



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
LABORATÓRIO DE PLÂNCTON
CURSO DE OCEANOGRAFIA

NATHANIEL GOMES DE OLIVEIRA

**CULTIVO DA MICROALGA DE ALTO VALOR ECONÔMICO *Nannochloropsis*
oceanica EM MEIO ALTERNATIVO UTILIZANDO MELAÇO DE CANA COMO
SUBSTRATO ORGÂNICO**

FORTALEZA

2019

NATHANIEL GOMES DE OLIVEIRA

CULTIVO DA MICROALGA DE ALTO VALOR ECONÔMICO *Nannochloropsis oceanica* EM MEIO ALTERNATIVO UTILIZANDO O MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

Monografia apresentada ao curso de oceanografia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares

Coorientador: Dra. Tallita Cruz Lopes Tavares Normando

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48c Oliveira, Nathaniel Gomes de.
Cultivo da microalga de alto valor econômico *Nannochloropsis oceanica* em meio alternativo utilizando melão de cana como substrato orgânico / Nathaniel Gomes de Oliveira. – 2019.
64 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares.
Coorientação: Profa. Dra. Tallita Cruz Lopes Tavares Normando.
1. Microalgas. 2. *Nannochloropsis oceanica*. 3. Melão de cana-de-açúcar. 4. Mixotrofia. 5. Meios alternativos. I. Título.

551.46

CDD

NATHANIEL GOMES DE OLIVEIRA

CULTIVO DA MICROALGA DE ALTO VALOR ECONÔMICO *Nannochloropsis oceanica* EM MEIO ALTERNATIVO UTILIZANDO O MELAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

Monografia apresentada ao curso de oceanografia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares.

Coorientador: Dra. Tallita Cruz Lopes Tavares Normando

Aprovada em: 10 / 12 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Hortência de Sousa Barroso
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Pedro Henrique Gomes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meu pais, Suely e De Assis, e às minhas
irmãs.

AGRADECIMENTOS

À Tallita pela paciência, ajuda e excelente orientação.

Ao Professor Marcelo e todo o pessoal do Laboratório de Plâncton do Labomar, por permitirem que esse trabalho fosse realizado e pela ajuda sempre que necessário.

Aos professores, técnicos e alunos dos Laboratórios Equal, Lacor e Cedecam, pela orientação, disponibilidade e hospitalidade.

À Jonathan, Gustavo, Paulo Sávio e Washington, pelas conversas descontraídas e amizade incondicional.

À Bruna Letícia, pelo companherismo, incentivo e apoio em todos os momentos.

À Gabriel, Marina, Andrezza, Camila, Amanda, Lorena, Victor, Derley e todas as excelentes pessoas que conheci ao longo da graduação, pela necessárias desopiladas e apoio.

Aos meu tutores e companheiros do PET Oceanografia, pelo engradecimento profissional e pessoal.

Aos meus pais e irmãs, pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos difíceis.

Aos professores e servidores do Labomar, que muito ajudaram na minha formação.

“If you wish to make an apple pie from scratch, you must first invent the universe.”

-Carl Sagan.

RESUMO

O cultivo de microalgas tem se mostrado uma alternativa na produção de diversos compostos bioquímicos que podem ser utilizados na indústria do biodiesel, biomedicina, aquacultura, dentre outras. A produção em larga escala ainda não é economicamente viável devido principalmente aos altos custos de produção associados à necessidade de utilização de meios de cultura complexos. Por isso, é fundamental pesquisas em meios de culturas alternativos e de baixo custo. O objetivo desse trabalho foi de avaliar o crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica* em cultivos autotróficos, mixotróficos e heterotróficos utilizando um meio alternativo composto por fertilizantes agrícolas suplementado com melão de cana-de-açúcar. Foram testados 13 tratamentos diferentes em que se variou a concentração de melão de cana (0; 0,25 g/L; 0,50 g/L e 0,75 g/L) e a intensidade luminosa (escuro, 100% e 50%) ao longo de seis dias, ao longo dos quais foram medidos os valores de pH, densidade celular e peso seco diariamente. O crescimento em meio f/2 (GUILLARD, 1975) foi utilizado como controle. O meio fertilizante sem melão de cana não mostrou bom desempenho no crescimento da espécie testada em comparação ao meio f/2. Porém, o acréscimo ao meio fertilizante de melão de cana em uma concentração baixa de 0,25 g/L atuou no melhoramento do cultivo autotrófico da espécie testada, atingindo valores estatisticamente iguais aos medidos nos cultivos com a utilização do meio f/2. O aumento da concentração de melão de cana nos cultivos não resultou em aumento no crescimento da microalga, possivelmente devido à um maior escurecimento do meio de cultivo e consequente redução na luminosidade incidente sobre as células e um maior crescimento de bactérias heterotróficas no meio. Contudo, nesses cultivos foi observado um aumento do peso seco condizente com a diminuição do crescimento após quatro dias de cultivo, o que pode indicar acúmulo de reservas lipídicas induzido por condições sub-ótimas, o que necessita ser avaliado posteriormente devido à possível aplicação biotecnológica. Os cultivos realizados com pouca ou nenhuma iluminação, representando o cultivo mixotrófico e heterotrófico, também não foram eficientes, mostrando que a microalga não conseguiu utilizar o melão de cana como fonte de carbono orgânico e que, possivelmente, o melão atuou como fonte alternativa de nutrientes essenciais para o metabolismo autotrófico da espécie testada, como o manganês e as vitaminas B₁ e H. Portanto, a utilização do meio fertilizante com adição de melão de cana-de-açúcar em baixas concentrações no cultivo autotrófico da microalga *Nannochloropsis oceanica* se mostrou uma opção viável na substituição do meio f/2.

Palavras-chave: *Nannochloropsis oceanica*. Melão de cana-de-açúcar. Meios alternativos.

ABSTRACT

Microalgae cultivation has proven to be an alternative in the production of several biochemical compounds that can be used in the industry of biodiesel, biomedicine, aquaculture, among others. Large scale production is not yet economically viable mainly due to the high production costs associated with the need to use complex culture media. Therefore, research of alternative and low-cost culture media is crucial. The objective of this research was to evaluate the growth of *Nannochloropsis oceanica* microalgae in autotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultures using an alternative medium composed of agricultural fertilizers supplemented with sugarcane molasses. Three different treatments were tested, varying the concentration of sugarcane molasses (0; 0,25 g/L; 0,50 g/L and 0,75 g/L) and the light intensity (dark, 100% and 50%) over six days, during which the values of pH, cell density and dry weight were measured daily. Growth in f/2 medium (GUILLARD, 1975) was used as a control. Fertilizer medium without sugarcane molasses did not show good performance in the growth of the tested species compared to medium f/2. However, the addition of sugarcane molasses in the fertilizer medium at a low concentration of 0,25 g/L improved the autotrophic cultivation of the tested species, reaching statistically equal values to those measured in the cultures using the f/2 medium. Increasing the concentration of sugarcane molasses in the cultures did not result in an increase in microalgae growth, possibly due to a greater darkening of the culture medium and consequent reduction in the incident cell brightness and a higher growth of heterotrophic bacteria in the medium. However, in these cultures an increase in dry weight was observed, consistent with the decrease in growth after four days of cultivation, which may indicate accumulation of lipid reserves induced by suboptimal conditions, which needs to be evaluated later due to possible biotechnological application. Cultures performed in low light or darkness, representing mixotrophic and heterotrophic cultivation, were also not efficient, showing that microalgae could not use sugarcane molasses as a source of organic carbon and that, possibly, molasses acted as an alternative source of nutrients essential for the autotrophic metabolism of the tested specie, such as manganese and vitamins B₁ and H. Therefore, the use of fertilizer medium with sugarcane molasses at low concentrations in the autotrophic cultivation of microalgae *Nannochloropsis oceanica* proved to be an option feasible when replacing the f/2 medium.

Keywords: *Nannochloropsis oceanica*. Sugarcane molasses. Alternative medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrando os metabolismos autotróficos, mixotróficos e heterotróficos	19
Figura 2 – Produção de <i>Nannochloropsis</i> sp. em larga escala no Deserto do Novo México, Texas (EUA)	20
Figura 3 – Fotomicrografia de <i>Nannochloropsis oceanica</i>	311
Figura 4 – Aspecto dos fotobiorreatores com meio fertilizante e inclusão de 0, 0.25, 0.50 e 0.75 g/L de melação de cana-de-açúcar	333
Figura 5 – Aspecto do inóculo de <i>Nannochloropsis</i> oceânica crescido por 15 dias.....	355
Figura 6 – Aspecto da solução estoque de melação de cana-de-açúcar utilizada para preparação das condições experimentais testadas.....	377
Figura 7 – Aspecto das soluções estoque de fertilizantes agrícolas utilizados na preparação dos tratamentos testados.....	388
Figura 8 – Aspecto da câmara de Neubauer observado ao microscópio, com destaque (quadrados pretos sólidos) dos campos contados no experimento.....	40
Figura 9 – Aspecto da biomassa concentrada de <i>N. oceanica</i> ao final dos tratamentos.....	41
Figura 10 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) nos tratamentos com meio f/2 e meio fertilizante ao longo de seis dias de tratamento. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$)..	444
Figura 11 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) medidos ao longo dos experimentos à plena iluminação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$)..	477
Figura 12 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) medidos ao longo dos experimentos à meia iluminação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$)..	50
Figura 13 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) medidos ao longo dos experimentos à sem iluminação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$)..	52
Figura 14- Densidade celular (a) e peso seco (b) medidos ao final de seis dias em todas as condições experimentais testadas.	Erro! Indicador não definido. 4

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nutrientes e suas funções no metabolismo das microalgas.....	23
Tabela 2- Meio f/2 (Guillard, 1975)	255
Tabela 3 - Solução estoque de metais traço	266
Tabela 4 - Solução estoque de vitaminas.....	26
Tabela 5 - Meio fertilizante (YAMASHITA; MAGALHÃES, 1984)	266
Tabela 6 - Composição do melaço de cana-de-açúcar.....	30
Tabela 7 - Tratamentos	36
Tabela 8 - Solução estoque de vitaminas modificada.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Microalgas	18
2.1.1	<i>Metabolismo autotrófico e heterotrófico</i>	18
2.1.2	<i>Metabolismo mixotrófico</i>	19
2.2	Cultivo de microalgas	19
2.2.1	<i>Compostos bioquímicos produzidos por microalgas</i>	20
2.3	Parâmetros nos cultivos de microalgas	21
2.3.1	<i>Iluminação</i>	22
2.3.2	<i>Nutrientes presentes no meio de cultivo</i>	23
2.3.3	<i>pH</i>	24
2.4	Viabilidade econômica dos cultivos de microalgas	24
2.4.1	<i>Custos associados aos nutrientes</i>	25
2.4.2	<i>Melhoria da produção pelo uso de cultivos heterotróficos</i>	27
2.4.3	<i>Melhoria da produção pelo uso de cultivos mixotróficos</i>	28
2.4.4	<i>Fontes alternativas de carbono orgânico</i>	29
2.5	Melaço de cana-de-açúcar	30
2.6	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Montagem dos fotobiorreatores	33
4.2	Condições de cultivo	34
4.3	Preparação dos meios de cultivo	36
4.4	Avaliação dos cultivos	38
4.4.1	<i>Densidade celular</i>	39
4.4.2	<i>pH e peso seco</i>	39
4.4.3	<i>Tratamentos estatísticos dos dados e concentração da biomassa para posterior análise bioquímica</i>	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Substituição do meio f/2 por meio fertilizante	42

5.1.1	<i>Densidade celular</i>	42
5.1.2	<i>Peso seco</i>	42
5.1.3	<i>pH</i>	42
5.2	Meio fertilizante com adição de melaço de cana-de-açúcar à plena iluminação	45
5.2.1	<i>Densidade celular</i>	45
5.2.2	<i>Peso seco</i>	45
5.2.3	<i>pH</i>	45
5.3	Meio fertilizante com adição de melaço de cana-de-açúcar à meia iluminação	48
5.3.1	<i>Densidade celular</i>	48
5.3.2	<i>Peso seco</i>	48
5.3.3	<i>pH</i>	48
5.4	Meio fertilizante com adição de melaço de cana-de-açúcar sem iluminação	51
5.4.1	<i>Densidade celular</i>	51
5.4.2	<i>Peso seco</i>	51
5.4.3	<i>pH</i>	51
5.5	Densidade celular e biomassa produzida ao final do experimento	53
6	DISCUSSÃO	55
6.1	pH	55
6.2	Peso seco	56
6.3	Densidade celular	58
7	CONCLUSÃO	61
8	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintetizantes que podem ser dulcícolas, marinhas ou estuarinas. O cultivo desses organismos é visto como uma das atividades mais promissoras para o futuro, pois as microalgas podem produzir diversos compostos bioquímicos, como as proteínas, lipídeos e ácidos graxos, que podem ser utilizados em diversas atividades industriais, sendo a mais pesquisada atualmente a produção de biodiesel (SHUBA; KIFLE, 2018).

