. F. **Comparison of plant productivity. Biological Reviews**, v. 38, p. 385 -425, 1963.

WOLFF, G.; ASSIS, L.R.; PEREIRA, G.C.; CARVALHO, J.G.; CASTRO, E.M. Effects of zinc toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 133 - 137, 2009.

WOLFF, G.; PEREIRA, G.C.; CASTRO, E.M.; LOUZADA, J; COELHO, F.F. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure

dependent on the cadmium concentration. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 71 - 77, 2012

WOLVERTON, B.C.; McDONALD, R.C. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) productivity and harvesting studies. **Econ. Bot.**, v.33, n.1, p.1-10, 1979.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides*. by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499 - 507, 2006.

YAN, D.; LU, Y.; CHEN, Y.-F.; WU, Q. Waste molasses alone displaces glucosebased medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6487 - 6493, 2011.

ZHANG, H.; WANG, W.; LI, Y.; YANG, W.; SHEN, G. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. **Biomass and Bioenergy** v. 35, n. 5, p. 1710 - 1715, 2011.

CAPÍTULO I

EFEITO DA AÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR AO MEIO DE CULTURA NO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Ankistrodesmus gracilis* (REINSCH) KORSHIKOV

*Manuscrito a ser enviado a *Brazilian Journal of Biology*, atendo as normas da mesma.

RESUMO

As microalgas vem ganhando grande espaço no mercado de devido a sua grande importância em vitaminas sais minerais proteínas e lipídios, viabilizar e baratear o custo de produção vem sendo muito estudado, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do melaço de cana-de-açúcar “in natura” e hidrolisado como fonte de carbono orgânico no cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em sete meios de cultura, sendo cinco de macrófitas: *Eichhornia crassipes*, *E. azurea*, *Lemna minor*, *Azolla filiculoides*, e *Salvinia auriculata*; outro com meio comercial CHU₁₂ e o sétimo meio com fertilizante inorgânico (NPK 20:5:20). A fonte de carbono foi adicionada ao meio na concentração de 1,5g L⁻¹. Diferenças significativas ($p > 0,05$) foram encontradas em relação ao crescimento, e a densidade celular mais elevada foi obtida no meio CHU₁₂ em cultivo mixotrófico “in natura” ($313,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹). Para a clorofila-*a* as maiores concentrações foram observadas no meio *A. filiculoides* em cultivo mixotrófico “in natura” (268,2 mg L⁻¹). Elevados teores dos compostos nitrogenados nos meios de cultura estiveram relacionados com altas concentrações destes elementos nas plantas. Em geral, os compostos nitrogenados foram mais elevados do que o fósforo total no meio de cultura, com condutividade acima 0,4 mS cm⁻¹ e pH alcalino. Através dos resultados obtidos foi possível observar que o melaço da cana-de-açúcar “in natura” como fonte de carbono em cultivo mixotrófico para microalga *Ankistrodesmus gracilis* é uma alternativa que pode ser dotada para o crescimento desta microalga.

Palavras-chave: fertilizante, CHU₁₂, macrófitas, biomassa da microalga, aspectos biológicos e bioquímico.

ABSTRACT

As microalgae has been gaining great amount of market due to its great importance in its vitamins and minerals, lipids, to make feasible and cheap the cost of production has been much studied, however, influence of “in natura” and hydrolyzed sugarcane molasses was evaluated as a source of organic carbon in the culture of the microalga *Ankistrodesmus gracilis* in seven media. The latter comprised five macrophytes *Eichhornia crassipes*, *E. azurea*, *Lemna minor*, *Azolla filiculoides* and *Salvinia auriculata*, other commercial medium CHU₁₂, and a medium with inorganic fertilizer (NPK 20:5:20). Carbon source was added to the medium at a concentration of 1.5g L⁻¹. Significant differences ($p>0.05$) were found in relation to growth, density was obtained in medium CHU₁₂ with “in natura” mixotrophic culture (313.6×10^5 cels mL⁻¹). There were greater concentrations of chlorophyll-*a* in *A. filiculoides* medium in “in natura” mixotrophic culture (268.2 mg L⁻¹). High rates of nitrogen compounds in culture media are due to high concentrations of these elements in plants when compared to phosphorus. As a rule, nitrogen compounds had higher rates than total phosphorus in the medium, with conductivity over 0.4 mScm⁻¹ and high pH. Results show that “in natura” sugarcane molasses as carbon source in mixotrophic culture for microalga *Ankistrodesmus gracilis* may be an alternative in mixotrophic culture for microalgae growth.

Key-words: fertilizer, CHU₁₂, macrophytes, biomass algal, biological and biochemical aspects.

INTRODUÇÃO

Os meios de cultura comerciais para cultivo de microalgas, possuem nutrientes necessários que promovem o aumento da biomassa, no entanto, apresentam elevados custo de produção (ZAMALLOA et al., 2011). Novas fontes de nutrientes para cultivo de microalgas vêm sendo estudadas como por exemplo, o uso de macrófitas e de fertilizante inorgânico NPK (20:5:20) como meio de cultura para microalgas Chlorophyceae, onde o crescimento e o ganho nutricional são similares ao meio comercial CHU₁₂ (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

Meios alternativos e de baixo custo produzindo elevada biomassa, são alternativas adotadas na produção de microalgas. Os meios de cultura com plantas aquáticas, como *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia azurea* e *Lemna minor*, promovem alta biomassa e conteúdo proteico no cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018a, b). Nos cultivos de microalgas o carbono é considerado de grande importância como macronutriente uma vez que constitui 50% da biomassa das microalgas, sendo disponível no ambiente nas formas de dióxido de carbono, bicarbonato ou carbonato (KIM et al., 2013). O uso de melaço de cana-de-açúcar na produção de microalgas em cultivos mixotrófico possibilita que o CO₂ e o carbono orgânico sejam assimilados simultaneamente, promovendo o aumento da produção de algumas espécies de microalgas (ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

As macrófitas como produtoras primárias retiram do ambiente os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, principalmente N e P, e muitas vezes acumulam de forma luxuriante grande parte dos nutrientes assimilados do meio ambiente (POLOMSKI, et al., 2007). Desta forma, as plantas aquáticas tornam-se excelentes ferramentas acumuladoras de nutrientes.

A microalga *Ankistrodesmus gracilis* é facilmente cultivada em laboratório devido ao tamanho, forma, espessura da parede celular, qualidade nutricional, sendo também empregada na aquicultura como alimento vivo (SIPAÚBA-TAVARES; PEREIRA, 2008).

O uso integrado de material biológico como técnica para preparo de meios de cultura é uma linha a ser adotada no cultivo de microalgas, onde os meios são um dos compostos mais custosos para a produção da biomassa algal. Assim, alternativas mais baratas que propiciam elevada biomassa com condições bioquímica adequada para a manutenção de um sistema de cultivo que possa ser empregada de forma diversa devido

as seu rendimento, são técnicas inovadoras a serem adotadas na manutenção de microalgas em cultivos de laboratório. Proporcionar ao sistema de cultivo uma fonte a mais de carbono (melaço de cana-de-açúcar) pode potencializar a taxa de crescimento, bem como, gerar maior biomassa e maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados (GARCIA et al., 2005).

Existem muitos trabalhos com o cultivo desta microalga, porém poucos em cultivos mixotróficos, neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em cultivo mixotrófico “in natura” e hidrolisado utilizando meio comercial e alternativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e Meios de Cultura

A cepa da microalga *Ankistrodesmus gracilis* foi cedida da coleção de cultura 005CH, isolada da represa do Broa, (22°15 'S e 47°19' W). A microalga foi cultivada em temperatura constante de 22±2°C com intensidade de luz de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em fotoperíodo de 24 horas.

Foram utilizados sete meios de cultura meio comercial CHU₁₂, meio com fertilizante inorgânico (NPK, 20:5:20) e meios de macrófitas utilizando as seguintes plantas: *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia azurea*, *Lemna minor*, *Azolla filiculoides* e *Salvinia auriculata*. O preparo dos meios de cultura com fertilizante e com macrófitas foram baseados em Sipaúba-Tavares e Rocha (1993) e Sipaúba-Tavares et al. (2009). O inóculo da microalga inicialmente foi realizado em meio CHU₁₂ com a densidade de 2,4x10⁵ cels mL⁻¹ em volumes de 250 mL. Posteriormente, os inóculos foram transferidos para o meio NPK (20:5:20) em frascos de 2 L com densidade celular de 4,5x10⁵ cels mL⁻¹. Ao atingir a fase exponencial de crescimento (7 dias), a microalga foi transferida para recipientes de 2 L contendo os meios de cultura em cultivo mixotrófico.

Melaço Cana-de-Açúcar

O melaço de cana utilizado neste estudo foi obtido através da empresa Melaços Brasileiros LTDA (Brasil). Sua composição baseia-se em 20% (p/p) de água, 8% (p/p) frutose, 7% (p/p) de glicose e íons metálicos tais como cálcio, potássio, sódio, ferro, magnésio, cobre, entre outros. O melaço foi usado em duas formas: bruto (“in natura”) e hidrolisado, neste caso, o melaço bruto foi diluído em água destilada e esterilizado em autoclave a 1atm durante 30 minutos. Para os testes com melaço hidrolisado foi

adicionado 0,4% (m/m) de solução ácida (HCl 4 M) sendo incubado em manta térmica durante 20 minutos a 80°C para que a hidrólise converta a sacarose em glicose e frutose. O melaço foi filtrado em bomba a vácuo para retirada de possíveis impurezas e esterilizado a 1atm durante 30 minutos. A concentração utilizada para o cultivo mixotrófico foi de 21 mL de melaço em 1,4-L de água destilada para a obtenção da concentração de 1,5g L⁻¹ para o crescimento da microalga.

Crescimento

A avaliação do crescimento da microalga ocorreu diariamente por 28 dias, retirado-se 1 mL de amostra que foi contada em subamostra (2x1 µL) através de hemocitômetro de Neubauer, onde os dados da contagem foram expressos em números de células mL⁻¹ x10⁵. A taxa de crescimento (K) foi calculada através da fórmula proposta por Guillard (1973): $k = (3,322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$, onde: t = tempo; N= números de células (os sobescritos denotam dados em momentos diferentes). O tempo de duplicação (TD) foi calculado a partir da fórmula: $TD = 1/K^{-1}$, onde: TD = tempo de duplicação; $1/K^{-1}$ = divisão por dia (GUILLARD, 1973).

Cerca de 50 indivíduos foram mensurados em microscópio Leica DFC 295 para a análise de comprimento total. As imagens foram analisadas em sistema LAS core (LAS V3.8) em objetiva micrométrica de 400X. O volume celular foi determinado pelo tamanho médio com o uso da fórmula geométrica de acordo com Vollenweider (1974) e Bottrell et al. (1976). O carbono orgânico total foi calculado usando a fórmula de regressão proposta por Rocha e Ducan (1985): $C = 0,1204 \cdot V^{1,051}$ onde: C= teor de carbono em pg célula⁻¹; V= volume celular.

Parâmetros dos Meio de Cultura

Os parâmetros físicos e químicos dos meios de cultura foram realizados semanalmente em tréplica. O oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica (Cond) do meio de cultura foram mensurados com uma sonda de multiparâmetros YSI 556 MPS. Os compostos nitrogenados (NT; NH₃, NO₂ e NO₃) e o fósforo total (PT) foram quantificados em espectrofotometria, seguindo a metodologia de Golterman et al. (1978) e Koroleff (1976). A clorofila-a foi extraída com álcool a 90% e quantificada por Nusch (1980). A avaliação do consumo de nitrogênio total e fósforo total foi realizado entre as diferenças das concentrações inicial e final de cada componente. Para os teores de peso seco (pg cel⁻¹) 10 mL foram coletados semanalmente e filtrados em filtro de fibra de vidro GF/C 0,7

mm. Posteriormente, foi seco em estufa a 60°C e após a secagem foi realizada a pesagem até peso constante. A determinação do conteúdo de cinzas (%) da microalga foi obtida pelo incineramento dos filtros em mufla a 500°C, por 4 horas.