Os cultivos em larga escala de microalgas apresentam o entrave do alto custo de produção para uma pequena biomassa produzida por área. O custo elevado está associado principalmente à necessidade da incorporação de nutrientes à água (ÁCIEN *et al.*, 2019). As microalgas necessitam de uma ampla gama de nutrientes necessários para o seu crescimento ótimo, tornando os meios de cultivos extremamente caros e de difícil manuseio em uma operação de maior escala (LOURENÇO, 2007).

Entretanto, alguns nutrientes são necessários em uma maior quantidade, os macronutrientes, e esses podem ser aportados por meios de cultivo alternativos, como fertilizantes agrícolas e efluentes, propiciando um crescimento satisfatório de várias espécies cultivadas. Esses meios alternativos têm a vantagem de serem baratos e de fácil manuseio (FERNÁNDEZ-LINARES *et al.*, 2017).

A baixa produção de biomassa por área nos cultivos ocorre principalmente por efeitos que interferem na taxa fotossintetizante dos organismos, como o autosombreamento e a fotoinibição (RASOULI, 2018). Esses problemas podem ser contornados pela utilização de outras rotas metabólicas que não necessitem da luz, já que muitas espécies de microalgas podem crescer heterotroficamente ou mixotroficamente (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2006).

Para um crescimento mixotrófico ou heterotrófico o meio de cultivo deve ser acrescido de uma fonte de carbono orgânico, como o acetato ou a glucose. Essas fontes de carbono também representam um custo associado ao cultivo, podendo ser feita a substituição por fontes alternativas, como os melaços de cana-de-açúcar, beterraba ou extratos de solo (BARROS *et al.*, 2017). A utilização de meios de cultivo alternativos aliada à inclusão de carbono orgânico proveniente de uma fonte também alternativa no crescimento heterotrófico e mixotrófico de microalgas podem alcançar uma rentabilidade que torne as operações de cultivo em larga escala economicamente viáveis. Porém, o conhecimento deste tema é

limitado e novas pesquisas são necessárias para testar meios de cultivo alternativos e de baixo custo o que permite aumentar a produção e rentabilidade da produção de microalgas.

Este trabalho, portanto, teve como objetivo avaliar a eficácia de um meio de cultivo alternativo composto por fertilizantes agrícolas e melaço de cana-de-açúcar no crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica*, utilizada como modelo de estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microalgas

Microalgas são organismos predominantemente fotossintetizantes, unicelulares e multicelulares, que podem ser encontrados tanto em ambientes aquáticos, como em ambientes terrestres. Elas constituem um agrupamento polifilético, ou seja, pertencentes a linhagens evolutivas diversas, contendo organismos procarióticos, como as cianobactérias, e eucarióticos, como as diatomáceas e clorofíceas. (RICHMOND, 2004). As microalgas pertencentes ao plâncton são organismos dotados de pouca ou nenhuma capacidade de locomoção na água, sendo o seu movimento influenciado pelo deslocamento das correntes e massas de água. Quando no plâncton, esse grupo de organismos é denominado de fitoplâncton e é responsável por grande parte da produção primária no planeta, correspondendo a 90% de toda a fotossíntese realizada nos oceanos, devido à sua alta velocidade de multiplicação e à uma elevada eficiência fotossintetizante (LOURENÇO, 2007).

2.1.1 Metabolismo autotrófico e heterotrófico

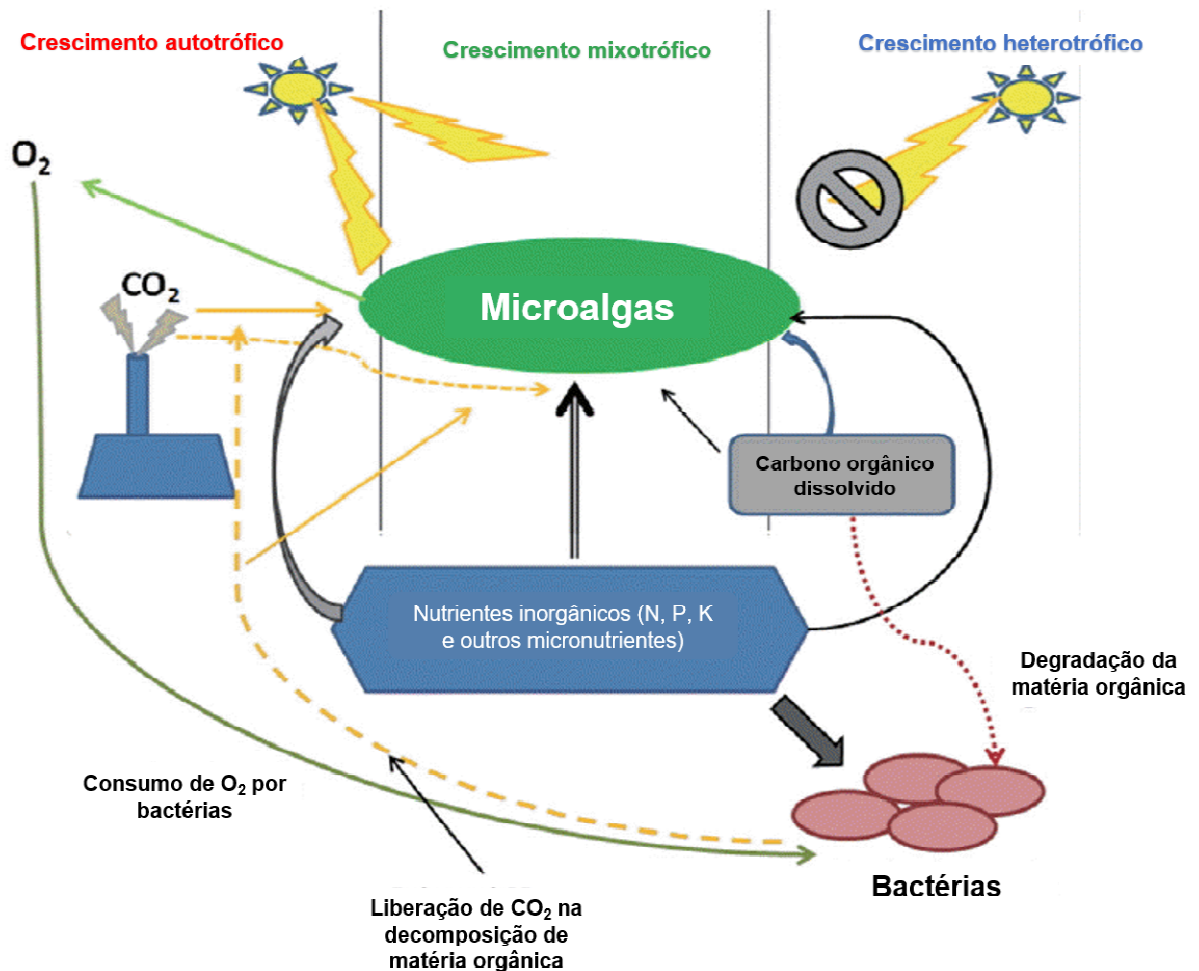
Para obter energia e produzir moléculas orgânicas, o fitoplâncton realiza um processo chamado fotossíntese (Figura 1). Esse processo ocorre nos cloroplastos, organelas localizadas no citoplasma celular. Durante esse processo os organismos fotossintetizantes utilizam a luz como catalisadoras para açúcares através da fixação de CO₂, liberando O₂ para o ambiente. Essa luz é captada nos cloroplastos por pigmentos, como a clorofila 'a', possibilitando o metabolismo autotrófico (JANSSEN, 2016).

Algumas espécies de microalgas podem obter moléculas orgânicas e energia através da quebra de matéria orgânica presente no meio de crescimento (Figura 1). Essas microalgas podem ser fotoheterotróficas, utilizando luz e compostos orgânicos para o crescimento, ou quimioheterotróficas, oxidando os compostos orgânicos. Microalgas crescendo heterotroficamente absorvem compostos orgânicos que são armazenados em vesículas e então digeridos (via fagotrófica) ou absorvem, pela membrana plasmática, nutrientes dissolvidos no meio em que estão inseridas (via osmotrófica) (LEE, 2008).

2.1.2 Metabolismo mixotrófico

A mixotrofia é a combinação da autotrofia e heterotrofia (Figura 1). Algumas espécies de microalgas podem realizar esse metabolismo, o que pode levar à uma elevada taxa de crescimento. Esse tipo de crescimento acontece com o indivíduo utilizando luz e CO_2 para a obtenção de moléculas orgânicas e energia através da fotossíntese e facultativamente utilizando alguma forma de carbono orgânico presente no meio, para a obtenção dos mesmos compostos através de processos heterotróficos (LOWRY, 2015).

Figura 1 – Esquema ilustrando os metabolismos autotróficos, mixotróficos e heterotróficos.



Fonte: e-algae.org.

2.2 Cultivo de microalgas

O cultivo de microalgas tem se desenvolvido bastante nos últimos anos por representar grandes possibilidades econômicas com a produção de compostos bioquímicos que podem ser utilizados na aquicultura, biomedicina, biocombustíveis, cosméticos e biotecnologia (ÁCIEN, 2019). Além disso, o cultivo de microalgas tem como vantagens:

- Pode ser realizado em áreas desérticas (Figura 2), onde a agricultura apenas poderia ser desenvolvida com grandes esforços e elevado custo (SHUBA; KIFLE, 2018).
- Microalgas são organismos com alta eficiência fotossintetizante. Assim elas removem grandes quantidades de gás carbônico (CO_2) da atmosfera, um gás apontado como o principal responsável pelo aumento do efeito estufa por conta de atividades antrópicas (SHUBA; KIFLE, 2018).
- Microalgas podem ser cultivadas em efluentes originários de atividades industriais, domésticas e da agricultura, retirando da água, para a utilização no seu metabolismo, além de nutrientes, como o fósforo e o nitrogênio, que se lançados nos corpos d'água podem causar efeitos deletérios, como a eutrofização (CHEW *et al.*, 2018).
- Microalgas podem incorporar contaminantes e metais pesados, permitindo o retorno da água do efluente para o ambiente (CHEW *et al.*, 2018).

Figura 2 - Produção de *Nannochloropsis sp.* em larga escala no Deserto do Novo México, Texas (EUA).



Fonte: iWi.

2.2.1 Compostos bioquímicos produzidos por microalgas

Muitas espécies de microalgas possuem elevados níveis de proteínas em sua composição (LOURENÇO, 2006). Os níveis de aminoácidos essenciais também são comparáveis com a maioria dos vegetais utilizados na alimentação atualmente. Entretanto, a parede celular celulósica presente na maioria das espécies pode deixar as proteínas indisponíveis para o metabolismo de seres humanos e organismos não-ruminantes, pois os mesmos não possuem aparato digestivo para esse componente. Várias pesquisas têm sido realizadas para a extração da proteína dessa estrutura, tornando-a biologicamente disponível, e assim a biomassa microalgal poderia ser amplamente utilizada na alimentação humana e animal (BARKA; BLECKER, 2016).

Espécies de microalgas marinhas também possuem uma elevada quantidade de ácidos graxos, especialmente os poli-insaturados de cadeia longa (PUFA), da série ω -3, na sua composição bioquímica (SAJJADI *et al.*, 2018). Esses ácidos graxos são essenciais na alimentação de animais marinhos cultivados (TOCHER, 2019), assim como podem trazer diversos benefícios na alimentação humana, diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares e crônicas (JEROMSON, 2015). A principal fonte desses compostos para a indústria farmacêutica e da aquicultura têm sido o pescado, através do consumo direto, do óleo e farinha de peixe. Entretanto, com o crescente declínio da pesca (GOLDEN *et al.*, 2016), as microalgas marinhas passaram a ser cogitadas como uma possibilidade para a produção dos ácidos graxos da série ω -3.

Os lipídios produzidos pelas microalgas também podem ser utilizados na produção de biodiesel. Com a atual diminuição das reservas de petróleo no planeta, custo elevado de obtenção de óleo em locais remotos e as mudanças climáticas por conta da emissão de gases que causam o efeito estufa, várias fontes de energia sustentável e menos poluidoras têm sido testadas. As microalgas podem crescer rapidamente e várias espécies podem ter até 50% do seu peso seco contendo lipídeos, tornando-as uma potencial fonte de ácidos graxos para produção de biocombustíveis e substituição dos combustíveis fósseis utilizados atualmente (ODJADJARE *et al.*, 2017).

2.3 Parâmetros de controle no cultivo de microalgas

A composição química e o crescimento de culturas de microalgas são fatores influenciados pelas condições físicas, químicas e biológicas aos quais as células estão

expostas no cultivo. Dentre os fatores físicos e químicos, os mais importantes são: iluminação, temperatura, nutrientes presentes no meio de cultivo, CO₂, pH e salinidade. Já os fatores biológicos que podem alterar as condições de cultivo estão relacionados à presença de bactérias, vírus, fungos ou outros organismos que possam interferir no crescimento da espécie alvo da cultura. Além disso, o espaço físico que comportará a cultura tem grande importância nas condições do cultivo, pois determina fatores como: circulação, facilidade de coleta e iluminação das células (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

O carbono pode compor até 50% da biomassa seca de microalgas. As células cultivadas respondem de maneira diferente aos níveis de CO₂ no meio, alterando a sua relação de carbono-hidrogênio-nitrogênio (CHN) e, conseqüentemente, a sua composição bioquímica (MOHSENPOUR; WILLOUGHBY, 2016). A temperatura é um fator extremamente importante no crescimento de organismos fotossintetizantes, afetando a biomassa, a produção e composição de lipídeos, proteínas e carboidratos produzidos. A faixa de temperatura para a obtenção dos melhores resultados ao qual o cultivo se destina é espécie-dependente, variando entre as microalgas com potencial para a produção em larga escala (WANG *et al.*, 2016).

2.3.1 Iluminação

A luz pode ser um fator limitante para o crescimento de microalgas, em quantidades baixas ou elevadas. Uma alta irradiância luminosa pode levar à formação de um elevado número de elétrons energéticos. Esses elétrons podem não ser completamente utilizados no ciclo de Calvin e assim formar moléculas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), causando danos à estrutura celular interna. Esse efeito deletério causado por uma irradiância luminosa maior que a suportada pelos fotossistemas é chamado de fotoinibição e pode levar a uma redução no crescimento celular (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2006). Wahidin *et al.* (2013) mostrou que uma irradiância de 200 μmol m⁻² s⁻¹ causou uma redução no crescimento do cultivo da microalga *Nannochloropsis* sp. devido à fotoinibição.

Quando uma baixa irradiância luminosa chega aos fotossistemas de uma microalga, o crescimento passa a ser limitado pela baixa produção de elétrons energéticos, uma condição chamada de fotolimitação. Um aumento na intensidade luminosa incidente sobre os organismos nessas condições levará à uma melhora no crescimento do cultivo, até uma intensidade luminosa máxima onde o processo de fotoinibição passa a ser observado (JANSSEN, 2016).

Em condições onde uma grande densidade celular de microalgas está presente, as células diretamente em frente à fonte luminosa incidente sobre o cultivo podem gerar uma obstrução na passagem de luz para as células imediatamente atrás delas ou absorver completamente a luminosidade. Este processo causa uma redução na concentração máxima de indivíduos naquele ambiente devido à fotolimitação causada por muitos indivíduos, um efeito chamado de auto-sombreamento. Tal efeito apenas é observado em cultivos ou ambientes com grande densidade de células por volume onde as células se encontram em posições fixas e com pouca agitação do meio (RASOULI, 2018).

2.3.2 Nutrientes presentes no meio de cultivo

Para o crescimento de microalgas, se faz necessário a adição de nutrientes à água onde as células estão inseridas. Os nutrientes requeridos pelas células são divididos em dois grupos: macronutrientes e micronutrientes. Os macronutrientes são aqueles que são necessários em concentrações da ordem de centenas ou milhares de $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca. Os principais são: Fe, Si, Mg, K, S, N, P, O, H e C. Os micronutrientes são aqueles que precisam estar em concentrações menores que os macronutrientes, mas ainda assim são importantes no metabolismo das microalgas. São exemplos de micronutrientes: Cu, Mn, Mo, V, Ca, Co e Ni (LOURENÇO, 2006). Alguns nutrientes e suas funções nas células são listados na Tabela 1.

Tabela 1- Nutrientes e suas funções no metabolismo das microalgas.

Elementos	Funções
Nitrogênio	Compõe diversas substâncias celulares, como os aminoácidos e a clorofila.
Ferro	Grupos ativos e enzimas, participando da nitrato e nitrito redutase.
Fósforo	Composição estrutural e transferência de energia, presente no ATP, ácidos nucleicos e fosfolipídeos.
Magnésio	Presente na clorofila e outras enzimas, tem função enzimática e como co-fator no transporte de íons.
Manganês	Presente nas proteínas de tilacóides, participando da manutenção da estrutura da membrana do cloroplasto.
Tiamina (Vit. B ₁)	Coenzima. Atua nos processos de fermentação e respiração celular.
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	Co-fator de enzimas que participam da síntese de metionina.

Fonte: Lourenço (2006, com adaptações).

A forma como os nutrientes são aportados para o meio influencia no crescimento do cultivo e na composição bioquímica das células cultivadas. Isso ocorre por conta de alterações em condições químicas, como a mudança de pH ou mudanças físicas, como a redução da transparência do meio de cultivo. A fórmula química dos compostos que aportam os elementos no meio também pode causar alterações na concentração de compostos, como proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos fotossintetizantes dos indivíduos devido à seletividade de absorção das células, sendo o elemento aportado aproveitado ou não pelas células cultivadas (PODEVIN *et al.*, 2015). Como por exemplo, Ruangsomboon (2015) encontrou diferentes concentrações de ácidos graxos no cultivo da microalga *Botryococcus braunii* como resultado da utilização de diferentes fontes de nitrogênio (KNO_3 , NaNO_3 , $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ e NH_4HCO_3). Dessa forma, não apenas a presença de macro ou micronutriente influencia no cultivo, mas também como este é apresentado. É importante destacar que os requerimentos desses nutrientes variam dentre as espécies.

2.3.3 pH

O potencial hidrogeniônico (pH) é determinado pela quantidade de íons H^+ em uma solução. Esse parâmetro é crítico em culturas de microalgas, pois determina a solubilidade e disponibilidade de CO_2 e outros nutrientes no meio, assim como tem importante influência no metabolismo dos organismos. Oscilações no pH de uma cultura podem variar a taxa de crescimento específico e a composição bioquímica das células. Além disso, cada espécie possui uma faixa ótima de pH, podendo ter seu crescimento limitado fora desses valores. Os valores de pH tendem a aumentar com o envelhecimento de uma cultura devido ao uso do carbono inorgânico para o processo de fotossíntese (QIU *et al.*, 2017).

2.4 Viabilidade econômica dos cultivos de microalgas

Embora muitas pesquisas tenham sido desenvolvidas nos últimos anos, o cultivo de microalgas em uma escala grande o suficiente para atender à demanda de grandes indústrias, como a do biodiesel, ainda é economicamente inviável, com grandes custos de

produção para uma reduzida biomassa obtida. Portanto, para tornar essa atividade economicamente competitiva se faz necessário uma redução nos custos de operações, equipamentos e produtos utilizados nas instalações de cultivos (FERNANDÉZ *et al.*, 2019).

2.4.1 Custos associados aos nutrientes

O custo para o enriquecimento da água de cultivo com nutrientes é elevado, representando em média 30% de todo o custo da produção de biomassa bruta de microalgas (ACIÉN, 2012). Os meios de cultivo mais utilizados e descritos na literatura aportam todos os nutrientes necessários para um bom crescimento e composição bioquímica das microalgas, mas possuem um alto custo e seu manejo em uma produção de larga escala torna-se complexo, muitas vezes inviabilizando economicamente o cultivo (ELNABRIS, 2012).

O meio f/2 (GUILLARD, 1975) é o mais utilizado atualmente no cultivo da maioria das espécies de microalgas marinhas. Entretanto, esse meio é de composição complexa (Tabelas 2, 3 e 4), tornando o seu custo elevado e o seu manuseio em culturas de larga escala complexo. Em decorrência disso, vários meios alternativos, compostos de fertilizantes agrícolas ou efluentes domésticos e industriais, têm sido testados no cultivo de diversas espécies de microalgas (FERNÁNDEZ-LINARES *et al.*, 2017).

Tabela 2- Meio f/2 (Guillard, 1975)

Componente	Solução estoque (g/L)	Quantidade (mL)	Concentração molar final (M)
NaNO ₃	75	1	8,82 x 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5	1	3,62 x 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30	1	1,06 x 10 ⁻⁴
Solução de metais traço (Tabela 3)	----	1	----
Solução de vitaminas (Tabela 4)	----	1	----

Fonte: Guillard (1975).

Tabela 3 - Solução estoque de metais traço

Componente	Solução estoque primária (g/L)	Quantidade	Concentração molar final (M)
FeCl ₃ 6H ₂ O	----	3,15 g	1,17 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	----	4,36 g	1,17 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ 5H ₂ O	9,8	1 mL	3,93 x 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6,3	1 mL	2,60 x 10 ⁻⁸
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22,0	1 mL	7,65 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ 6H ₂ O	10,0	1 mL	4,20 x 10 ⁻⁸
MnCl ₂ 4H ₂ O	180,0	1 mL	9,10 x 10 ⁻⁷

Fonte: Guillard (1975).

Tabela 4 - Solução estoque de vitaminas

Componente	Solução estoque primária (g/L)	Quantidade	Concentração molar final (M)
Tiamina HCl (Vit. B ₁)	----	200 mg	2,96 x 10 ⁻⁷
Biotina (Vit. H)	1	1 mL	2,05 x 10 ⁻⁹
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	1	1 mL	3,69 x 10 ⁻¹⁰

Fonte: Guillard (1975).

Um meio que tem sido utilizado em substituição ao meio f/2 é o meio contendo fertilizantes agrícolas (Tabela 5) (YAMASHITA; MAGALHÃES, 1984). Esse meio possui um custo menor e os compostos utilizados são mais facilmente manuseáveis. Os componentes presentes em meios compostos por fertilizantes visam suprir as necessidades metabólicas da microalga em cultivo, comumente contendo uma fonte de nitrogênio, fósforo e ferro.

Tabela 5 - Meio fertilizante (YAMASHITA; MAGALHÃES, 1984)

Componente	Solução estoque (g/L)	Quantidade (mL)
Sulfato de amônio	150,0	1

(NH ₄) ₂ SO ₄		
Ureia	7,5	1
(NH ₂) ₂ CO		
Superfosfato de cálcio	25,0	1
P ₂ O ₅ + CaO + SO ₃		
Cloreto de ferro (III)	4,6	1
FeCl ₃		

Fonte: Yamashita e Magalhães (1984).

2.4.2 Melhoria da produção pelo uso de cultivos heterotróficos

Os cultivos autotróficos de microalgas apresentam uma série de limitações na sua utilização em uma produção de larga escala (SÁNCHEZ, 2015), como:

- A necessidade de uma fonte luminosa incidente sobre o cultivo, representando um custo adicional, no caso de iluminação artificial, ou imprevisibilidade e, conseqüentemente, pouco controle sobre as condições luminosas, no caso da utilização de iluminação solar natural;
- Os efeitos de fotoinibição e fotolimitação podem ocorrer em cultivos com iluminação natural, devido à variação da disponibilidade de luz solar, ou em cultivos com iluminação artificial onde a espécie cultivada não possui uma faixa ideal de iluminação conhecida;
- A biomassa máxima produzida em um cultivo autotrófico é limitada pelo aumento do efeito de autosombreamento com o adensamento celular da cultura.

Assim, os cultivos heterotróficos passam a ser uma alternativa em substituição aos cultivos autotróficos, pois apresentam diversas vantagens, sendo algumas delas (SÁNCHEZ, 2015):

- Podem eliminar a necessidade de utilização de fontes luminosas incidentes sobre o cultivo, eliminando os custos energéticos de iluminação artificial e reduzindo os efeitos de fotoinibição e fotolimitação, que podem ocorrer com bastante frequência em cultivos onde se utiliza como fonte luminosa a luz solar natural;

- Podem eliminar a limitação da produção máxima do cultivo pelo efeito de auto-sombreamento, permitindo que todas as células possam manter as suas atividades metabólicas independente da iluminação.
- A taxa de conversão de energia em ATP é maior nos cultivos heterotróficos que nos autotróficos, pois 18% da energia obtida pode ser convertida em ATP em condições heterotróficas enquanto apenas 10% pode ser convertida sob condições autotróficas (HU *et al.*, 2018).

Entretanto, os cultivos heterotróficos de microalgas também apresentam grandes desafios para a sua implementação em larga escala (LOWRY *et al.*, 2015), como apresentado abaixo:

- Para que uma microalga possa crescer heterotroficamente, o meio de cultivo deve ser acrescido de uma fonte de carbono. Várias fontes têm sido testadas, como glucose, galactose, frutose e acetato, dentre outras. Essas fontes representam um custo adicional, podendo inviabilizar economicamente a atividade;
- O crescimento heterotrófico não utiliza o CO₂ atmosférico, retirando dos cultivos de microalga a possibilidade de atuarem como grandes sequestradores de carbono;
- O meio de cultivo acrescido de uma fonte de carbono facilita a contaminação da cultura por bactérias e outros organismos, que podem competir pelos nutrientes com a microalga, reduzindo a eficiência da atividade.

2.4.3 Melhoria da produção pelo uso de cultivos mixotróficos

Os cultivos mixotróficos fazem uso de uma fonte de luz, permitindo o crescimento autotrófico dos organismos cultivados e, além disso, o meio de cultivo é suplementado com uma fonte de carbono, permitindo que as células também cresçam heterotroficamente (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004). A vantagem desse tipo de cultivo é que a cultura pode crescer rapidamente utilizando-se da fotossíntese e, após atingir uma elevada densidade celular e o processo de autosombreamento passar a ser observado, as células passam a catabolizar o carbono presente no meio. Os cultivos mixotróficos também apresentam como vantagem uma redução nos custos de produção, pois a intensidade luminosa sobre o cultivo pode ser menor que em um cultivo autotrófico, reduzindo os gastos energéticos (RAZZAK *et al.*, 2015).