Composição dos Nutrientes das Plantas Aquáticas

Cerca de 200 g de biomassa seca foi retirada e utilizada para a composição dos nutrientes das plantas segundo Bataglia et al. (1983).

Análise Estatística dos Dados

Foi aplicado aos dados a análise de variância (ANOVA) com o programa de Statistica 8.0 para simples verificação entre os meios de cultura dentro de cada cultivo (STATSOFT, 2007). Quando encontrada diferenças significativas ($p < 0,05$) foi aplicado o teste de Tukey. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

RESULTADOS

A densidade celular de *Ankistrodesmus gracilis* foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os cultivos mixotróficos, com elevada densidade no meio comercial CHU₁₂ com máximo de $313,6 \times 10^5$ cels. mL⁻¹, obtida no 15º dia de crescimento em melaço “in natura” (Figura 14). No meio NPK, o crescimento da microalga foi menor ($p < 0,05$) atingindo a densidade celular máxima de $14,8 \times 10^5$ cels. mL⁻¹ no 11º dia no melaço “in natura” e $31,5 \times 10^5$ cels mL⁻¹ no 7º dia de crescimento no melaço hidrolisado, resultando a maior densidade celular para este meio (Figura 14).

Em relação aos meios de macrófitas a densidade celular mais elevada foi obtida no meio de cultura *Lemna minor* ($p < 0,05$) com $204,1 \times 10^5$ cels mL⁻¹ no 27º dia de experimento em cultivo mixotrófico “in natura”, seguido pelo meio de cultura *Azolla filiculoides* que atingiu a maior densidade celular no cultivo mixotrófico hidrolisado ($163,3 \times 10^5$ cels mL⁻¹). A densidade celular no meio *Salvinia auriculata* foi similar nos dois cultivos mixotróficos ($135,8 \times 10^5$ cels mL⁻¹ “in natura” e $131,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹ hidrolisado). No meio de cultura *Eichhornia crassipes* foi observado a menor densidade celular em cultivo mixotrófico “in natura” e no meio mixotrófico hidrolisado foi obtido para o meio *E. azurea* (Figura 14).

Em meio comercial CHU₁₂ “in natura”, foi observado o menor tempo de duplicação (2,7) para *A. gracilis* conseqüentemente, a maior taxa de crescimento ($p < 0,05$). No meio cultura de *A. filiculoides* foi observado o segundo melhor tempo de duplicação com 4,29 dias e $K = 0,23$. O oposto foi obtido no cultivo mixotrófico

hidrolisado no meio NPK (Tabela 1). O meio de cultura *L. minor* em cultivo mixotrófico hidrolisado foi observado o melhor tempo de duplicação (4,59 dias) obtendo a melhor taxa de crescimento. O oposto foi observado para o meio *E. azurea* em melaço hidrolisado (Tabela 1).

O comprimento total e volume celular de *Ankistrodesmus gracilis* em cultivo mixotrófico “in natura” nos meios CHU₁₂ e *A. filiculoides* foram similares ($p>0,05$) (Tabela 1). O comprimento total de *A. gracilis* em meio de cultura *S. auriculata* apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) em cultivo mixotrófico “in natura”. O menor volume celular de *A. gracilis* foi obtido no meio de cultura *L. minor* com $3,5\pm1,3 \mu\text{m}^3$, já no meio CHU₁₂ foi obtido para esta microalga o maior teor de carbono orgânico total em cultivo mixotrófico “in natura” ($1,8\pm1 \text{ pg.cel}^{-1}$) (Tabela 1). Na adição do melaço hidrolisado o comprimento total e o volume celular de *A. gracilis* foram maiores ($p<0,05$) para os meios de cultura *A. filiculoides* ($11,1\pm1,2 \mu\text{m}$ e $14,3\pm7,6 \mu\text{m}^3$) e no meio de cultura *S. auriculata* com $11,1\pm0,8\mu\text{m}$ e $10,6\pm4 \mu\text{m}^3$, respectivamente (Tabela 1).

O menor comprimento ($p<0,05$) total ocorreu no meio *E. crassipes* ($7,4\pm1\mu\text{m}$) e o menor volume celular ($3,8\pm3 \mu\text{m}^3$) no meio *E. azurea*. O carbono orgânico total foi maior no meio de cultura *A. filiculoides* ($p<0,05$) ($1,9\pm1,1 \text{ pg.cel}^{-1}$) e os meios NPK, *E. crassipes*, *E. azurea* e *L. minor* não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) nos valores de carbono orgânico total de *A. gracilis* (Tabela 1).

Elevados teores de clorofila-*a* de *A. gracilis* foram encontradas no meio de cultura *A. filiculoides* nos dois cultivos mixotróficos. Para esta variável, diferenças significativas ($p<0,05$) entre os meios foram apresentadas nos dois cultivos mixotróficos. No meio de fertilizante inorgânico (NPK) foi obtido o menor teor de clorofila-*a* em cultivo mixotrófico “in natura” ($61,9\pm1,5 \text{ mg. L}^{-1}$) e no meio *E. azurea* foi encontrado o menor teor deste pigmento em cultivo mixotrófico hidrolisado ($48,4\pm18 \text{ mg. L}^{-1}$) (Tabela 1).

O fertilizante inorgânico NPK obteve os maiores teores de peso seco e conteúdo de cinzas em cultivo mixotrófico “in natura” ($p<0,05$) ($309,5\pm100 \text{ pg/cel}^{-1}$ e $29,1\pm22\%$) e, nos outros meios de cultura o peso seco foi similar ($p>0,05$) no cultivo mixotrófico hidrolisado. Já o meio comercial apresentou os menores valores nos dois cultivos mixotróficos ($p<0,05$) (Tabela 1).

O pH foi de ácido a alcalino nos dois cultivos, variando de $6,4\pm0,7$ a $13,63\pm0,2$, no cultivo “in natura” e de $3,35\pm0,3$ a $13,1\pm0,2$ no hidrolisado ao longo do período experimental (Figura 15 e 16).

O borbulhamento constante do ar nos meios de cultura promoveu elevadas concentrações de oxigênio dissolvido acima de $7,8 \text{ mg L}^{-1}$ no melaço “in natura” e de $5,9 \text{ mg L}^{-1}$ no melaço hidrolisado, sendo similar ($p>0,05$).

A condutividade elétrica apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) nos dois cultivos mixotróficos atingindo elevados valores no meio de cultura com fertilizante inorgânico NPK ($1,2\pm0,2 \text{ mS cm}^{-1}$) em cultivo mixotrófico “in natura” (Figuras 15 e 16).

Foram encontradas diferenças ($p<0,05$) significativas nos compostos nitrogenados e fósforo total nos dois cultivos mixotróficos. No cultivo mixotrófico a amônia tendeu a decrescer ao longo do período experimental exceto no meio NPK e no meio *A. filiculoides* em cultivo “in natura” e, no meio *E. crassipes* em cultivo hidrolisado (Figuras 15 e 16).

O meio comercial CHU_{12} em cultivo mixotrófico hidrolisado apresentou aumento de amônia no sétimo dia de cultivo ($0,9\pm0,05 \text{ mg L}^{-1}$), porém obteve um consumo no final do experimento ($0,5\pm0,05 \text{ mg. L}^{-1}$). Os meios de macrófitas *L. minor*, *A. filiculoides* e *S. auriculata* apresentaram o mesmo padrão no consumo de amônia até décimo quarto dia de experimento nos dois cultivos mixotróficos (Figuras 15 e 16).

O nitrato ($p<0,05$) no meio CHU_{12} em cultivo mixotrófico apresentou elevada concentração no primeiro dia de experimento ($2,2\pm0,06 \text{ mg. L}^{-1}$ “in natura” e $1,9 \text{ mg. L}^{-1}$ hidrolisado) seguido de uma queda a partir do sétimo dia ($0,2\pm0,01 \text{ mg L}^{-1}$ “in natura e $0,2\pm0,01$ hidrolisado) diferentemente do meio NPK que apresentou aumento deste composto no final do experimento (Figuras 15 e 16). No meio com *S. auriculata* em cultivo “in natura” houve aumento até o décimo quarto dia de cultivo ($1,2\pm0,02 \text{ mg. L}^{-1}$) decrescendo posteriormente. Os meios de macrófitas *E. crassipes*, *E. azurea*, *L. minor* e *A. filiculoides* apresentaram o mesmo padrão para este composto nos dois cultivos mixotróficos.

O nitrito apresentou aumento do primeiro ao sétimo dia nos meios CHU_{12} , NPK, *E. crassipes* e *A. filiculoides*, ($p<0,05$) e nos meios de cultura *E. azurea* e *S. auriculata* houve decréscimo no sétimo dia em cultivo mixotrófico “in natura” (Figura 15). No meio de cultura *L. minor* altos teores de nitrito foram obtidos no primeiro dia de crescimento ($2,3\pm0,26 \mu\text{g L}^{-1}$) de *A. gracilis* em cultivo hidrolisado, no entanto, no meio de NPK foi o único meio a apresentar um longo aumento nas concentrações de nitrito (Figuras 15 e 16).

O fósforo total no meio de cultura *A. filiculoides* e do NPK não apresentaram diferenças significativas entre si ($p>0,05$) (Figuras 15 e 16). No meio de cultura com NPK foi observado maior concentração de fósforo total ($p<0,05$) ($0,8\pm0,04 \text{ mg L}^{-1}$ “in natura”) já nos meios *E. azurea*, *L. minor* e *S. auriculata*, não foram observadas diferenças para estes compostos ($p>0,05$). O meio comercial CHU₁₂ apresentou aumento de fósforo total do início ($0,2\pm0,02 \text{ mg L}^{-1}$ “in natura” e $0,2\pm6.10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ hidrolisado) para o final do experimento ($0,5\pm0,05 \text{ mg L}^{-1}$ “in natura e $0,4\pm0,02 \text{ mg L}^{-1}$ hidrolisado).

Nos dois cultivos mixotróficos o consumo de nitrogênio total foi observado no meio CHU₁₂ e nos meios de *E. azurea*, *L. minor*, *A. filiculoides* e *S. auriculata* (Figura 17). No meio CHU₁₂ houve aumento de PT no final no cultivo mixotrófico não hidrolisado, diferentemente do cultivo hidrolisado que apresentou um consumo de PT no final do experimento (Figura 17).

O meio de cultura com NPK e de *E. crassipes* apresentaram um padrão semelhante no consumo dos compostos nitrogenados e fósforo total nos dois cultivos mixotróficos tendendo a aumentar ao longo do período experimental. No entanto, no cultivo hidrolisado o PT foi similar entre a concentração inicial e final no meio *E. crassipes*, já no meio NPK houve aumento de PT no final do experimento. No meio de cultura *S. auriculata* no cultivo hidrolisado, não foi observado consumo de PT (Figura 17).

Diferentes nutrientes estão contidos nos meios de cultura, como fósforo, nitrogênio e potássio que variaram dependendo do meio de cultura. No meio de *E. crassipes* e *E. azurea* o N, P e K foram elevados comparados aos outros meios de cultura (Tabela 2). Nutrientes como Ca e Mg foram encontrados em pequenas concentrações nos meios de macrófitas, o mesmo não ocorreu no meio CHU₁₂ com concentrações acima de 3 mg. L No meio de *S. auriculata*, foi o que apresentou as menores concentrações de nutrientes, com exceção do Ca.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo para densidade celular e taxa de crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* em cultivo mixotrófico nos meios NPK e de macrófitas foram inferiores aqueles obtidos em cultivo autotrófico (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018a). Muitas fontes de carbono têm sido propostas para cultivos de microalga, porém uma avaliação prática mostra que poucos substratos são possíveis de uso pelos microrganismos (PÉREZ-GARCIA et al., 2011). Vidotti et al., (2014) realizaram cultivo mixotrófico para as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugus* utilizando

frutose como fonte de carbono, e apresentou rápida morte celular do cultivo. Neste estudo, a densidade celular foi afetada pelo melaço hidrolisado, exceto no meio NPK, com elevado valor de volume celular, cinzas e peso seco.