Entretanto vários dos desafios observados nos cultivos heterotróficos se repetem nos cultivos mixotróficos, como o elevado custo associado à utilização de uma fonte de carbono no meio de cultivo e a facilitação de contaminação por bactérias ou outros organismos (BARROS *et al.*, 2017). Dessa forma, a busca por fontes mais acessíveis de carbono se revela uma alternativa viável para a melhoria dos cultivos heterotróficos e mixotróficos.

2.4.4 Fontes alternativas de carbono orgânico

Várias fontes alternativas de carbono têm sido testadas com o objetivo de baratear os cultivos mixotróficos e heterotróficos. Dentre as fontes testadas estão: melaço de cana-de-açúcar ou beterraba (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004), efluentes agrícolas e industriais (JI *et al.*, 2015) e ureia (LOWREY; BROOKS; MCGINN, 2015). JI *et al.*, (2015) obteve sucesso no cultivo mixotrófico da microalga *Scenedesmus obliquus* em meio composto por efluente doméstico e de uma indústria alimentícia. Mesmo com um elevado nível de carbono em sua composição, os efluentes agrícolas podem apresentá-lo de forma que não esteja disponível para a utilização ou de forma tóxica (BARROS *et al.*, 2017). Além disso, os cultivos utilizando uréia como fonte de carbono também mostraram que ela pode auxiliar no crescimento autotrófico dos organismos, mas gera um acúmulo de amônia ao final do cultivo (NAGAJARAN *et al.*, 2018).

2.5 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto do refinamento do açúcar. A cana é prensada, sendo o suco separado do resíduo sólido, o bagaço. O suco é então clarificado e concentrado por evaporação até a cristalização da sucrose. Esses cristais são então extraídos por centrifugação e é gerado um líquido viscoso e escuro, o melaço. O melaço é rico em sucrose, com uma composição de 45% a 60% desse açúcar. Além disso, também possui de 5% a 20% de glucose e frutose (BASSO *et al.*, 2011).

O melaço de cana-de-açúcar também possui diversos minerais em sua composição, sendo os principais apresentados na Tabela 6:

Tabela 6 - Composição do melaço de cana-de-açúcar

Nutriente	Concentração (mg/L)
Nitrogênio (NH ₄ ⁺ e R- NH ₂)	70 – 350
Fósforo	20 – 200
Potássio	300 – 12000
Magnésio	80 – 3900
Enxofre	80 – 3900
Cálcio	150 – 2000
Zinco	0,45 – 9
Cobre	0,20 – 8
Manganês	2 – 8
Alumínio	2 – 500

Fonte: Basso et al. (2011).

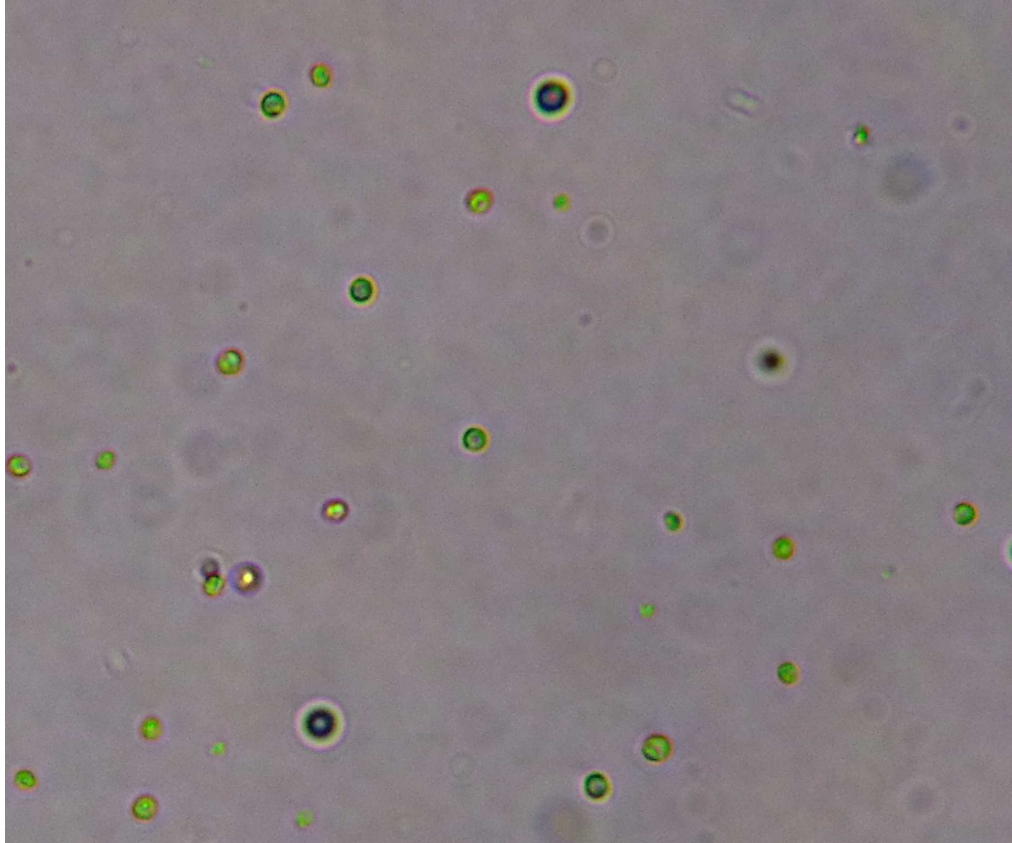
O Brasil produziu entre os anos de 2018 e 2019 mais de 620 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial desse produto agrícola (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019). Sendo o melaço um subproduto do refinamento da cana, esse composto está bastante disponível e acessível economicamente no país. A grande quantidade de açúcar presente em sua composição e a sua alta disponibilidade no mercado torna o melaço de cana-de-açúcar uma potencial fonte de carbono orgânico a ser utilizada em cultivos de microalgas de larga escala. A sua utilização no cultivo mixotrófico e heterotrófico da microalga *N. oceanica* ainda não foi testada.

2.6 *Nannochloropsis oceanica*

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* pertencem à classe Eustigmatofíceas e são conhecidas como oleaginosas, pois as espécies desse gênero possuem uma elevada quantidade de ácidos graxos na sua composição bioquímica. Espécies desse gênero podem ter de 11% a 39% de ácidos graxos em sua composição, sendo essa composição variável com as condições nas quais as células são cultivadas. Dessa forma, o gênero tem sido muito usado na fabricação de suplementos alimentares devido à alta produção do ácido docosahexanóico (DHA) e baixa produção do ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido aracdônico (AA)

(MARTINS et. al., 2013) (ALVES *et al.*, 2018). Além disso, o pequeno tamanho (2 a 4 μm) e boa composição nutricional torna o gênero *Nannochloropsis* um dos mais utilizados na aquacultura mundial (ASHOUR *et al.*, 2019).

Figura 3 – Fotomicrografia de *Nannochloropsis* sp..



Fonte: Autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de um meio de cultivo alternativo composto por fertilizantes agrícolas e melão de cana-de-açúcar no crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica*.

3.2 Objetivos específicos

- Testar se o crescimento, pH e peso seco da microalga *Nannochloropsis oceanica* são influenciados pela substituição do meio f/2 por meio fertilizante;
- Testar se o crescimento, pH e peso seco de microalga *Nannochloropsis oceanica* em meio fertilizante são influenciados pela inclusão de diferentes níveis de melão de cana-de-açúcar.
- Testar se o crescimento, pH e peso seco da microalga *Nannochloropsis oceanica* em dois tratamentos (meio fertilizante e em meio fertilizante com inclusão de melão de cana-de-açúcar) são influenciados por diferentes condições de iluminação.

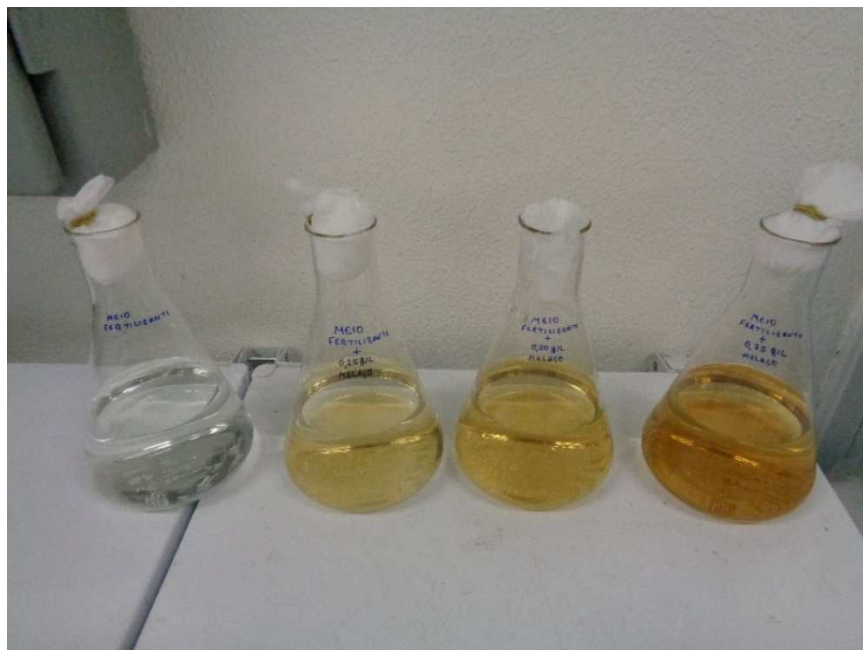
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Montagem dos fotobiorreatores

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores em Erlenmeyers de vidro de 1000 mL (volume de trabalho de 700 mL) (Figura 4). A água utilizada no cultivo foi coletada na praia do Meirelles, deixada em repouso por 24 h e então filtrada em membrana de celulose com $3\mu\text{m}$ de porosidade. A salinidade foi estimada através de um refratômetro de mão Atago Master-S/Mill Alpha e ajustada para 28 utilizando-se de água destilada. O fotobiorreator foi preparado com 630 mL dessa água, coberto com um tampão composto de algodão e TNT e esterilizado por autoclavagem a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

A aeração foi feita por compressores de ar utilizados em aquários, injetando o ar atmosférico direto nos fotobiorreatores. O ar foi injetado na cultura por meio de mangueiras de silicone e pipetas de vidro, previamente esterilizadas por autoclavagem a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. A quantidade de ar injetada foi aferida visualmente e controlada por divisores de ar para que a agitação em todas as culturas fosse a mesma.

Figura 4 – Aspecto dos fotobiorreatores com meio fertilizante e inclusão de 0, 0.25, 0.50 e 0.75 g/L de melão de cana-de-açúcar



Fonte: Autor.

Foram utilizadas lâmpadas de LED de 18 Watts para os cultivos autotróficos e mixotróficos. O fotoperíodo foi de 12h luz/ 12h escuro, regulado por timer eletrônico. Os cultivos foram realizados em um estante fechada para garantir que a iluminação incidente sobre os fotobiorreatores fosse proveniente apenas das lâmpadas utilizadas no experimento. A temperatura de cultivo foi a temperatura da sala onde os fotobiorreatores estavam instalados, sendo de 26 ± 2 °C.

4.2 Condições de cultivo

O inóculo da microalga *N. oceanica* (Figura 5) utilizado nos experimentos foi preparado a partir de uma cepa cedida pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), mantidas na Coleção de Microalgas Marinhas do Laboratório de Plâncton do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da UFC por 23 meses. O inóculo foi feito a partir de uma cultura crescendo por, pelo menos, 7 dias, no meio de cultivo à ser utilizado no tratamento ao qual os indivíduos se destinariam. A cultura teve a sua densidade celular estimada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico Zeiss PrimoStar. Foi preparado um inóculo de volume igual à 10% (70 mL) do volume final do cultivo contendo uma densidade celular de 1×10^6 células mL⁻¹.

Figura 5 – Aspecto do inóculo de *Nannochloropsis oceanica* crescido por 15 dias.



Fonte: Autor.

A amostragem foi feita diariamente, no mesmo horário, utilizando-se aparatos esterilizados. A amostragem diária foi de 30 mL, sendo esse volume repostado com meio de cultivo com as mesmas concentrações de nutrientes do tratamento amostrado. As amostras coletadas destinadas as análises de contagem, medição de pH e peso seco foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro vedados por plástico PVC para evitar o contato com ar e armazenadas na geladeira, no escuro, até o momento da determinação dos parâmetros a serem testados. As medições e contagens foram feitas 2 a 4 dias após a amostragem.

O sistema experimental consistiu em 13 tratamentos em triplicata (Tabela 7) de modo a testar a substituição do meio de cultivo f/2 pelo meio fertilizante, assim como a inclusão de melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono e diferentes intensidades luminosas para a determinação do tipo de metabolismo utilizado. O tratamento T1 consistiu na curva de crescimento de *N. oceanica* em meio f/2 e foi o grupo controle. Para determinar o melhoramento dos cultivos em meio fertilizantes pela inclusão do melão de cana-de-açúcar no meio de cultura e determinação de como o melão de cana-de-açúcar atuou no melhoramento dos cultivos, foram feitos tratamentos em três intensidades luminosas diferentes calculadas através da potência da lâmpada (360, 180 e 0 lúmens) sem inclusão de

melaço e com três concentrações diferentes de melaço de cana-de-açúcar no meio de cultura (0,25 g/L; 0,50 g/L e 0,75 g/L) (Tabela 7).