A clorofila-*a* é um composto rico em nitrogênio e facilmente acessível sendo responsável pelas rápidas taxas de crescimento (BENAVENTE-VALDÉS et al, 2016). Neste estudo, os meios de cultura *A. filiculoides*, *S. auriculata* e CHU₁₂ apresentaram teores de clorofila-*a* acima de 200 mg L⁻¹, com melaço hidrolisado, estando associado ao elevado consumo de NT e FT pela microalga. LI et al. (2008) verificaram que o cultivo de *Neochloris oleoabundans*, quando há disponibilidade do nitrogênio, ocorre rápido acúmulo de clorofila e divisão celular.

Diferenças entre taxas de crescimento indicam que além de nitrogênio e fósforo outros nutrientes limitam a biomassa algal (ROCHA et al., 2015). Os teores de N obtidos no presente estudo foram mais elevados do que os obtidos por SIPAÚBA-TAVARES et al. (2018a e 2018b) que utilizaram os meios de cultura com plantas aquáticas sem a adição do melaço de cana de açúcar. Em cultivo mixotróficos as microalgas tendem a aumentar a produção de amônia devido a fonte de carbono, podendo ser fontes a base de ureia e ricas em nitrogênio (ANGELO et al., 2014). No entanto, os teores de fósforos foram bem menores dos que encontrados no cultivo autotrófico realizado por SIPAÚBA-TAVARES et al. (2018a e 2018b), visto que, os nutrientes contidos nas plantas influenciaram de forma direta a disponibilização dos macros e micronutrientes para o crescimento e desenvolvimento algal. O fósforo necessário para o desenvolvimento das microalgas, incluso na forma de ortofosfato e polifosfato, representa 1% da biomassa seca (HU, 2004).

Nas culturas da Chlorophyceae *Scenedesmus obliquus* e da Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* cultivadas em presença de fosfato com a concentração de 1,4 ou 10 mg L⁻¹ foi observado aumento do teor de clorofila-*a*. No presente estudo, a planta aquática *S. auriculata* apresentou o menor teor de fósforo (0,7g Kg⁻¹) e nos dois cultivos mixotróficos obteve o teor de clorofila-*a* acima de 200 mg L⁻¹, mais elevado do que o meio comercial em sistema “in natura”.

Grande parte das microalgas tem o seu desenvolvimento adequado em pH neutro, porém algumas espécies se desenvolvem melhor em condições ácidas ou alcalinas, (ZENG et al., 2011). Em cultivos mixotróficos o aumento do pH pode ocorrer devido a fixação do dióxido de carbono (CO₂) que está presente na fonte de carbono adicionada ao

cultivo (melaço de cana-de-açúcar) porém, o crescimento da biomassa da microalga promove a remoção de compostos de carbono responsáveis pela acidificação do meio, ocasionando assim, o aumento significativo do pH (LI et al., 2007). O pH alcalino observado neste estudo esteve diretamente relacionado ao melaço de cana-de-açúcar que promoveu elevado valor de pH acima de 13.

O magnésio, estimula a produção de clorofila-*a* por biomassa (MANDALAM; PALSSON, 1998). Neste estudo, foi observado baixas concentrações deste elemento no meio de cultura da macrófita *S. auriculata*, com os teores de clorofila-*a* acima de 200 mg L⁻¹. O meio comercial CHU₁₂ apresentou 7,5 g kg⁻¹ de Mg em sua composição, incluindo os elevados teores de clorofila-*a* e alta densidade celular do que os outros meios.

A composição bioquímica das microalgas depende dos macros e micronutrientes que são utilizados para preparar meios de cultura. Estes nutrientes estão envolvidos no crescimento desses microrganismos através de várias reações enzimáticas para a biossíntese de vários compostos (KAREMORE et al., 2013). Neste estudo, o N, P e K refletiu de forma direta na biomassa algal, nos meios *E. crassipes* e *E. azurea* já no *L. minor*, os teores destes elementos foram baixos porém, o crescimento e densidade celular da microalga *A. gracilis* foram elevados neste meio de cultura do que nos outros meios utilizados. Deve-se ressaltar que o meio CHU₁₂ nos dois cultivos mixotróficos apresentou a biomassa algal mais elevada uma vez que contém altas concentrações de macro e micronutrientes essenciais para o crescimento de *A. gracilis*.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que o uso de melaço “in natura” em meio CHU₁₂ pode ser uma fonte de carbono alternativo, pois, apresentou densidade celular mais elevada dentre os dois cultivos e os setes meios de cultura utilizados. A escolha do meio afetou diretamente o crescimento da microalga, onde foi observado que os meios alternativos não apresentaram bom rendimento em termos de densidade celular em cultivo mixotrófico, porém, o meio de macrófita *A. filiculoides* apresentou os teores de clorofila-*a* mais elevados. O uso de resíduos biológicos como melaço e plantas aquáticas são alternativas a serem adotadas em cultivo de microalga *A. gracilis* cujos resultados de crescimentos e parâmetros biológicos são adequados para produção da biomassa algal porém não apresentam altas densidades. Testes de comparação devem ser realizados para avaliar as formas de cultivos, pois as condições podem afetar ou favorecer na qualidade da biomassa e no crescimento algal.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRULEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V.; GUMBYTE, M. 2014. Biomass and oil content of *Chlorella sp.*, *Haematococcus sp.*, *Nannochloopsis sp.* and *Scenedesmus sp.* under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. *Journal Applied Phycology*, v. 26, n. 1, p. 83-90.
- ANGELO, E.A; ANDRADE, D.S; COLOZZI FILHO, A. 2014. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 35, n. 2, p. 125-136.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F., FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. 1983. Chemical analysis methods for plants. *Boletim Técnico: Instituto Agrônômico*, 78, Campinas. p. 48.
- BENAVENTE-VALDÉS, J.R.; AGUILAR, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J. 2016. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, v.10, p.117-125.
- BOTTRELL, H.H.; DUNCAN, A.; GLIWICZ, Z.M.; GRYGIEREK, E.; HERZING, A.; HILLBRICHT-ILKOWSKA, A.; KURASAWA, H.; LARSSON, P.; WEGLENSKA, T. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norwegian Journal of Zoology*, v. 24, p. 419-456.
- GARCIA, M.C.; MIRÓN, A.S.; SEVILLA, J.F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F.G. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 297-305.
- GOLTERMAN H.L.; CLYMO R.S.; OHNSTAD, M.A.M. 1978. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. *Blackwell Scientific Publication*, n.8, p.113.
- GUILLARD, R.R.L. 1973. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*, London: Cambridge University Press, p. 289-311.
- HU, Q. 2004. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND (Ed), A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. *Blackwell Science*, v.1, p. 312-351.
- KAREMORE, A.; PAL, R.; SEM, R. 2013. Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. *Algal Res.* v. 2, p. 113-121.
- KIM, S.; PARK, J.E.; CHO, Y.B.; HWANG, S.J. 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource technology*, v. 144, p. 8-13.
- KOROLEFF, F. 1976. *Determination of nutrients*. In Grassnof, K. (Ed.). *Methods of seawater analysis*, Verlag Chemie.

- LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C.Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 629–636.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering, Berkeley*, v. 98, n. 4, p. 764-771.
- MANDALAM, R.K.; PALSSON, B. 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and bioengineering*, v. 59, n. 5, p. 605-611.
- MIAO, X.; WU, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 841-846.
- NUSCH, E.A. 1980. Of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 14, n. 1, p. 14-36.
- PÉREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, v.45, n. 1, p.11-36.
- POLOMSKI, R.F.; BIELENBERG, D.C.; WHITWELL, T., 2007. Nutrient recovery by seven aquatic garden plants in a laboratory-scale subsurface-constructed wetland. *HortScience*, vol. 42, no. 7, pp. 1674-1680.
- ROCHA, G.S; PINTO, F.H.V; MELÃO, M.G.G; LOMBARDI, A.T. 2015. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? *Appl Phycol*, v. 27, p. 171-178.
- ROCHA, O.; DUNCAN, A. 1985. 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.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. 1993. 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.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; PEREIRA, A.M.L. 2008. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 4, p. 875-883.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; IBARRA, L.C.; FIORESI, T.B. 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REINSCH) Korshikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 1, p. 111-118.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; FLORÊNCIO, T.; SCARDOELI-TRUZZI, B. 2018 (a). Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. *Brazilian Journal of Biology*, n. AHEAD, v.78, n. 3, p. 579-587.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; TEDESQUE, M.G; SANTOS, G.M.L; TRUZZIA, B.S. 2018 (b). Macrophytes to improve the cultivation of *Ankistrodesmus gracilis*. *Journal Algal Biomass*. v.9, n.1, p.18-25.

SHI, X.M.; ZHANG, X.W.; CHEN, F. 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 3-5, p. 312–318.

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

VIDOTTI, A.D.S.; COELHO, R.S.; FRANCO, L.M.; FRANCO, T.T. 2014. Miniaturized culture for heterotrophic microalgae using low cost carbon sources as a tool to isolate fast and economical strains. *Chemical Engineering Transactions*, v. 38, n. 6, p. 325-330.

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

ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. 2011. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1149-1158.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHENA, X. D.; LU, Y. 2011. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Kidlington, v.15, n. 6, p. 3252-3260.

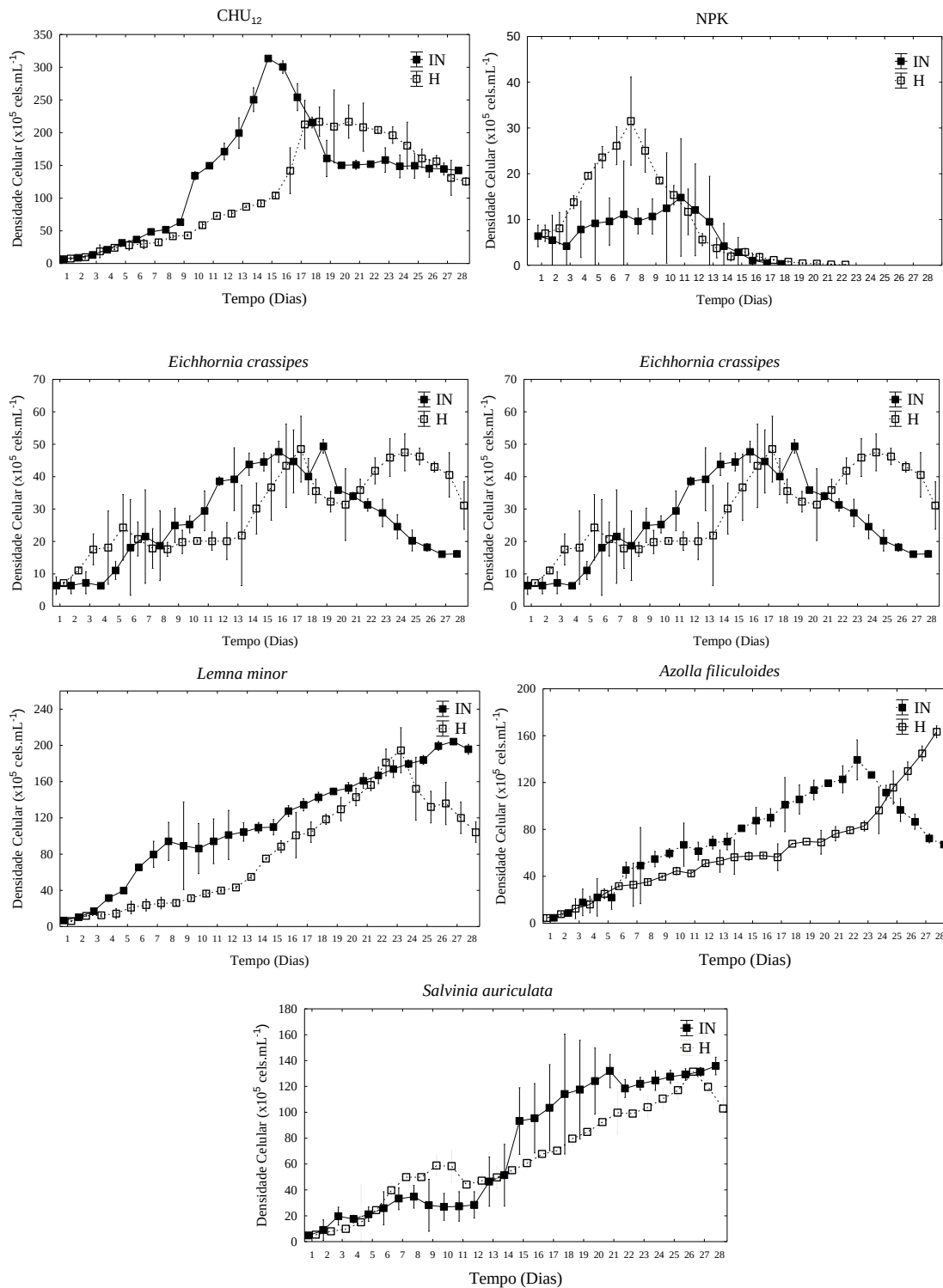


Figura 14. Curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* contendo melaço “in natura” (IN) e hidrolisado (H) cultivada em meio: CHU₁₂, fertilizante inorgânico NPK e as macrófitas: *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia azurea*, *Lemna minor*, *Azolla filiculoides* e *Salvinia auriculata*.