Tabela 7 – Condições experimentais dos cultivos de *N. oceanica* testados.

Tratamentos	Fluxo luminoso (lm)	Concentração de melaço de cana-de-açúcar (g/L)
T1 (f/2)	360	0,00
T2	360	0,00
T3	360	0,25
T4	360	0,50
T5	360	0,75
T6	180	0,00
T7	180	0,25
T8	180	0,50
T9	180	0,75
T10	0	0,00
T11	0	0,25
T12	0	0,50
T13	0	0,75

Fonte: Autor.

4.3 Preparo dos meios de cultivo

O meio f/2 utilizado foi preparado conforme a composição de Guillard (1975) com uma modificação na solução estoque de vitaminas (Tabela 8). Além disso, por se tratar do cultivo de uma espécie que não possui carapaça silicosa, a sílica foi retirada do meio de cultura.

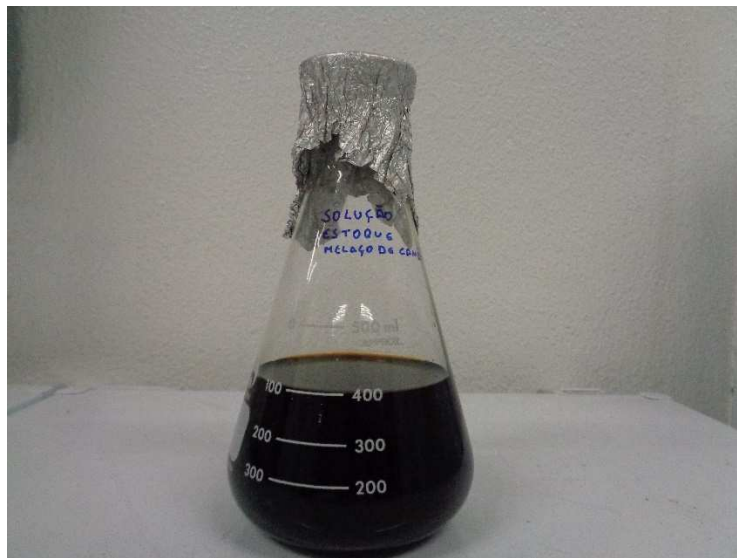
Tabela 8 - Solução estoque de vitaminas modificada.

Componente	Solução estoque primária (g/L)	Quantidade
Tiamina HCl (Vit. B ₁)	-	200 mg
Piridoxina (Vit. B ₆)	-	200 mg
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	1	1 mL

Fonte: Autor.

O meio fertilizante utilizado foi preparado com os compostos e concentrações descritas por YAMASHITA e MAGALHÃES (1984) (Tabela 2). Para a inclusão do melaço de cana-de-açúcar, este foi pesado em balança (Mark 500 Bel Engineering) e uma solução estoque de 1/10 (p/v) foi preparada dissolvendo-se 50 g de melaço de cana-de-açúcar em 500 mL de água destilada (Figura 6).

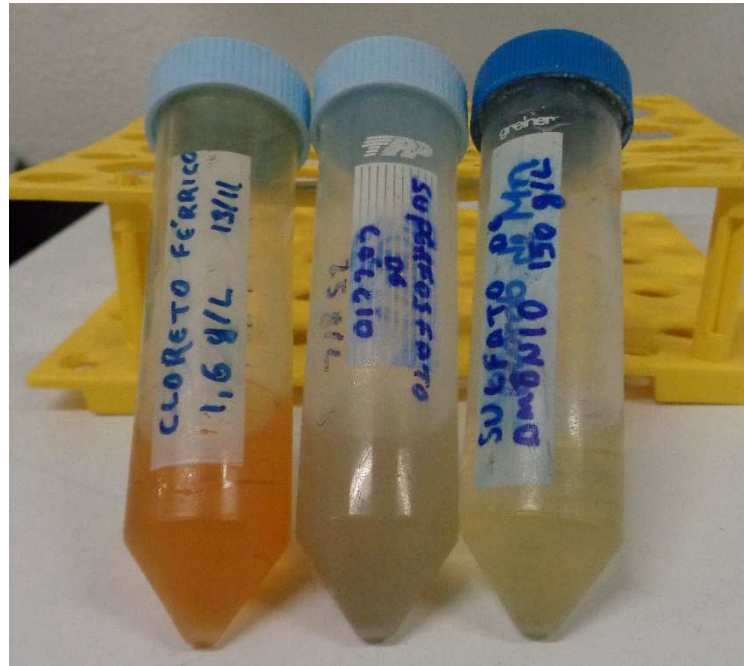
Figura 6 – Aspecto da solução estoque de melaço de cana-de-açúcar utilizada para preparação das condições experimentais testadas.



Fonte: Autor.

As soluções estoques do meio f/2 modificado, meio fertilizante e melaço de cana-de-açúcar foram esterilizadas por autoclavagem à 121°C por 15 minutos (Figura 7). Compostos que poderiam se degradar com o aquecimento, como a solução estoque de vitaminas e de ureia, foram esterilizadas por filtração em filtro de seringa de membrana com porosidade 0,22 μm .

Figura 7 – Aspecto das soluções estoque de fertilizantes agrícolas utilizados na preparação dos tratamentos testados.



Fonte: Autor.

4.4 Avaliação dos cultivos

4.4.1 Densidade celular

As culturas foram contadas diariamente em microscópio óptico Zeiss PrimoStar utilizando-se uma câmara de Neubauer espelhada. Foram contados um total de nove campos da região central da câmara (figura 8) e a densidade celular (células/mL) foi obtida através da seguinte fórmula:

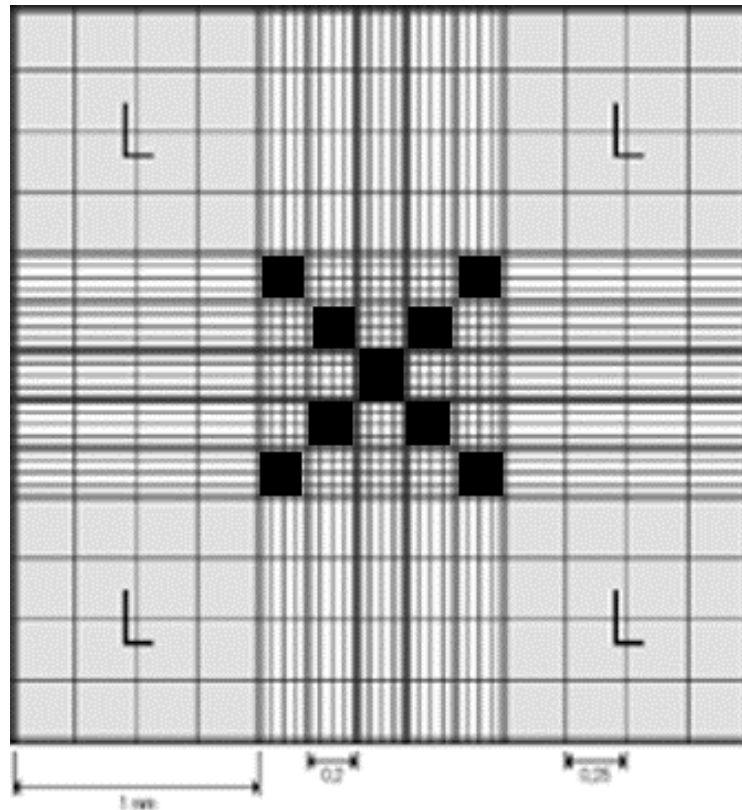
$$DC \text{ (células/ml)} = MCC \times 50.000 \quad (1)$$

Onde:

DC = Densidade celular

MCC = Média dos campos contados

Figura 8 – Aspecto da câmara de Neubauer observado ao microscópio, com destaque (quadrados pretos sólidos) dos campos contados no experimento.



Fonte: Pro-analise.com.br (com adaptações).

4.4.2 pH e Peso seco

As culturas tiveram o seu pH aferido diariamente utilizando-se um pHmetro de bancada Quimis Q400MT.

Para a estimativa da biomassa seca produzida diariamente por cada cultivo, foram utilizados filtros de acetato de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade. Previamente à filtração, os filtros foram mantidos em estufa à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, os filtros foram mantidos em dessecador até que a temperatura estabilizasse e então tiveram o seu peso medido. Os filtros com peso inicial determinado foram então utilizados na filtração, com a utilização de bomba a vácuo, de 20 mL da cultura a ter a biomassa seca produzida a ser determinada. Posteriormente, as células retidas no filtro foram lavadas com 20 mL de água destilada, retirando as partículas de sal que podem se aderir à parede celular das mesmas, o que pode levar à erros na determinação do peso seco, conforme procedimento descrito por ZHU (1997). Após à filtração, os filtros passaram pelo mesmo procedimento em estufa e

dessecador, sendo o peso seco total da cultura determinado pela equação 2. As pesagens foram realizadas em balança analítica (Shimadzu AUN220D).

$$\text{PST} = \frac{\text{PSF} - \text{PSI}}{\text{VF}} \quad (2)$$

Onde:

PST: Peso seco total da biomassa produzida

PSF: Peso seco após a filtração.

PSI: peso seco antes da filtração.

VF: Volume filtrado.

Todos os tratamentos tiveram o peso seco do meio de cultivo estimado através da metodologia de estimativa de biomassa descrita acima. Esse valor foi utilizado para corrigir os valores de biomassa produzida estimadas, através da subtração do resultado obtido no experimento e dia conduzido pelo valor de peso seco estimado do meio de cultivo sem a presença de células. Isso se faz necessário devido à característica de aderência do melaço de cana-de-açúcar, o que poderia levar à uma superestimação do valor de biomassa produzida nos cultivos com adição desse composto.

4.4.3 Concentração da biomassa para posterior análise bioquímica e Tratamentos estatísticos dos dados

Ao final do experimento as culturas foram centrifugadas em uma centrífuga Centrilab TDZ5 à 4500 RPM por 5 minutos. A biomassa concentrada foi armazenada em tubos de polietileno de 50 mL e preservados na geladeira no escuro até a determinação da composição bioquímica (Figura 9).

Após a consideração da normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey, com nível de significância ($p < 0,05$). O software utilizado foi o Statistica® 7

Figura 9 – Aspecto da biomassa concentrada de *N. oceanica* ao final dos tratamentos.



Fonte: Autor.

5 RESULTADOS

5.1 Substituição do meio f/2 por meio fertilizante à plena iluminação

5.1.1 Densidade celular

O crescimento das culturas em meio convencional, f/2 (Guillard, 1975), e em meio alternativo composto por fertilizantes, foi comparada inicialmente através da densidade celular ao longo dos seis dias de tratamento. A partir do quarto dia de tratamento, os crescimentos nos dois meios se diferenciam ($F=7,962$; $p=0,000524$) já que em meio f/2 o crescimento progride enquanto o em meio fertilizante mantém-se estável. Em meio f/2, a cultura de *N. oceanica* começa a crescer exponencialmente após o terceiro dia de cultivo, atingindo $1,01 \times 10^6$ cels. mL⁻¹ e estabilizando com cinco dias em $4,26 \times 10^6$ céls. mL⁻¹. Já as células cultivadas em meio fertilizante se mantiveram em $6,44 \times 10^5$ céls.mL⁻¹ por todos os seis dias de tratamento, não apresentando diferença entre todos os dias de crescimento ($F=2,15837$; $p=0,127612$) (Figura 10a).

5.1.2 Peso seco

Os valores de peso seco medidos nos tratamentos realizados mostraram grande variação ao longo dos dias testados. Apesar das diferenças observadas na contagem de células, os tratamentos com meio f/2 e meio fertilizante não apresentaram diferença significativa nos valores de peso seco medidos ao longo dos quatro primeiros dias testados. Contudo, foi observado um aumento na biomassa produzida no dia quatro de ambos os tratamentos, que se manteve até o sexto dia (Figura 10b).