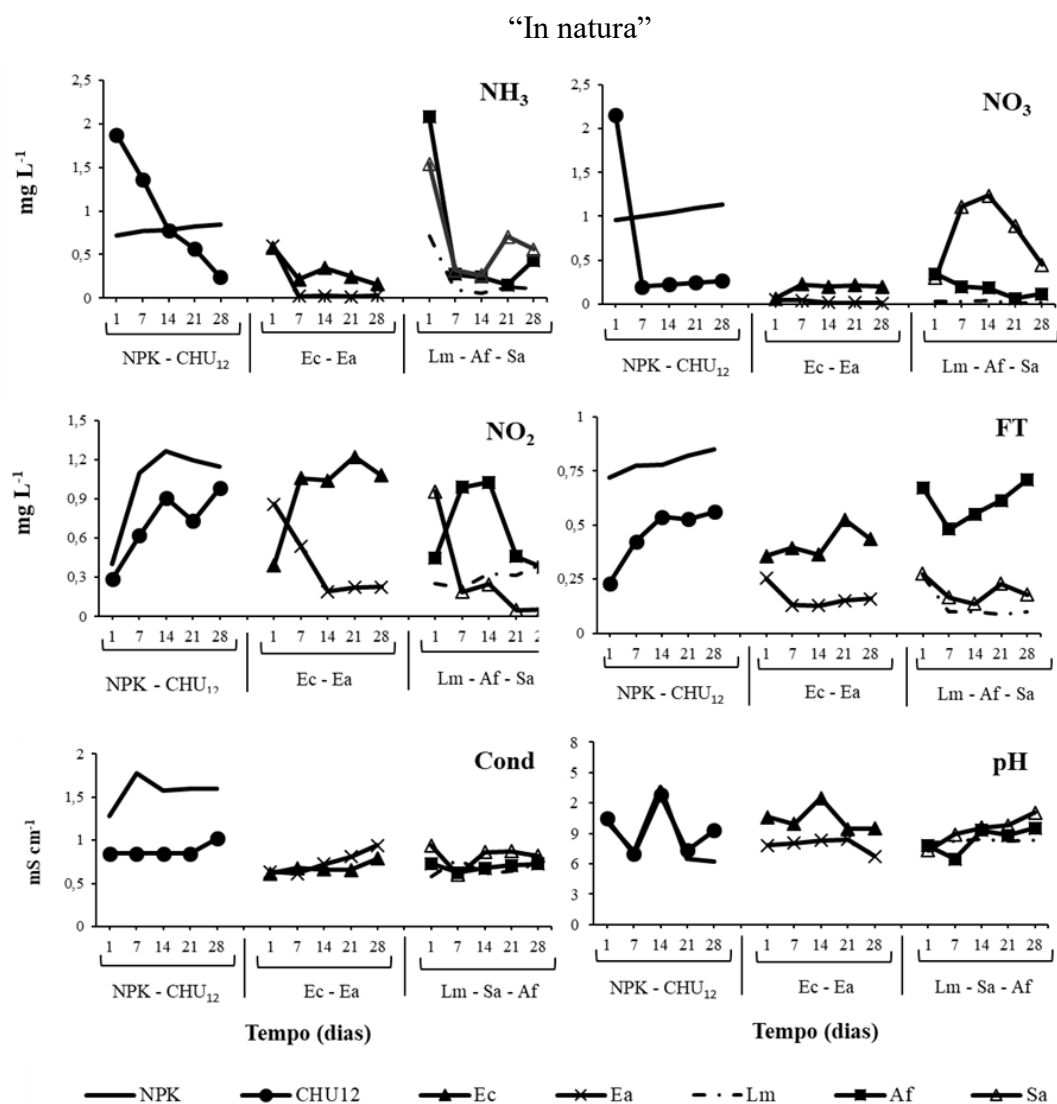


Figura 15. Avaliação dos nutrientes (mg L⁻¹), condutividade (mS cm⁻¹) e pH no cultivo mixotrófico “in natura” utilizando os meios de cultura CHU₁₂, NPK, e meios de macrófita: *Eichhornia crassipes* (Ec), *Eichhornia azurea* (Ea), *Lemna minor* (Lm), *Azolla filiculoides* (Af) e *Salvinia auriculata* (Sa).

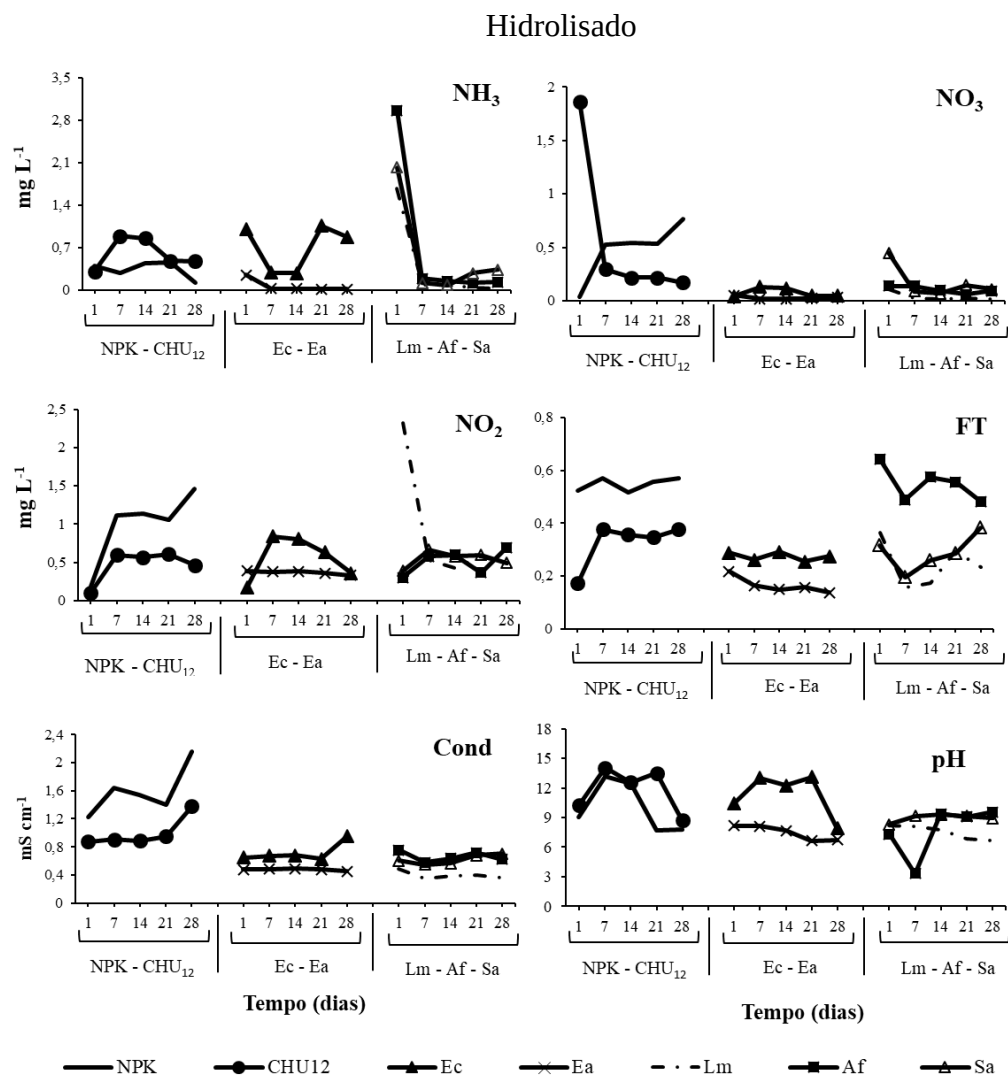


Figura 16. Avaliação dos nutrientes (mg L⁻¹), condutividade (mS cm⁻¹) e pH no cultivo mixotrófico hidrolisado utilizando os meios de cultura CHU₁₂, NPK, e meios de macrófita: *Eichhornia crassipes* (Ec), *Eichhornia azurea* (Ea), *Lemna minor* (Lm), *Azolla filiculoides* (Af) e *Salvinia auriculata* (Sa).

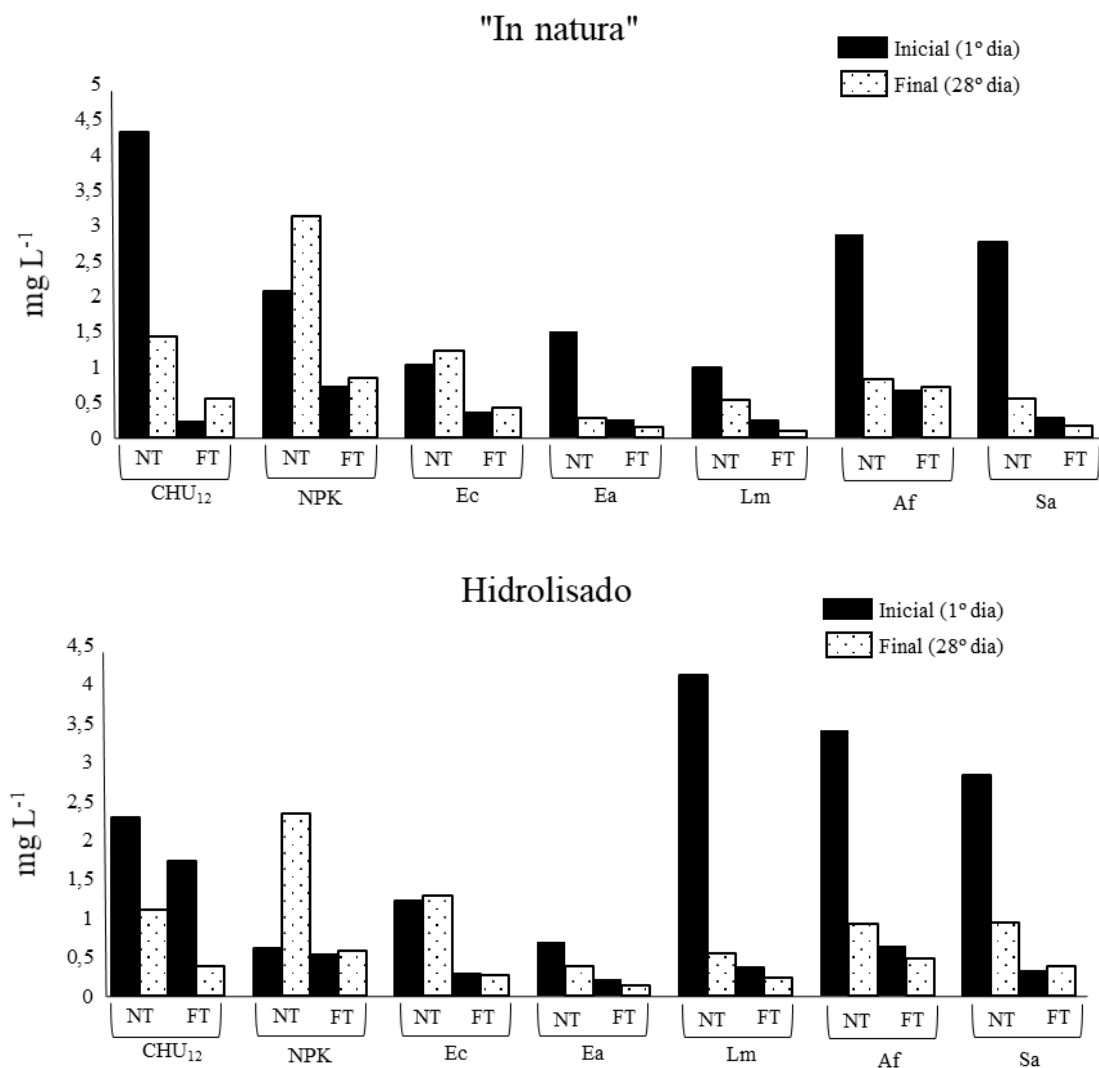


Figura 17. Consumo dos compostos nitrogenados (NT) e fósforo total (PT) no cultivo mixotrófico “in natura” e hidrolisado nos meios de cultura C HU₁₂, fertilizante inorgânico NPK, e nos meios de macrófita: *Eichhornia crassipes* (Ec), *Eichhornia azurea* (Ea), *Lemna minor* (Lm), *Azolla filiculoides* (Af) e *Salvinia auriculata* (Sa), no período inicial (1º dia) e final (28º dia) do experimento.

Tabela 1. Parâmetros de produção da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em cultivo mixotrófico “in natura” e hidrolisado, nos meios: comercial CHU₁₂, fertilizante inorgânico NPK, e meios de macrófita *Eichhornia crassipes* (Ec), *Eichhornia azurea* (Ea), *Lemna minor* (Lm), *Azolla filiculoides* (Af) e *Salvinia auriculata* (Sa).

Parâmetros	Meios de Cultura						
	CHU ₁₂	NPK	Ec	Ea	Lm	Af	Sa
“In natura”							
TD (dias)	2,7	9,10	6,4	5,65	5,49	4,29	5,54
TC (K)	0,36	0,11	0,16	0,18	0,18	0,23	0,18
DCmd (x10 ⁵ cel mL ⁻¹)	134,1±8,6 ^a	7,4±4,3 ^c	26,7±13,4 ^c	66,5±40 ^b	114,6±59 ^a	74,1±37,1 ^b	66,5±40 ^b
DCM (x10 ⁵ cel mL ⁻¹)	313,6 ^a	14,8 ^f	49,3 ^e	128,8 ^d	204,1 ^b	139,3 ^c	135,8 ^{cd}
CT (µm)	10,9±1 ^a	8,1±1 ^b	8,3±1 ^b	7,7±1 ^b	7,5±0,9 ^b	11,1±1 ^a	9,4±1 ^{ab}
VC (µm ³)	13,1±6,7 ^a	4,6±4,2 ^b	5,9±3 ^b	4,7±3,4 ^b	3,5±1,3 ^b	12,4±4 ^a	7,1±3 ^b
COT (pg cel ⁻¹)	1,8±1 ^a	0,6±0,6 ^c	0,7±0,4 ^c	0,6±0,4 ^c	0,8±0,2 ^{bc}	1,7±0,6 ^{ab}	0,9±0,4 ^{bc}
Clorofila- <i>a</i> (mg L ⁻¹)	135,4±13 ^b	61,9±1,5 ^c	84,3±3,7 ^c	182,1±38 ^b	170,8±16 ^b	268,2±156 ^a	250,5±151 ^a
CC (% peso seco)	11,1±6,9 ^b	29,1±2,2 ^a	15,5±10 ^b	15,7±9,5 ^b	11,61±11,3 ^b	19,48±15,6 ^{ab}	9±7,5 ^c
PS (pg.cel ⁻¹)	52,4±49 ^b	309,5±100 ^a	131,9±72 ^b	85,1±68 ^b	75,8±83 ^b	132,7±81 ^b	137,7±167 ^b
Hidrolisado							
TD (dias)	4,17	3,19	6,14	9,12	4,59	5,22	5,42
TC (K)	0,24	0,3	0,16	0,11	0,22	0,19	0,18
DCmd (x10 ⁵ cel mL ⁻¹)	110,2±75 ^a	9,9±10 ^e	29,5±12 ^{de}	7,3±4 ^e	81,5±58 ^{ab}	61,4±39 ^{bc}	66,2±36 ^b
DCM (x10 ⁵ cel mL ⁻¹)	217,02 ^a	31,5 ^{ef}	48,5 ^e	19,3 ^f	194,6 ^b	163,3 ^c	131,2 ^d
CT (µm)	9,2±1 ^b	7,9±1 ^{bc}	7,4±1 ^c	8,1±1 ^{bc}	8,7±1 ^{bc}	11,1±1,2 ^a	11,1±0,8 ^a
VC (µm ³)	6,6±3 ^{bc}	4,9±4 ^c	4,3±2 ^c	3,8±3 ^c	4,2±2 ^c	14,3±7,6 ^a	10,6±4 ^{ab}
COT (pg cel ⁻¹)	0,8±0,4 ^{bc}	0,6±6 ^c	0,5±0,2 ^c	0,5±0,3 ^c	0,5±0,2 ^c	1,9±1,1 ^a	1,4±0,6 ^{ab}
Clorofila- <i>a</i> (mg L ⁻¹)	221,8±106 ^{ab}	110,2±71 ^{ab}	166,9±106 ^{ab}	48,4±18 ^b	149,6±85 ^{ab}	266,8±129 ^a	204,4±97 ^{ab}
CC (% peso seco)	14,2±12 ^b	21,1±19 ^b	25,1±12 ^b	35,6±10 ^a	14,4±9 ^b	17,2±10 ^b	17±7 ^b
PS (pg.cel ⁻¹)	96,7±52 ^b	166,4±158 ^b	225,1±59 ^b	440,7±177 ^a	116,1±74 ^b	130,8±13 ^b	117,5±45 ^b

Tempo de duplicação; TC: Taxa de crescimento; DCmd: Densidade celular média; DCM: Densidade celular máxima; CT: Comprimento total; VC: Volume celular; COT: Carbono orgânico total; CC: Conteúdo de cinzas; PS: Peso seco. Letras iguais nas linhas significam que não ocorreu diferenças significativas (p>0,05).

Tabela 2. Composição dos nutrientes (mg L⁻¹) em diferentes meios de cultura utilizado, onde: Ec = *Eichhornia crassipes*, Ea = *Eichhornia azurea*, Lm = *Lemna minor*, Af = *Azolla filiculoides*, Sa = *Salvinia auriculata* (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018a, 2018b).

Composição	Meios de Cultura						
	CHU ₁₂	NPK	Ec	Ea	Lm	Af	Sa
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	400	60
P	-	-	56,4.10 ²	70,7.10 ²	2.10 ²	200	60
K	-	-	73.10 ³	76,2.10 ²	2.10 ³	3.10 ³	2.10 ³
Ca	-	-	36,9	68,8	550	16.10 ³	27.10 ²
Mg	-	-	23	4,3	190	110	8
S	-	-	3.10 ⁻¹	3.10 ⁻²	4.10 ⁻²	1.10 ⁻²	12.10 ⁻³
B	-	-	34.10 ⁻²	41.10 ⁻²	21.10 ⁻³	-	-
Cu	-	-	18.10 ⁻²	22.10 ⁻²	31.10 ⁻³	51.10 ⁻³	-
Fe	-	-	6.10 ⁻²	56.10 ⁻²	71.10 ⁻³	16.10 ⁻³	-
Zn	-	-	3.10 ⁻²	12.10 ⁻²	0,1	51.10 ⁻³	-
Tiamina	-	7	7	7	7	7	7
Vit B ₂	-	7	7	7	7	7	7
Vit B ₆	-	5	5	5	5	5	5
Vit B ₁₂	-	33.10 ³	33.10 ³	33.10 ³	33.10 ³	33.10 ³	33.10 ³
Vit H	-	10	10	10	10	10	10
Biotina (B ₁)	-	1	1	1	1	1	1
Ca (NO ₃)	3,0	-	-	-	-	-	-
NaCO 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	-	-	-	-	-	-

- = não detectado pelo método.

**COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO NO
CULTIVO DE *ANKISTRODESMUS GRACILIS* EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA**

*Manuscrito a ser enviado a *Frontiers Plant Science*, as normas do artigo estão de acordo com a revista.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar o sistema de cultivo autotrófico e mixotrófico no cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em sete meios de cultura, o meio comercial CHU₁₂ o meio de fertilizante inorgânico (NPK 20:5:20) e cinco meios de macrófitas: *Azolla filiculoides*, *Eichhornia azurea*, *E. crassipes*, *Lemna minor* e *Salvinia auriculata*. A fonte de carbono foi adicionada ao cultivo mixotrófico foi o melaço de cana-de-açúcar concentração de 1,5g L⁻¹ na forma “in natura” e hidrolisada. Diferenças significativas ($p>0,5$) foram encontradas em relação ao crescimento, as maiores densidades celulares foram encontradas no cultivo autotrófico, somente o meio comercial CHU₁₂ apresentou a maior densidade celular no cultivo mixotrófico “in natura” com 313×10^5 cels. mL⁻¹. Elevados teores de proteína foram encontrados no cultivo autotrófico, diferentemente dos teores de lipídio que foram mais elevados em cultivo mixotrófico “in natura”. O nitrogênio inorgânico total tendeu a apresentar os maiores teores no cultivo mixotrófico (“in natura” e hidrolisado) variando de $0,4 \pm 0,1$ mg L⁻¹ (*E. azurea* hidrolisado) a $4,6 \pm 0,6$ mg L⁻¹ (NPK “in natura”), o fósforo total apresentou resultados inversamente do nitrogênio inorgânico total, obtendo elevados teores em cultivo autotrófico variando de $0,5 \pm 0,1$ mg L⁻¹ (CHU₁₂) a $8,6 \pm 0,1$ mg L⁻¹ (*E. azurea*). Através dos resultados obtidos foi possível observar que o cultivo autotrófico apresentou melhores resultados de crescimento e proteína, porém o uso da ecotecnologia como cultivo mixotrófico, deve ser empregada no cultivo das microalgas, porém o sistema a ser adotado para o cultivo dependerá do objetivo a ser empregado, pois o cultivo mixotrófico tendeu a apresentar melhor resultados de lipídio e nitrogênio inorgânico total.

Palavras-chave: lipídio, proteínas, biomassa da microalga, aspectos biológicos e bioquímico, fontes de carbono.

ABSTRACT

The aim of the present research was to compare between autotrophic and mixotrophic cultures for the microalgae *Ankistrodesmus gracilis*. Seven culture mediums were employed for the task: the commercial medium CHU12, an inorganic fertilizer medium (NPK 20:5:20) and five other mediums composed of the following macrophyte: *Azolla filiculoides*, *Eichhornia azurea*, *E. crassipes*, *Lemna minor* and *Salvinia auriculata*. The carbon source employed for the mixotrophic culture was cane molasses (1,5g L⁻¹), in two forms: hydrolised and in natura. Significant differences ($p < 0.05$) for the microalgae growth were observed. The highest cell density was observed in the autotrophic culture. Only the commercial medium presented high cell density when in mixotrophic culture, with in natura molasses (313×10^5 cells mL⁻¹). High protein content was observed in the autotrophic culture, while the mixotrophic in natura culture presented higher lipid content. The mixotrophic culture (both forms) presented higher inorganic nitrogen content, which ranged from 0.4 ± 0.1 mg L⁻¹ (*E. azurea* hydrolised) to 4.6 ± 0.6 mg L⁻¹ (NPK in natura). The total phosphorus was higher in the autotrophic culture, which ranged from 0.5 ± 0.1 mg L⁻¹ (CHU12) to 8.6 ± 0.1 mg L⁻¹ (*E. azurea*). The autotrophic culture presented better results on growth and protein content, however the employment of mixotrophic culture should not be discarded. Since the mixotrophic culture presented higher lipid and total inorganic nitrogen contents, the adopted system will depend on its aim.