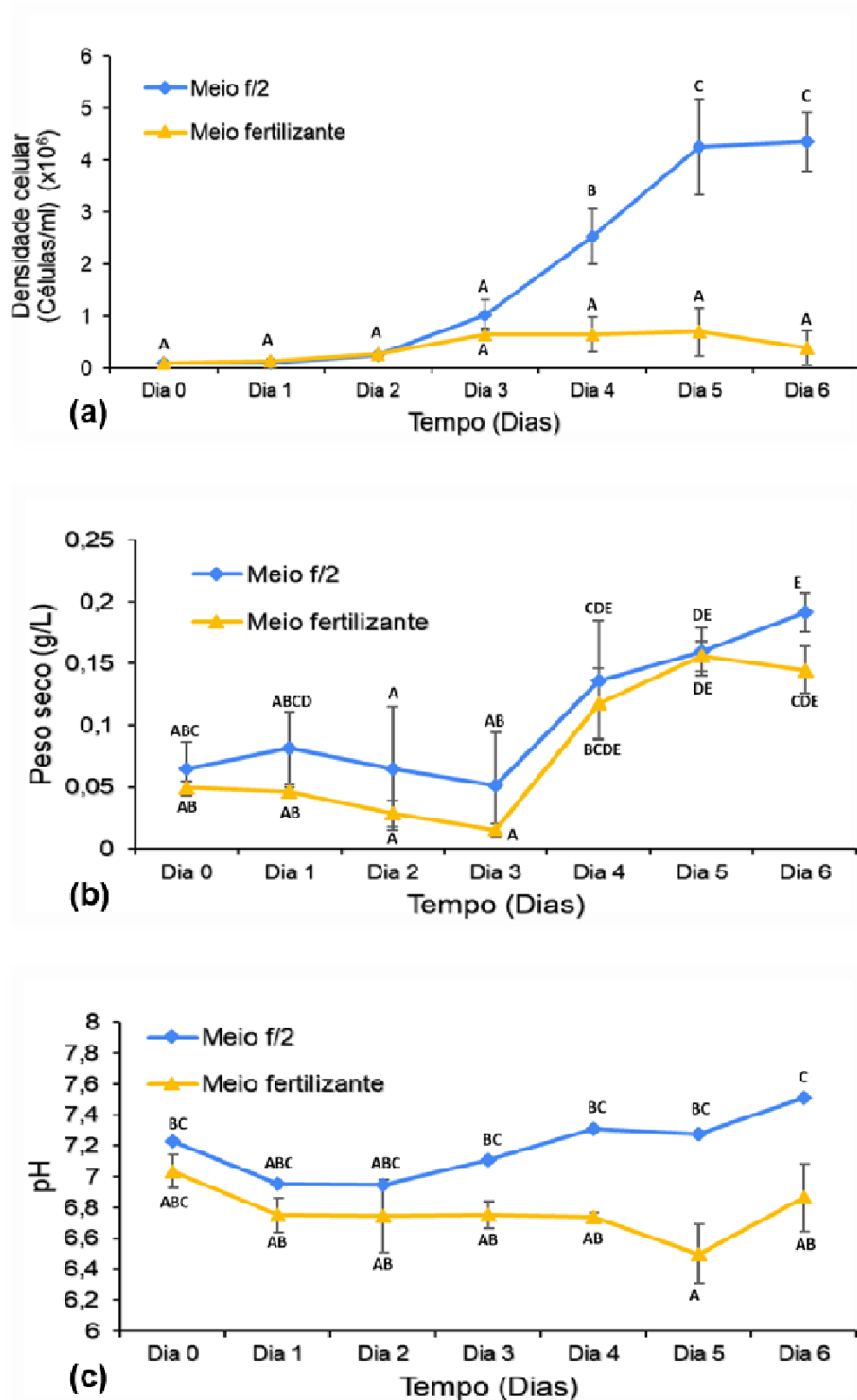
5.1.3 pH

No tratamento com meio fertilizante, foi observado uma pequena queda no valor do pH durante o primeiro dia de crescimento, com o pH se mantendo estável durante os quatro próximos dias, atingindo o menor valor no dia cinco e voltando a crescer no dia seis. Não houve diferença significativa entre os dias testados.

O tratamento controle (meio f/2) obteve valores de pH maiores quando comparados aos medidos no mesmo intervalo de tempo no tratamento com meio fertilizante, entretanto, os dias dois e três não apresentaram diferença significativa entre tratamentos. O maior valor dentre todos os dias e experimentos foi observado no sexto dia do tratamento controle, porém esse valor não diferiu dos dias três, quatro e cinco do mesmo tratamento (Figura 10c).

Apenas o quinto e sexto dia do tratamento com meio f/2 apresentaram diferença significativa no valor de pH quando comparado ao mesmo período de tempo no tratamento com meio fertilizante.

Figura 10 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) nos tratamentos com meio f/2 e meio fertilizante à plena iluminação ao longo de seis dias de tratamento. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor.

5.2 Efeito da adição de melação de cana-de-açúcar à plena iluminação no crescimento em meio fertilizante

O meio fertilizante também foi testado com a adição de quatro concentrações diferentes de melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono para avaliar o efeito na melhoria do cultivo.

5.2.1 Densidade celular

Os tratamentos sem inclusão de melação de cana e com a maior concentração testada (0,75 g/L) se mantiveram estáveis ao longo de todos os seis dias de tratamento e foram estatisticamente semelhantes entre si. Já os tratamentos contendo 0,25 g/L e 0,50 g/L se destacaram dos demais a partir do quarto (0,25 g/L de melação) e quinto (0,50 g/L de melação) dia, com maiores densidades tendo sido atingidas no tratamento com inclusão de 0,25 g/L de melação. Os maiores valores foram observados no dia seis dos tratamentos com inclusão de 0,25 e 0,50 g/L de melação de cana, com o tratamento com 0,25 g/L de melação atingindo as maiores densidades celulares dentre todos os cultivos testados com plena iluminação (Figura 11a).

5.2.2 Peso seco

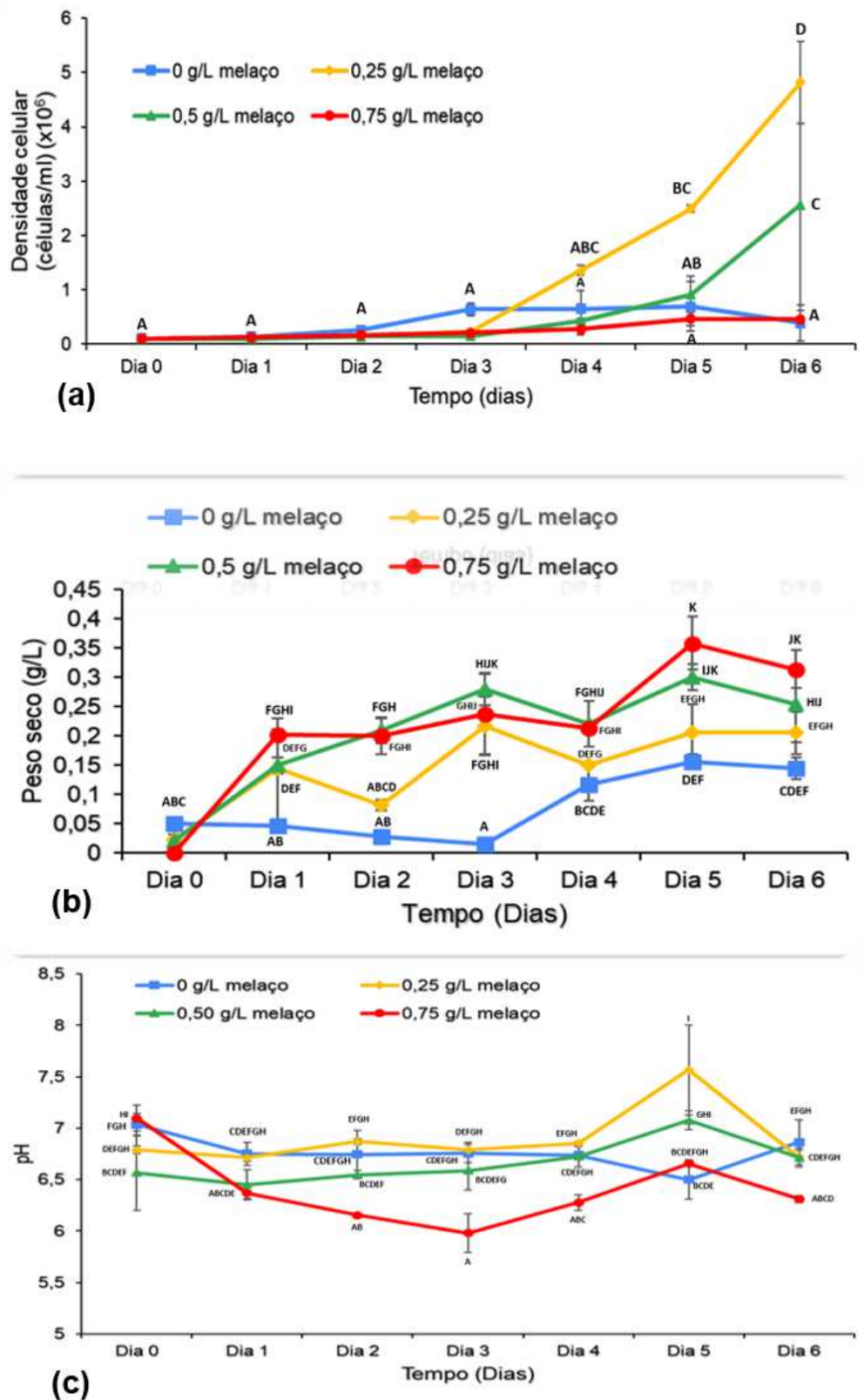
Os tratamentos com inclusão de melação de cana-de-açúcar apresentaram aumento significativo de peso seco desde o primeiro dia de crescimento. Esses valores variaram ao longo do tempo, com o maior valor de biomassa produzida sendo observado no quinto dia de crescimento do tratamento com adição de 0,75 g/L de melação de cana. Os tratamentos com inclusão de 0,50 e 0,75 g/L de melação de cana apresentaram os maiores valores de peso seco ao final do período testado (Figura 11b).

5.2.3 pH

Os valores de pH mostraram grande variação entre os dias testados e os experimentos conduzidos, com os valores variando de 5,81 a 8,01. Apesar disso não foram

observadas muitas variações estatisticamente diferentes. O menor valor foi observado no dia três na cultura com inclusão de 0,75 g/L de melaço de cana e o maior no dia cinco no tratamento com inclusão de 0,25 g/L de melaço de cana-de-açúcar (Figura 11c).

Figura 11 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) medidos ao longo dos experimentos à plena iluminação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor.

5.3 Meio fertilizante com adição de melaço de cana-de-açúcar à meia iluminação

Para testar o crescimento mixotrófico em meio fertilizante com adição de melaço de cana como fonte de carbono, os mesmos tratamentos foram submetidos ao crescimento em meia iluminação, onde a fonte de radiação luminosa foi reduzida pela metade.

5.3.1 Densidade celular

Todos os tratamentos apresentaram um aumento na densidade celular ao longo dos dias de experimento, com destaque para os tratamentos contendo nenhuma adição ou 0,25 g/L de melaço. A maior densidade celular foi observada no último dia de crescimento, no tratamento com incremento de 0,25 g/L de melaço de cana-de-açúcar. Esse tratamento apresentou crescimento significativo entre os dias três, quatro e cinco, assim como foi observado no tratamento com a mesma inclusão de melaço sob incidência de iluminação plena. O menor valor ao final do experimento foi observado na cultura com inclusão de 0,75 g/L de melaço de cana (Figura 12a).

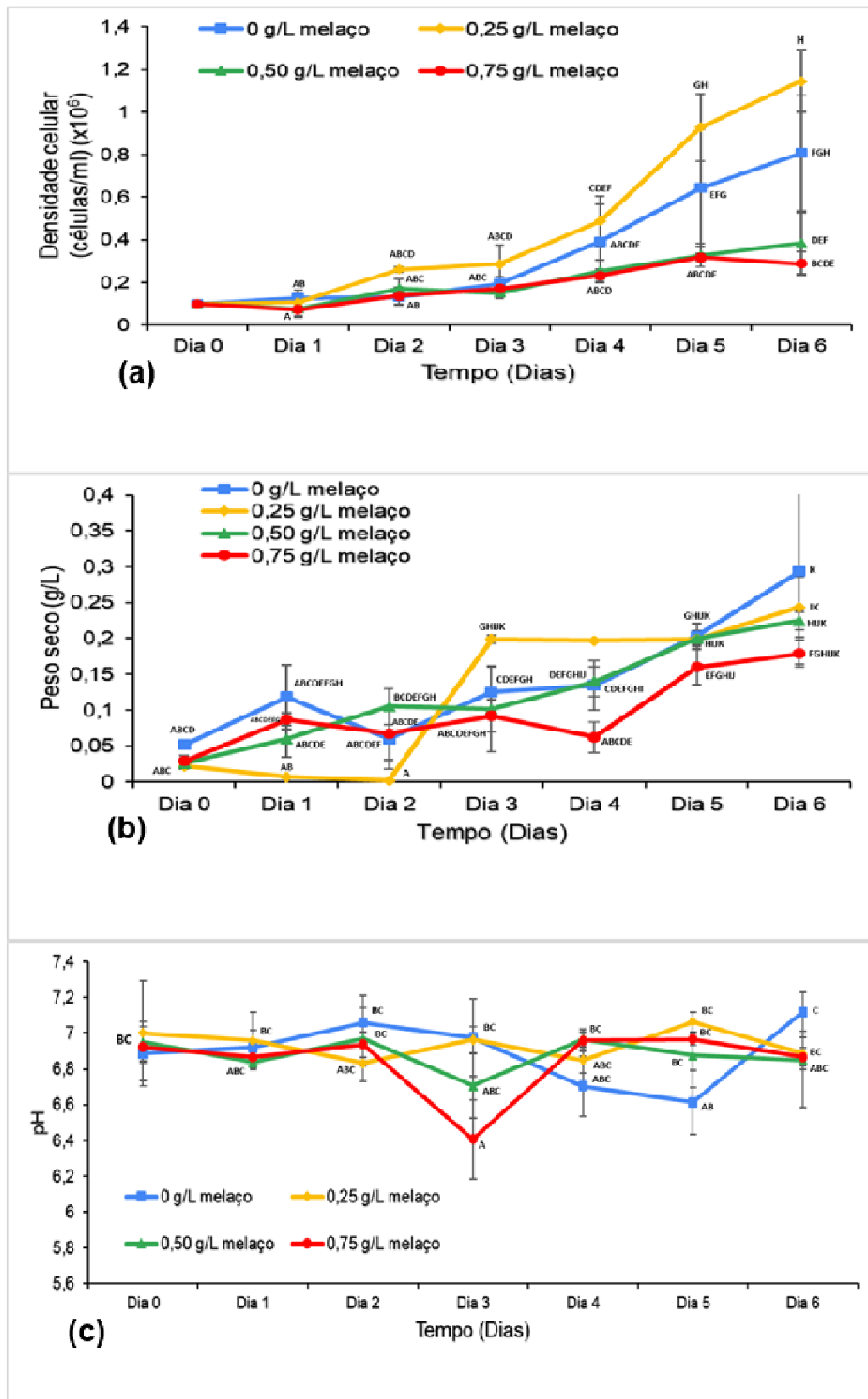
5.3.2 Peso seco

Todos as condições experimentais testadas apresentaram incremento da biomassa produzida ao final dos seis dias de experimento. O maior valor foi observado no último dia, no tratamento sem inclusão de melaço de cana. Foram observadas diferenças significativas entre os dois primeiros dias e os três próximos dias nos tratamentos sem inclusão e com 0,25 g/L de melaço de cana, voltando essas culturas a apresentar uma maior biomassa no sexto dia de cultivo. O menor valor de biomassa ao final dos seis dias foi observado na cultura com 0,75 g/L de melaço de cana (Figura 12b).