.Key-words: lipid, proteins, microalgae biomass, biological and biochemical aspects, carbon sources.

INTRODUÇÃO

A indústria da aquicultura têm grande interesse nas microalgas unicelulares pois convertem a energia luminosa para a produção de biomassa tornando-se alimento disponível aos organismos aquáticos, além de produzir lipídios e proteínas (PEREZ-GARCIA et al., 2010).

Os fototróficos utilizam energia luminosa e os organotróficos derivam sua energia a partir da oxidação de substâncias orgânicas, entretanto, há uma ampla variedade de diferentes grupos taxonômicos que podem utilizar várias fontes de carbono e energia simultaneamente, denominado de mixotrófico (WILKEN et al., 2014).

Além das microalgas autotróficas, existem aquelas que podem crescer heterotroficamente ou seja, independentemente da luz, se houver fonte de carbono adequada, outras são mixotróficas, uma combinação das duas formas acima, ou seja o metabolismo autotrófico e heterotrófico são utilizados em conjunto, oxidando as fontes reduzidas de carbono disponíveis no meio (CECCHIN et al., 2018).

O cultivo fotoautotrófico é mais comum do que o cultivo mixotrófico, pois no segundo demanda mais trabalho e maior manuseio do cultivo. Mixotrofia pode ser encontrada em diversas microalgas e tem uma ampla estratégia nutricional, que irá depender da taxonomia e adaptação às condições de cultivo (WILKEN et al., 2014).

O uso simultâneo do carbono inorgânico (CO_2 – autotrófico) e substratos de carbono orgânico (heterotrófico) promove um efeito sinérgico de dois processos que eleva a produtividade permitindo a microalga crescer em qualquer tipo de ambiente (BHATNAGAR et al., 2011).

O carbono orgânico proveniente do cultivo mixotrófico é derivado de diversas fontes dentre elas o melaço de cana-de-açúcar, cujo suplemento envolvido é a glicose, acetato, xilose e outros carboidratos (MONDAL et al., 2017). O melaço de cana-de-açúcar provou ser uma fonte de carbono sustentável para numerosos microrganismos uma vez que incrementa o teor de lipídio nas células (LIU et al., 2013). Trabalhos utilizados com microalgas têm enfatizado que o cultivo mixotrófico é efetivo para aumentar biomassa e lipídio no entanto, outras espécies apresentam similar crescimento em sistemas autotrófico (CECCHIN et al., 2018).

O melhor sistema para produção de microalgas dependerá do objetivo do cultivo, bem como, das características da microalga. Grande parte dos estudos de cultivos são realizados em Chlorophyceae, em função dos compostos encontrados nestas microalgas, sendo o cultivo autotrófico o predominante principalmente, para a espécie *Ankistrodesmus gracilis* (SIPAÚBA-TAVARES; PEREIRA, 2008).

O objetivo deste estudo foi comparar os cultivos autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado) de *Ankistrodesmus gracilis* em diferentes meios de cultura (meio comercial, fertilizante inorgânico e de macrófitas).

MATERIAL E MÉTODOS

Microalga e Meios de Cultura

A cepa da microalga *Ankistrodesmus gracilis* utilizada nos experimentos foi cedida da coleção de cultura 005CH, isolada da represa do Broa (22°15' S e 47°19' W). O inóculo da microalga inicialmente foi cultivado em meio CHU₁₂ com a densidade de $2,4 \times 10^5$ cels mL⁻¹ em volumes de 250 mL. Posteriormente, os inóculos foram transferidos para o meio NPK em frascos de 2 L com densidade celular de $4,5 \times 10^5$ cels mL⁻¹. Ao atingir a fase exponencial, de crescimento (7 dias) a microalga foi transferida para recipientes de 2 L contendo os meios de cultura.

Foram utilizados sete meios de cultura: CHU₁₂ (comercial), NPK, 20:5:20 (fertilizante inorgânico) (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 1993) e meios de macrófitas de *Eichhornia crassipes* (Ec), *Eichhornia azurea* (Ea), *Lemna minor* (Lm), *Azolla* sp. (Az) e *Salvinia auriculata* (Sa) (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

Cultivo autotrófico

Para o cultivo autotrófico a microalga foi cultivada nos setes meios em temperatura constante de 22±2°C com intensidade de luz de 60 μmol m⁻² s⁻¹ em fotoperíodo de 24 horas. Este cultivo foi realizado sem fonte de carbono ou qualquer outra fonte de nutriente que não venha dos meios de cultura.

Cultivo mixotrófico

Para o cultivo mixotrófico, o melaço de cana utilizado neste estudo foi obtido através da empresa Melaços Brasileiros LTDA (Brasil). Sua composição baseia-se em 20% (p/p) de água, 8% (p/p) frutose, 7% (p/p) de glicose e íons metálicos tais como cálcio, potássio, sódio, ferro, magnésio, cobre, entre outros. O melaço foi usado em duas formas: bruto (“in natura”) e hidrolisado, neste caso, o melaço “in natura” foi diluído em água destilada e esterilizado em autoclave a 1atm durante 30 minutos. Para os testes com melaço hidrolisado foi adicionado 0,4% (m/m) de solução ácida (HCl 4 M) sendo incubado em manta térmica durante 20 minutos a 80°C para converter a sacarose em glicose e frutose. O melaço foi filtrado em bomba a vácuo para retirada de possíveis impurezas e esterilizado a 1atm durante 30 minutos. A concentração utilizada foi de 21

mL de melão em 1,4 L de água destilada, para a obtenção da concentração de $1,5\text{g L}^{-1}$ para o crescimento da microalga.

Crescimento

O crescimento da microalga foi avaliado durante 28 dias consecutivos, 1 mL de amostra foi removida e $2 \times 1\mu\text{L}$ de subamostra foi contada em um hemocitômetro de Neubauer, os dados da contagem foram expressos em números de células $\text{mL}^{-1} \times 10^5$. A taxa de crescimento (K) foi calculada através da fórmula proposta por Guillard (1973), $k = (3,322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$, onde: t = tempo; N= números de células (os sobrescritos denotam dados em momentos diferentes). O tempo de duplicação (DT) foi calculado a partir da fórmula: $DT = 1K^{-1}$, onde: DT = tempo de duplicação; $1K^{-1}$ = divisão por dia (GUILLARD, 1973). Cerca de 50 indivíduos foram mensurados em microscópio Leica DFC 295, as imagens foram analisadas em sistema LAS core (LAS V3.8) em objetiva micrométrica de 400X. O carbono orgânico total (TOC) foi calculado usando a fórmula de regressão: $C = 0,1204 \cdot V^{1,051}$ onde: C= teor de carbono em pg célula⁻¹; V= volume celular (ROCHA e DUCAN, 1985).

Parâmetros dos Meio de Cultura

Os parâmetros físicos e químicos dos meios de cultura foram realizados semanalmente em tréplica. O pH e condutividade elétrica (COND) do meio de cultura foram mensurados com uma sonda de multiparâmetros YSI 556 MPS. O nitrogênio inorgânico total (TIN) e o fósforo total (PT) foram quantificados em espectrofotômetro, seguindo a metodologia de Golterman et al. (1978) e Koroleff (1976). A clorofila-a (Chloro-a) foi extraída com álcool a 90% e quantificada a 663 nm e 750 nm de acordo com Nusch (1980).

Composição Bioquímica

A biomassa algal de cada meio de cultura foi centrifugada e liofilizada, para análise de lipídio (Lip) e proteína (Ptn) seguindo a metodologia proposta por A.O.A.C. (1990).

Análise Estatística dos Dados

Foi aplicado aos dados a análise de variância (ANOVA) com o programa de Statistica 8.0 para simples verificação entre os cultivos para cada meio de cultura individualmente (STATSOFT, 2007). Quando encontrada diferenças significativas

($p < 0,05$) foi aplicado o teste de Tukey. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

RESULTADOS

As maiores densidades celulares foram obtidas em meio autotrófico seguidas do cultivo “in natura”, exceto no meio de cultura NPK, onde o cultivo mixotrófico ficou abaixo de $31,5 \times 10^5$ cels. mL^{-1} terminando com a morte das células ao redor do 20º dia (Figura 18). No meio CHU_{12} foi observado a maior densidade celular no cultivo mixotrófico “in natura” com 313×10^5 cels. mL^{-1} , já no meio NPK as maiores ($p < 0,05$) densidades foram encontradas no cultivo autotrófico com 426×10^5 cels. mL^{-1} (Figura 18). O meio Lm obteve as maiores ($p < 0,05$) densidades com 473×10^5 cels. mL^{-1} em cultivo autotrófico, 204×10^5 cels. mL^{-1} em mixotrófico “in natura” e 194×10^5 cels. mL^{-1} no mixotrófico hidrolisado (Figura 18).

O cultivo autotrófico apresenta maiores parâmetros de crescimento para a microalga *A. gracilis* exceto em relação ao tempo de duplicação (DT) e a taxa de crescimento (K) que no meio CHU_{12} em cultivo mixotrófico “in natura” foi mais rápido com 2,7 dias o DT e $K=0,36$ (Tabela 3). O carbono orgânico total (TOC) e a densidade celular máxima (MD) também foram superiores ($p < 0,05$) no cultivo autotrófico, no entanto, no meio CHU_{12} em cultivo mixotrófico “in natura” *A. gracilis* apresentou maior densidade celular (313×10^5 cels. mL^{-1}) do que no cultivo autotrófico (304×10^5 cels. mL^{-1}) (Tabela 3).

Comparando os diferentes meios de cultura nos diferentes tipos de cultivo pode-se observar uma variedade enorme de valores, onde o DT, K e o MD foram superiores no meio CHU_{12} , exceto em cultivo autotrófico que MD foi superior no meio Lm com 473×10^5 cels. mL^{-1} . A concentração de Chloro-*a* foi superior no meio Az ($4 \pm 1.4 \text{ mg L}^{-1}$) e o TOC em meio CHU_{12} ($10 \pm 6 \text{ pg cel}^{-1}$), ambos em cultivo autotrófico (Tabela 3).

Comparando os teores de proteína entre os cultivos autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado), os maiores teores foram obtidos no cultivo autotrófico e os de lipídios em geral no mixotrófico. Os teores de proteína variaram de 20% de biomassa seca (Sa) a 46% de biomassa seca (NPK) em cultivo autotrófico, e de 15% biomassa seca (CHU_{12}) a 24% de biomassa seca (Ec) em cultivo mixotrófico “in natura” de 15% biomassa seca (CHU_{12}) a 25 % biomassa seca (Az) em cultivo mixotrófico hidrolisado (Figura 19). Os teores de proteína em cultivo autotrófico as concentrações diminuíram no final do experimento nos meios com plantas, já no meio CHU_{12} e NPK tiveram um

pequeno aumento variando de 45,3 a 47,2% de biomassa seca e de 45,4 a 47,2% de biomassa seca, respectivamente (Figura 19). Os teores de proteína no cultivo mixotrófico tenderam a aumentar ao final do experimento exceto nos meios Ea de 27,2 a 16,2% de biomassa seca na forma “in natura” e Lm de 25,4 a 16,6% de biomassa seca na forma “in natura” e de 22,8 a 22,5% de biomassa seca na forma hidrolisada entre o início (1º dia) e final (28º dia) de experimento, respectivamente (Figura 19).

Em relação aos teores de lipídios em cultivo mixotrófico (“in natura” e hidrolisado) também foram mais elevados no final do experimento exceto para o meio NPK com o teor inicial de 3,6% e final de 2,5% de biomassa seca na forma “in natura” e de 3,6% e 2,5% de biomassa seca na forma hidrolisada. Os teores lipídios variaram de 4,9% de biomassa seca (Ec) a 11% de biomassa seca (Az) em cultivo autotrófico e no cultivo mixotrófico de 3,1% de biomassa seca (NPK) a 14% de biomassa seca (Az) na forma “in natura” e de 3,2% de biomassa seca (NPK) a 12% de biomassa seca (Az) na forma hidrolisada (Figura 19). Já no cultivo autotrófico os teores de lipídio tenderam a diminuir do início para o final do experimento exceto para o meio Ea que variou de 5,5% de biomassa seca do início (1º dia) a 5,7% de biomassa seca no final do experimento (28º dia) e também, o meio Sa que aumentou do início (3,8% de biomassa seca) ao final (9,7% de biomassa seca) do experimento (Figura 9).

O pH foi alcalino e similar ($p>0,05$) entre os cultivos, em geral com concentrações médias acima de $7,6\pm 1,8$ (Ec) em cultivo autotrófico e de $7,8\pm 0,6$ (Ea) e $7,4\pm 0,7$ (Ea) em cultivo mixotrófico nas formas “in natura” e hidrolisada, respectivamente (Tabela 4).

A condutividade elétrica foi elevada em função das altas concentrações de TIN e TP, sendo maior no meio NPK em cultivo autotrófico e no cultivo mixotrófico hidrolisado com $1,6 \text{ mS cm}^{-1}$. Os meios de macrófitas mantiveram o mesmo padrão em condutividade elétrica e o meio comercial CHU₁₂ apresentou diferentes valores nos diferentes cultivos (Tabela 4).

Em relação as concentrações de nitrogênio inorgânico total (TIN) no cultivo mixotrófico “in natura” foram elevadas no meio NPK com média de $4,6\pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e no meio CHU₁₂ $2,2\pm 1,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($p<0,05$). Em geral, as concentrações de TIN foram acima de $0,6\pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Ea) em cultivo autotrófico e de $0,5\pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Ea e Lm) e $0,4\pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Ea) em cultivo mixotrófico nas formas “in natura” e hidrolisada, respectivamente. O meio NPK e os meios de Lm e Az apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os cultivos (Tabela 4).

Elevadas concentrações do fósforo total (PT) foram encontradas no cultivo autotrófico com $8,2 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (NPK) e $8,6 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Ea). No cultivo mixotrófico o meio NPK apresentou também elevadas concentrações, com $8,7 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ na forma “in natura” e $6,1 \pm 0,05$ na forma hidrolisada (Tabela 4). A concentração de PT no meio CHU₁₂ em cultivo mixotrófico foi 3 vezes mais elevada do que no cultivo autotrófico.

DISCUSSÃO

A microalga *A. gracilis* obteve elevada biomassa no cultivo autotrófico sendo que, no meio CHU₁₂, entre 10º e 17º dia de experimento as maiores densidades foram observadas em cultivo mixotrófico na forma “in natura”. Cecchin et al. (2018) cultivando *Chlorella sorokiniana* verificaram que no meio de cultura contendo fontes reduzidas de carbono como acetato, a produção de biomassa, densidade celular e produtividade diária desta microalga foi maior em cultivo mixotrófico do que autotrófico. Segundo Perez-Garcia et al. (2010) cada esquema de cultivo tem sua condição específica e depende do objetivo final do cultivo se está relacionado com produção de biomassa, absorção de nutrientes ou produção de lipídios.

Elevados teores de TIN foram obtidos no cultivo mixotrófico quando comparado ao autotrófico, exceto nos meios de Ea e Lm. Perez-Garcia et al. (2010) observaram que absorção de amônia foi maior em condições mixotróficas do que em cultivo autotrófico no cultivo de *Chlorella vulgaris*, relacionando o fato de que o ATP e NADPH são compostos metabólicos disponíveis e não estão associados na assimilação do carbono em condições autotróficas, havendo uma volatilização da amônia em pH acima de 8,5. No entanto, no estudo realizado o pH esteve entre $7,6 \pm 1,8$ a $9,3 \pm 1,8$ no cultivo autotrófico e de $7,4 \pm 0,7$ a $11,5 \pm 2,2$ em mixotrófico e o teor de TIN foi elevado sendo que em cultivo autotrófico nos meios NPK, CHU₁₂ e Az apresentaram concentrações mais baixas que no cultivo mixotrófico.

Os elevados teores de TIN e PT foram obtidos neste estudo, o fósforo apresentou a maiores concentrações nos meios de macrófitas em cultivo autotrófico. O oposto foi obtido em cultivo mixotrófico, que apresentou maiores teores de TIN. A adição de fósforo aumenta a remoção de nitrato do meio estimulando a desnitrificação mixotrófica (FAN et al., 2018).

Os teores de clorofila-*a* e TOC foram maiores no cultivo autotrófico do que no mixotrófico com a densidade celular máxima duas a três vezes maior em todos os meios de cultura utilizados. O carbono orgânico geralmente leva ao decréscimo do teor de

clorofila-*a* e mudanças em outros pigmentos como a luteína (VAN WAGENEN et al., 2015). Wilken et al. (2014) trabalhando com *Ochromonas danica* verificaram uma redução no teor de pigmento total com modificações na composição do pigmento e do aparelho fotossintético durante o crescimento mixotrófico desta microalga. Perez-Garcia et al. (2010) verificaram a superioridade do cultivo autotrófico em relação ao tempo de duplicação (TD), taxa de crescimento (K), biomassa produzida e produção de células por quantidade de amônia consumida. Neste estudo, o tempo de duplicação foi mais rápido no cultivo autotrófico nos meios com macrófitas, já nos meios CHU₁₂ e NPK foi um pouco mais elevado do que no cultivo mixotrófico.

Vários fatores influenciam no crescimento das microalgas incluindo disponibilidade de nutrientes, luz (qualidade e quantidade), pH, temperatura e densidade do inóculo inicial (LI et al., 2014). O cultivo mixotrófico utiliza tanto luz quanto fontes de carbono para fornecer elevada eficiência de energia do que outras formas de cultivo, sendo efetiva na produção de biomassa de microalgas (DHULL et al., 2014).

Os teores de proteína neste estudo foram mais elevados no cultivo autotrófico do que no mixotrófico e o oposto foi observado para o lipídio. Proteína é conhecida como um fator crítico para a divisão celular e clorofila-*a* na microalga, e, as condições mixotróficas afetam de forma diferente o teor de lipídio e proteína nas microalgas. De acordo com Perez-Garcia et al. (2010) o teor de proteína em *Chlorella vulgaris* foi negativamente correlacionado como teor de lipídio. No entanto, a adição de glicose como substrato de carbono orgânico na concentração de 15 g L⁻¹ elevou a biomassa e teor de proteína da microalga *Dunaliella salina* (KADKHODAEI et al., 2015).

Neste estudo, foi observado elevada biomassa em cultivo autotrófico e isto pode explicar os baixos teores de lipídios neste tipo de cultivo, uma vez que a elevada biomassa não está associada com alto teor de lipídio. Segundo Cheah et al. (2018), acumulação do lipídio inicia após o esgotamento dos nutrientes que são utilizados no crescimento da microalga, principalmente o N que promove a produção de lipídios e carboidratos. Isto explica o comportamento de *A. gracilis*, que no final do experimento apresentou elevados teores de lipídio, principalmente, no cultivo mixotrófico onde a biomassa algal foi menor quando comparada ao cultivo autotrófico. O acúmulo de lipídio depende de vários fatores como condições de crescimento, idade da cultura, cepa da microalga, suplemento de luz, pH e disponibilidade de nutrientes, entre outros (CHEAH et al., 2018).

O cultivo autotrófico é um método tecnicamente e economicamente viável, pois neste cultivo utilizasse luz e nutrientes dos meios de cultura, porém, o aproveitamento de

diversos meios de cultura como resíduos orgânicos, resíduos suínos entre outros, crescendo nos últimos anos para o cultivo de microalgas no intuito do aproveitamento destes resíduos biológicos, como é o caso dos meios de macrófitas. Assim o uso da ecotecnologia deve ser empregada como ferramenta na produção de microalga cujo o tipo de sistema a ser adotado para o cultivo dependerá do objetivo a ser empregado na produção desses microrganismos.

CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- DHULL, N.P.; SONI, R.; RAHI, D.K. and SONI, S.K. (2014). Evaluation of autotrophic and mixotrophic regimen *Chlorella pyrenoidosa* cells in various wastes water for its biochemical composition and biomass production. *PeerJ PrePrints*, 1 (2), 68. doi.org/10.7287/peerj.preprints.681v1.
- FAN, C.; WANG, P.; ZHOU, W.; WU, S.; HE, S.; HUANG, J. and CAO, L. (2018). The influence of phosphorus on the autotrophic and mixotrophic denitrification. *Science of The Total Environment*, 643, 127-133. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.185.
- GOLTERMAN H.L.; CLYMO R.S. and OHNSTAD, M.A.M. (1978). Methods for physical and chemical analysis of fresh water. *Blackwell Scientific Publication*, 1 Ltd. 60 - 62.
- GULLARD, R.R.L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). (1973). *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*, London: Cambridge University Press, 289 - 311.
- KADKHODAEI, S.; ABBASILIASI, S.; SHUN, T.J.; MASOUMI, H.F.; MOHAMED, M.S.; MOVAHEDI, A. and ARIFF, A.B. (2015). Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic conditions using response surface methodology. *RSC Advances*, 5 (48), 38141-38151. doi.org/10.1039/c5ra04546k
- KOROLEFF, F. (1976). *Determination of nutrients*. In Grassnof, K. (Ed.). *Methods of seawater analysis*, Verlag Chemie.
- LI, Y.R.; TSAI, W.T.; HSU, Y.C.; XIE, M.Z. and CHEN, J.J. (2014). Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*, 52, 371-376. doi.org/
- LIU, B.; and BENNING, C. (2013). Lipid metabolism microalgae distingue she itself. *Curr Opin Biotechnol*, 24, 300 - 309. doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.008.
- MONDAL, M.; GOSWAMI, S.; GHOSH, A.; OINAM, G.; TIWARI, O.N.; DAS, P. end HALDER, G.N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *Biotech*, 7 (2), 99. doi.org/10.1007/s13205-017-0727-4.
- NUSCH, E.A. (1980). Of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, 14 (1), 14 – 36.
- PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L.E.; HERNANDEZ, J.P. and BASHAN, Y. (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of chlorella vulgaris immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of phycology*, 46 (4), 800-812. doi.org/10.1111/j.529-8817.2010.00862.x
- ROCHA, O. and DUNCAN, A. (1985). The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research*, 7 (2), 279 – 294. doi.org/10.1093/plankt/7.2.279
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. and ROCHA, O. (1993). Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I-algas clorofíceas. *Biotemas*, 6 (1), 93 – 106. doi.org/10.5007/%25x
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. and PEREIRA, A.M.L. (2008). Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). *Brazilian Journal of Biology*, 68 (4), 875 - 883. doi.org/10.1590/S1519-69842008000400025