5.3.3 pH

O pH não apresentou padrão de variação definido ao longo do período testado, com todos os tratamentos mostrando aumento e diminuição dos valores desse parâmetro com o passar dos dias, tendo variado de 6,24 a 7,23. Apesar disso, o único valor de pH estatisticamente diferente de todos os demais foi observado no terceiro dia, no tratamento com 0,75 g/L de melação de cana-de-açúcar, sendo o menor valor observado dentre todos os tratamentos. O maior valor foi medido no dia seis no tratamento sem inclusão do melação de cana (Figura 12c).

Figura 12 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) medidos ao longo dos experimentos à meia iluminação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor.

5.4 Meio fertilizante com adição de melaço de cana-de-açúcar sem iluminação

Para testar o crescimento heterotrófico em meio fertilizante com adição de melaço de cana como fonte de carbono, os mesmos tratamentos foram submetidos ao crescimento sem iluminação.

5.4.1 Densidade celular

Não houve diferença significativa na densidade celular ao longo dos seis dias de experimento assim como não foi observada diferença entre os diferentes tratamentos testados na ausência de iluminação. As culturas foram inoculadas com 1×10^5 céls.mL⁻¹ e mantiveram essa densidade celular até o fim do experimento (Figura 13a).

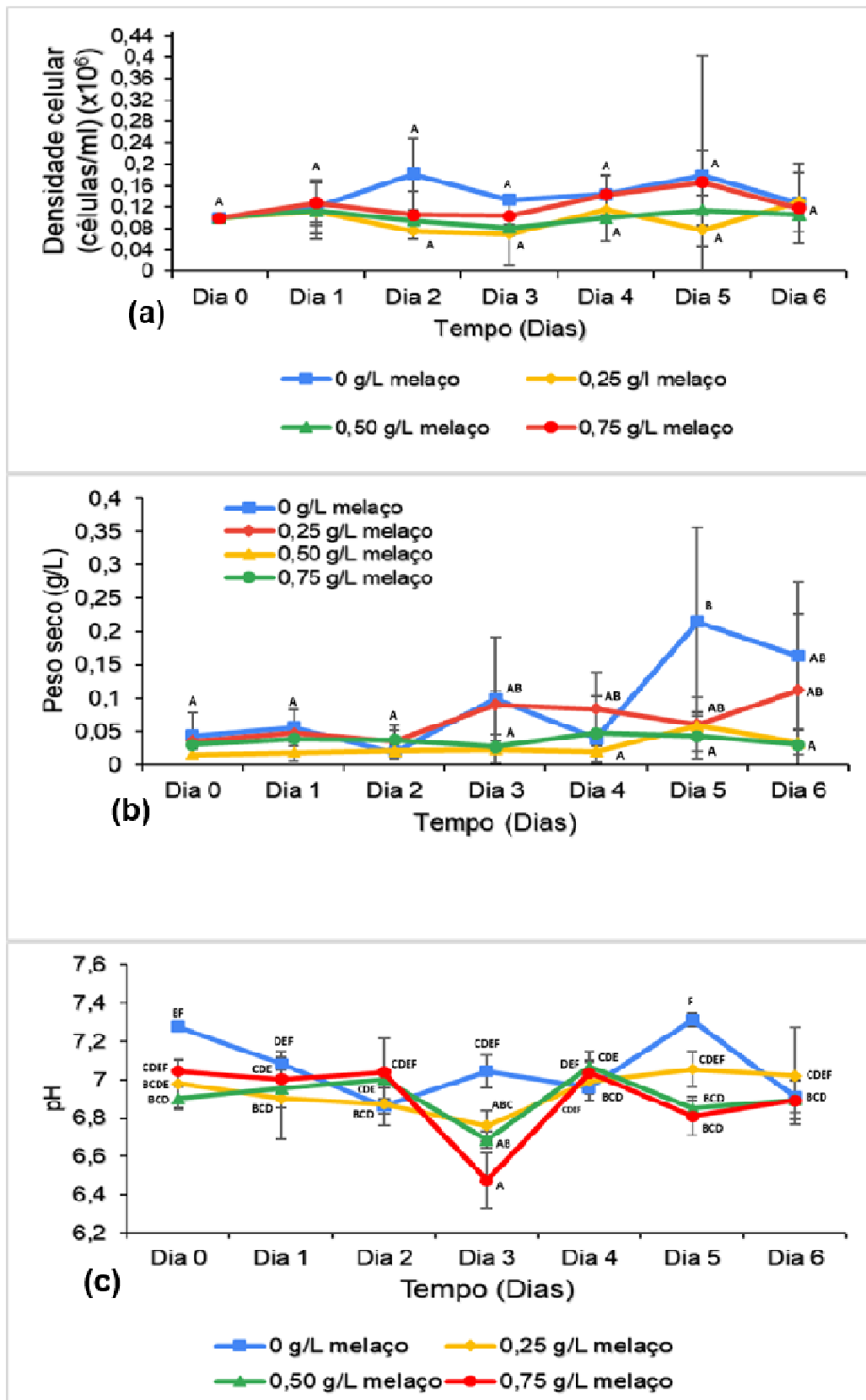
5.4.2 Peso seco

Os valores de peso seco não apresentaram variação significativa ao longo dos dias em todos os tratamentos testados, com exceção do maior valor produzido, observado no quinto dia de tratamento sem inclusão de melaço de cana de açúcar, que foi estatisticamente diferente do valor inicial dos cultivos (Figura 13b).

5.4.3 pH

Não houve diferença significativa dos valores de pH entre os tratamentos ao final dos seis dias de experimento, com os valores variando de 6,38 a 7,34. O menor valor foi observado na cultura com inclusão de 0,75 g/L de melaço de cana-de-açúcar, no dia três. O maior valor foi observado na cultura sem inclusão de melaço de cana no quinto dia de crescimento. Todos os tratamentos com inclusão de melaço de cana apresentaram um aumento significativo no valor de pH entre os dias três e quatro (Figura 13c).

Figura 13 - Densidade celular (a), peso seco (b) e pH (c) medidos ao longo dos experimentos à sem iluminação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor.

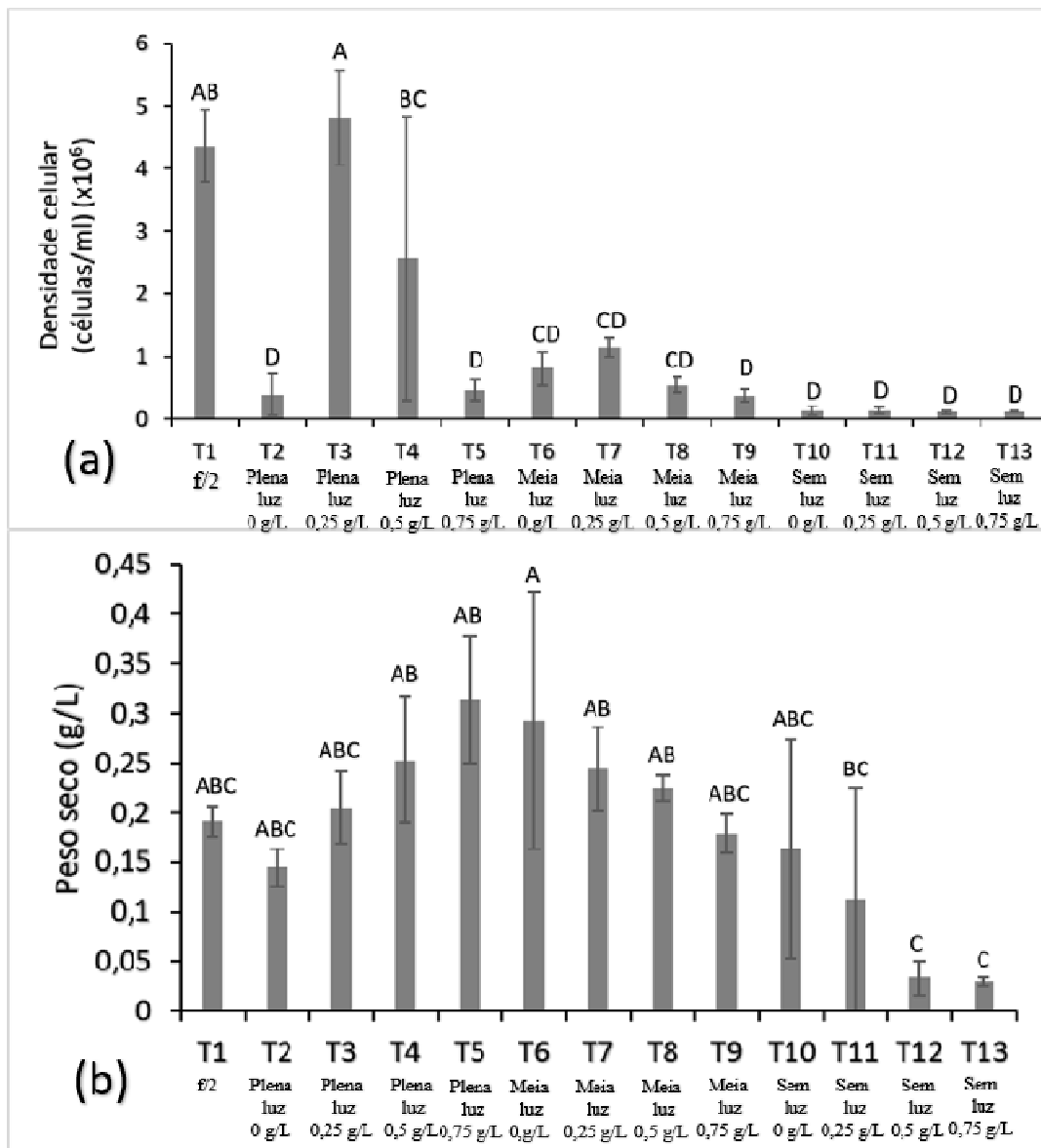
5.5 Densidade celular e biomassa produzida ao final do experimento

Considerando a densidade celular e peso seco gerados ao fim de seis de crescimento em todas as condições experimentais testadas, foram geradas as figuras 15 e 16 a fim de resumir mais claramente que tratamentos e condições resultaram em maiores crescimentos. Os maiores valores foram observados nos tratamentos T1 e T3, que correspondem ao cultivo em meio f/2 e meio fertilizante acrescido de 0,25 g/L de melaço de cana-de-açúcar, respectivamente, ambos à plena iluminação. Todos os outros tratamentos, com exceção do tratamento T4 (meio fertilizante com adição de 0,50 g/L de melaço, à plena iluminação), não apresentaram diferença significativa nos valores de densidade celular observadas, sendo esses os menores valores observados (Figura 14a).

Pode-se perceber que os tratamentos utilizando o meio fertilizante acrescido de 0,25 g/L de melaço, porém com iluminação reduzida ou sem iluminação, não cresceram tão bem quanto o tratamento à plena iluminação.

A Figura 14b mostra os valores de peso seco observados ao final do experimento em todos os tratamentos testados. O tratamento T5 (com adição de 0,75 g/L de melaço à plena iluminação) apresentou o maior valor de biomassa produzida ao final do experimento. Entretanto, não houve diferença significativa entre a maioria dos tratamentos realizados. Essa diferença apenas foi observada nos tratamentos T11, T12 e T13 (0,25; 0,50 e 0,75 g/L de melaço), todos na ausência de iluminação, tendo o último o tratamento apresentado o menor valor de biomassa estimada.