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

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

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

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

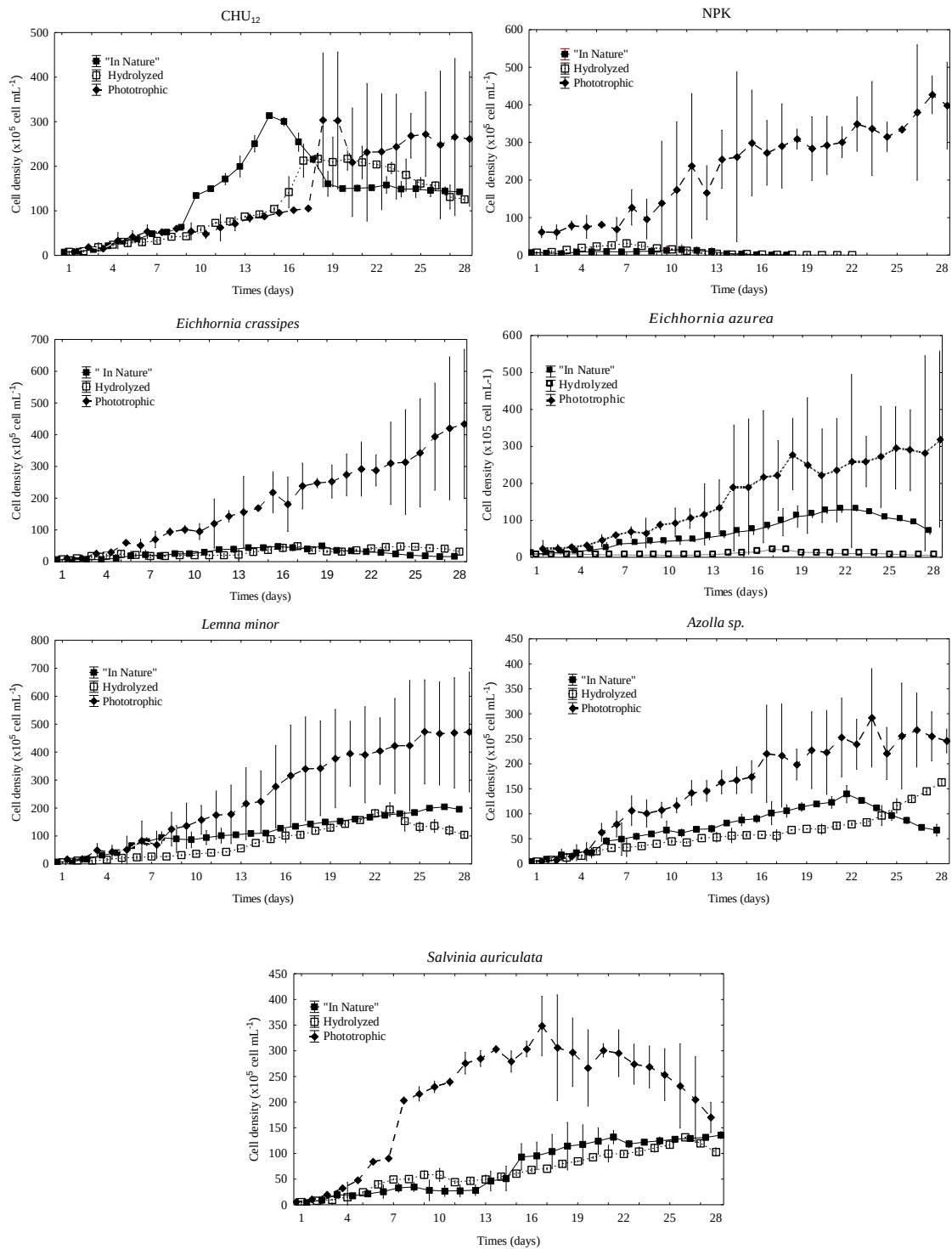


Figura 18. Curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em cultivo autotrófico, mixotrófico ("in natura" e hidrolisado), nos diferentes meios de cultura.

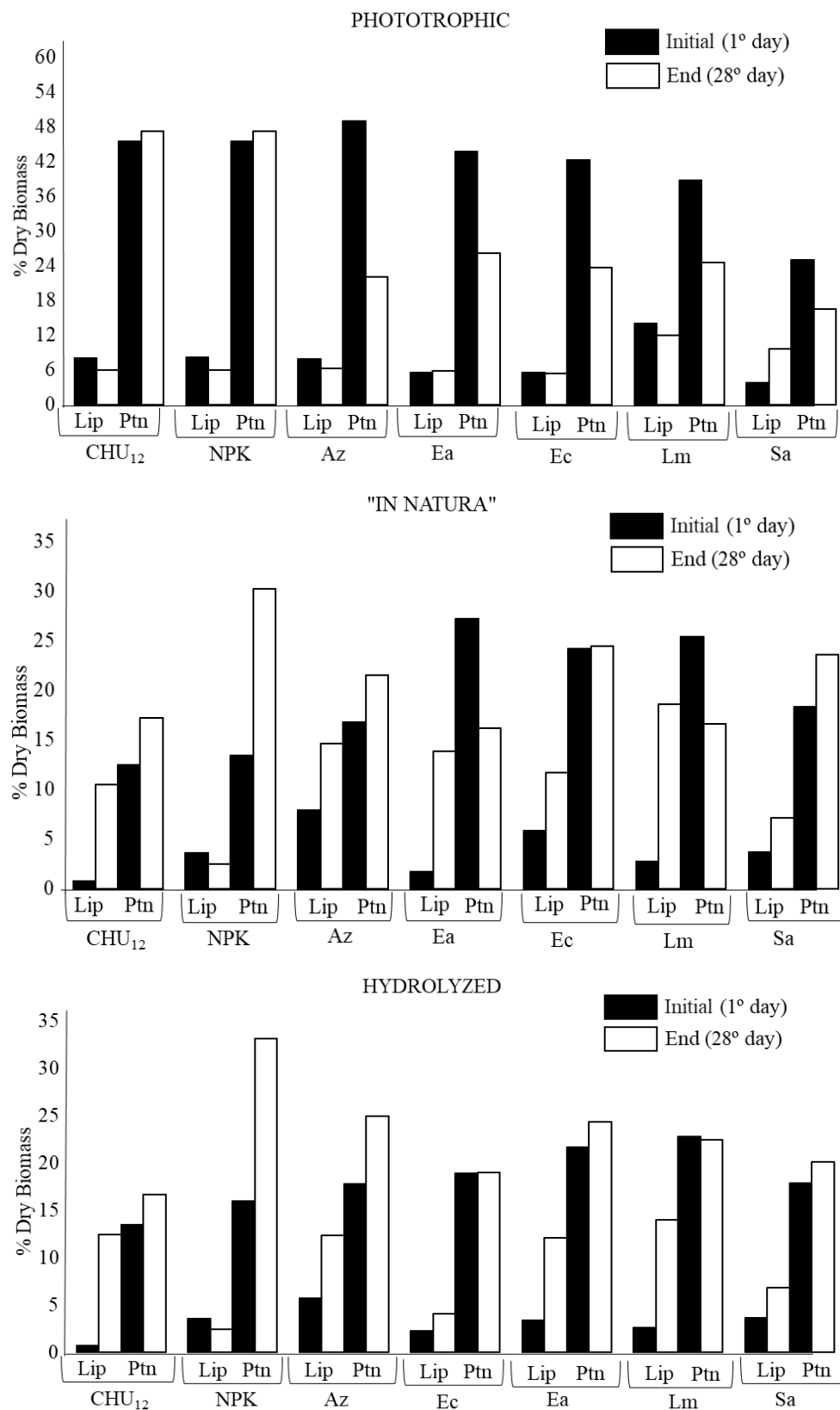


Figura 19. Teores de lipídio e proteína (% de biomassa seca) na fase inicial (1° dia) e final (28° dia) do experimento nos cultivos autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado) nos diferentes meios de cultura.

Tabela 3. Parâmetros biológicos da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em cultivo autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado) nos diferentes meios de cultura.

Cultura Media	Parameters				
	Chloro- <i>a</i>	TOC	DT	K	MD
Auototrophic					
CHU ₁₂	0.7±0.3	10±6	3.3	0.31	304
NPK	1.6 ± 0.8	8.5±4	9.3	0.11	426
Az	4.0±1.4	4.9±0.7	3.8	0.19	292
Ea	1.6±0.6	3.1±1	7.4	0.14	319
Ec	1.3±0.7	2.8±1	5	0.20	434
Lm	3.9±0.5	4.4±0.7	5	0.26	473
Sa	0.4±0.1	1.4±0.4	2.7	0.36	348
Mixotrophic					
“In nature”					
CHU ₁₂	0.1±0.04	1.8±0.8	2.7	0.36	313
NPK	0.06±0.05	0.6±0.2	9.1	0.11	14
Az	0.2±0.1	1.7±0.2	4.3	0.23	139
Ea	0.1±0.08	0.6±0.1	5.6	0.18	128
Ec	0.08±0.04	0.8±0.1	6.4	0.16	49
Lm	0.1±0.1	0.8±0.6	5.5	0.18	204
Sa	0.2±0.1	0.9±0.2	5.6	0.18	135
Hydrolyzed					
CHU ₁₂	0.2±0.1	0.8±0.5	3.2	0.24	217
NPK	0.1±0.07	0.6±0.2	3.8	0.3	31
Az	0.2±0.1	1.9±0.3	5.2	0.19	163
Ea	0.04±0.01	0.5±0.2	9.1	0.11	19
Ec	0.1±0.1	0.5±0.2	6.1	0.16	47
Lm	0.1±0.08	0.5±0.1	4.6	0.22	194
Sa	0.2±0.1	1.4±0.1	5.4	0.18	131

Chloro-*a* = Clorofila-*a* (mg L⁻¹); TOC = Carbono Orgânico Total (pg. cel⁻¹); DT = Tempo de duplicação (dias); K = taxa de crescimento (K); MD = densidade celular máxima (x10⁵ cels. mL⁻¹)

Tabela 4. Avaliação do nitrogênio total – TIN (mg L⁻¹), Fósforo Total – TP (mg L⁻¹), Condutividade elétrica - COND (mS cm⁻¹) e pH dos meios de cultura em cultivo autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado).

Cultura Media	Parameters			
	TIN	TP	COND	pH
Auototrophic				
CHU ₁₂	1.1±0.8 ^a	0.5±0.1 ^a	0.6±0.03 ^b	8.5±2.2 ^a
NPK	1.5±0.2 ^b	8.2±0.1 ^a	1.6±0.1 ^a	8.6±0.3 ^a
Az	0.7±0.6 ^b	4.3±0.08 ^a	0.5±0.05 ^b	8.7±1.1 ^a
Ea	0.6±0.2 ^a	8.6±0.1 ^a	0.4±0.1 ^b	7.6±1.8 ^a
Ec	1.7±0.5 ^a	6.4±0.1 ^a	0.6±0.1 ^a	9.3±1.8 ^a
Lm	0.9±0.4 ^b	5.7±0.05 ^a	0.4±0.1 ^b	8.7±0.8 ^a
Sa	1.5±0.5 ^a	1.6±0.04 ^a	0.6±0.1 ^a	8.3±1 ^a
Mixotrophic				
“In nature”				
CHU ₁₂	2.2±1.1 ^a	5.1±0.3 ^a	0.9±0.07 ^a	9.3±2.4 ^a
NPK	4.6±0.6 ^a	8.7±0.1 ^a	1.5±0.1 ^a	8.7±3.1 ^a
Az	1.4±0.8 ^a	3.1±0.08 ^b	0.7±0.04 ^a	8.3±1.2 ^a
Ea	0.5±0.5 ^a	1.8±0.1 ^b	0.7±0.1 ^a	7.8±0.6 ^a
Ec	1.4±0.2 ^a	4.5±0.1 ^b	0.6±0.06 ^a	10.3±1.2 ^a
Lm	0.5±0.2 ^b	1.4±0.1 ^c	0.6±0.08 ^a	8.2±0.1 ^{ab}
Sa	1.6±0.7 ^a	0.9±0.05 ^b	0.8±0.1 ^a	9.3±1.3 ^a
Hydrolyzed				
CHU ₁₂	1.6±0.4 ^a	3.6±0.2 ^a	1±0.2 ^a	11.8±2.2 ^a
NPK	1.9±0.7 ^b	6.1±0.05 ^b	1.6±0.3 ^a	10.02±2.6 ^a
Az	1.3±0.1 ^a	2.8±0.6 ^b	0.6±0.07 ^a	7.7±2.6 ^a
Ea	0.4±0.1 ^a	1.9±0.7 ^b	0.4±0.01 ^b	7.4±0.7 ^a
Ec	1.3±0.2 ^a	3.1±0.3 ^c	0.7±0.1 ^a	11.3±2.1 ^a
Lm	1.3±0.1 ^a	2.8±1 ^b	0.4±0.05 ^b	7.5±0.7 ^b
Sa	1.3±0.8 ^a	1.4±0.7 ^{ab}	0.6±0.06 ^a	8.95±0.1 ^a

Letras iguais nas colunas significam que não ocorreu diferenças significativas (p>0,05).