Figura 14 - Densidade celular e peso seco medidos ao final de seis dias em todas as condições experimentais testadas.



6 DISCUSSÃO

A comparação de todos os tratamentos e tempos experimentais permitiu destacar o crescimento em meio fertilizante com inclusão de 0,25 g/L de melaço de cana-de-açúcar à plena iluminação como melhor condição de crescimento em comparação com o meio f/2.

6.1 pH

Os valores de pH não mostraram um padrão definido de variação entre os dias e tratamentos testados. Isso contrasta com os estudos que mostram um aumento no valor de pH com o aumento da densidade celular dos cultivos, devido à escalada do consumo de CO₂ com um maior número de células (ROCHA *et al.*, 2003). Isso pode ser explicado pelo curto intervalo de tempo testado nos experimentos, o que não permitiria uma grande produção de células, que causaria um aumento nos valores de pH pelo consumo de CO₂.

As diversas espécies de microalgas possuem diferentes faixas de tolerância de pH, com alguns valores dentro dessa faixa descritos como ótimos, propiciando um melhor crescimento dos organismos (ZHU, 2015). O pH é por vezes controlado nos cultivos através do controle da adição de CO₂ (puro ou presente na atmosfera) por aeração (RAZAK *et al.*, 2015). Portanto, a determinação da concentração de CO₂ presente no ar que foi injetado aos cultivos durante os experimentos realizados poderia ajudar a avaliar qual a influência da injeção desse carbono inorgânico nos fotobiorreatores nos níveis e na variação do pH.

Razzak *et al.* (2015) encontraram valores ideais de pH para o crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata* em condições mixotróficas entre 5,5 e 6,5. Já Batley *et al.* (2014) encontraram uma faixa de pH ideal pra o crescimento da microalga *Nannochloropsis salina* entre 8 e 9, atingindo esses valores com a utilização de tampões. A média dos valores de pH ao longo dos tratamentos realizados nesse trabalho variavam de 6,4 à 7,5, podendo não ser o ideal para o crescimento ótimo da espécie testada. A determinação dessa faixa ideal de crescimento poderia ser utilizada no melhoramento dos cultivos nas condições testadas.

Os menores valores de pH ao longo dos experimentos foram encontrados nos cultivos com a maior adição de melaço de cana-de-açúcar (0,75 g/L). Isso pode ser explicado pelo pH ácido (5,0) do melaço de cana (EL-GENDY *et al.*, 2013) e pela baixa densidade celular encontrada nesses cultivos quando comparada com os outros tratamentos, o que leva a

menores taxas de consumo de CO₂ para a realização da fotossíntese e consequente diminuição no valor do pH. Além disso, a maior concentração de melação de cana estimula o crescimento de bactérias heterotróficas no meio de cultivo, devido à maior disponibilidade de carbono orgânico. Essas bactérias utilizam o O₂ para o seu metabolismo, liberando CO₂ e, conseqüentemente, reduzindo o pH, o que pode explicar os baixos valores encontrados nos cultivos com 0,75 g/L de melação adicionado ao meio.

A determinação da faixa ideal de pH para o crescimento da *N. oceanica* e o ajuste do pH para esses níveis, através da injeção de CO₂ ou uso de tampões, poderia levar à um melhoramento no crescimento dos tratamentos que obtiveram baixos valores de densidade celular nesse experimento.

6.2 Peso seco

O peso seco determinado nos cultivos não mostrou uma relação direta de variação com a densidade celular estimada. Era de se esperar que o aumento no número de células presentes no cultivo refletissem diretamente no aumento da biomassa produzida pelo mesmo, entretanto, isso não foi observado em todos os tratamentos.

O tratamento T1 (f/2), apesar de produzir uma maior biomassa ao final do sexto dia de experimento em comparação a T2 (meio fertilizante), mas os valores não mostraram diferença significativa. Esse maior valor pode ser explicado pelo maior número de células produzidas pelo tratamento com utilização do meio f/2.

Nos tratamentos com meia ou nenhuma iluminação, o maior valor de biomassa produzida foi medido no cultivo sem a adição de melação de cana-de-açúcar, mesmo esses tratamentos não mostrando a maior densidade celular comparada aos outros tratamentos sob as mesmas condições. Nas culturas com plena iluminação, o maior valor de biomassa produzida foi encontrado no tratamento com inclusão de 0,75 g/L de melação, mesmo com esse tratamento apresentando o pior desempenho ao levarmos em consideração o número de células produzidas.

Benvenuti et al. (2015) testaram o crescimento e a biomassa produzida de diversas espécies de microalgas sob privação ou não de nitrogênio aportado ao meio de cultivo. Uma das espécies testadas foi uma estirpe de *Nannochloropsis sp.*, que apresentou um incremento

de biomassa produzida ao longo do experimento tanto em cultivos N – repletos como em cultivos N – limitado. Entretanto, os maiores valores de aumento de biomassa produzida foram observados em culturas contendo uma maior quantidade de nitrogênio presente no meio. Beucklers et al. (2015) mostraram que os níveis e as formas químicas dos nutrientes aportados ao meio de cultivo podem levar as microalgas a ajustarem as concentrações de N e C na sua biomassa, produzindo assim um menor peso seco em baixos níveis de nutrientes disponíveis.

Além disso, sob condições estressantes, como limitação de nutrientes, aumento na intensidade luminosa ou variação de pH e salinidade, as microalgas passam por mudanças bioquímicas e morfológicas para garantirem a sua sobrevivência. Essa alteração da composição bioquímica das células pode levar à uma mudança do peso individual, gerando uma diferença na biomassa produzida pelo mesmo número de indivíduos cultivados em condições distintas (SAHA *et al.*, 2013).

A maior biomassa produzida em cultivos com uma maior inclusão de melaço de cana-de-açúcar, mesmo com uma menor densidade celular observada, pode ser explicada pela adaptação das células cultivadas às condições adversas, que podem ser causadas por:

- Uma baixa luminosidade incidente sobre os fotossistemas celulares, tendo em vista a coloração escura dos meios de cultivo onde os maiores níveis de melaço de cana foram aportados (Figura 5).
- Competição por nutrientes com bactérias heterotróficas, que estiveram mais presentes quanto maior fosse o nível de inclusão de melaço de cana.
- Menor pH, que foi observado em culturas com os maiores níveis de melaço de cana, já que esse composto possui um pH baixo.

Para testar essas hipóteses, seria necessário a análise da composição bioquímica dos indivíduos cultivados, atentando para a variação dessa composição entre os diferentes níveis de nutrientes e iluminações testados, o que evidenciaria a ação dos organismos para se adaptar às condições impostas. Além disso, a determinação da composição bioquímica das células produzidas sobre essas condições pode ser incorporada à protocolos de produção de biocompostos específicos. Leasing (2011) encontrou diferentes níveis de lipídeos produzidos no cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella sp.* sob diferentes concentrações de melaço de cana.

6.3 Densidade celular

O cultivo que utilizou o meio f/2 como fonte de nutrientes mostrou um aumento significativo na densidade celular nos dias quatro e cinco, enquanto o cultivo com utilização do meio fertilizante não apresentou crescimento ao longo dos dias testados. Roselet (2017) utilizou o meio fertilizante no cultivo da microalga *N. oceanica* e obteve bons resultados de aumento na densidade celular durante 29 dias de crescimento. Entretanto, o autor utilizou meio fertilizante acrescido da solução estoque de vitaminas modificada (Tabela 8), o que não foi feito nesse trabalho em razão de estarmos buscando uma alternativa acessível financeiramente e de as vitaminas aumentarem os custos.

A má adaptação das células inoculadas ao meio fertilizante podem ser explicadas devido às diferentes condições de cultivo entre o inóculo e o experimento. A temperatura e intensidade luminosa se mantiveram entre os dois cultivos, entretanto as células foram adicionadas à uma condição de aeração, que não estava presente na cultura usada como inóculo. A agitação das células e a maior disponibilidade de CO₂ causado pela inclusão de aeração pode explicar o baixo rendimento de crescimento celular da espécie testada. Além disso, as diferenças observadas entre os valores de densidade celular obtidos no crescimento da *N. oceanica* entre o presente trabalho e Roselet (2017) pode ser explicada pela não adição ao meio de cultivo da solução de vitaminas, que, como descrito na Tabela 1, possuem importantes funções no metabolismo celular. Neto et al. (2018) também obtiveram menores valores de densidades celulares no cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* em meios alternativos, como o meio fertilizante, quando comparada aos cultivos nas mesmas condições físicas em meio f/2, onde a falta da inclusão de vitaminas nos meios alternativos também foi teorizado pelos autores como o motivo dessa diferença.

Um maior período de tempo seria necessário para inferir se o tratamento T2 (meio fertilizante não acrescido de melão) não apresentou diferença significativa entre os valores de densidade celular medidos por apresentar uma condição limitante que impediria a replicação de células, ocasionando a morte do cultivo, ou apenas uma condição estressante, o que atrasaria o período de tempo até a observação de crescimento no número de células presentes no meio. Os tratamentos conduzidos sem a iluminação dos reatores não apresentaram diferença significativa nos valores de densidade celular entre si, o que evidencia

a impossibilidade da *N. oceanica* de crescer heterotroficamente utilizando o melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico.

Os tratamentos com iluminação reduzida e sem redução obtiveram os maiores valores de densidade celular nos cultivos onde a concentração de melão de cana-de-açúcar adicionada foi de 0,25 g/L. Entretanto, os valores máximos produzidos ao final dos seis dias de experimento foram maiores quanto maior foi a incidência luminosa sobre o cultivo. Isso mostra que o provável papel do melão de cana no melhoramento dos cultivos se deu no aumento do crescimento autotrófico dos mesmos. Isso também é corroborado pelo não crescimento heterotrófico das culturas sobre as condições testadas. Além disso, o metabolismo mixotrófico, por ser o crescimento das células tanto por autotrofia como por heterotrofia, não deve ter ocorrido nos tratamentos realizados.

Menegol et al. (2019) perceberam o crescimento mixotrófico da microalga *Nannochloropsis gaditana* em um meio composto por fertilizantes agrícolas (com adição de vitaminas), utilizando glucose e glicerol como fonte de carbono orgânico. Já Li et al. (2019) perceberam o melhoramento do cultivo mixotrófico da microalga *N. oceanica* em meio f/2 utilizando como fonte de carbono orgânico uma mistura de acetato e bicarbonato de sódio, enquanto Oliveira et al. (2018) não obtiveram um resultado positivo na substituição do meio f/2 por melão de cana-de-açúcar como fonte de nutrientes no cultivo da microalga *N. oculata* em cultivo autotrófico, possivelmente pelo fato do melão não apresentar concentrações satisfatórias de todos os macronutrientes essenciais para o crescimento da espécie.

Uma maior inclusão no melão de cana-de-açúcar aos cultivos também levou à uma redução na densidade celular estimada quando comparada a cultivos com uma menor inclusão desse composto sob as mesmas condições de iluminação. Isso pode ser explicado pelo escurecimento do meio de cultivo com a maior adição de melão de cana, por ser esse um líquido viscoso e escuro. A diferença na coloração do meio de cultivo pode ser observada na Fig. 5. Os cultivos com um maior nível de inclusão de melão de cana podem ter uma menor transparência, causando uma perda da energia luminosa recebida pelo cultivo quando essa adentra o fotobiorreator. Isso ocorre através de processos de reflexão, espalhamento e absorção (GARRISON, 2006). Além disso, uma maior inclusão de melão de cana eleva os níveis de carbono orgânico disponível no meio, permitindo o maior desenvolvimento de bactérias heterotróficas, que competem por nutrientes com a microalga cultivada. A determinação do comportamento de culturas axênicas sob as mesmas condições testadas nesse experimento podem ajudar a identificar o papel das bactérias nos cultivos.

O melhoramento do cultivo autotrófico da microalga *N. oceanica* em meio fertilizante com a adição de 0,25 g/L de melaço de cana-de-açúcar pode ser explicado pelo aporte de micronutrientes que exercem importantes papéis no metabolismo celular de organismos fitoplanctônicos, que não seriam aportados pelo meio alternativo testado. Clarke (2013) encontrou níveis de Vitamina B1 (2 – 10 ppm) e vitamina H (0,1 – 2 ppm) na composição do melaço de cana. As vitaminas se mostraram importantes no crescimento da microalga testada nesse experimento, podendo assim o melaço ter aportado esses compostos e melhorado o crescimento autotrófico das culturas. Além disso, Wright et al. (2014) observaram a presença de manganês (0,04 mg/g), zinco (3,4 µg/g) e ferro (0,073 g/mg) na composição do melaço de cana, sendo esses elementos nutrientes essenciais no crescimento de microalgas marinhas. Dessa forma, a determinação da composição do melaço de cana-de-açúcar que foi utilizado nos experimentos ajudaria a identificar como ele atuou no melhoramento dos cultivos autotróficos da microalga *N. oceanica*.

A determinação da composição bioquímica da *N. oceanica* pode ajudar a explicar a variação do peso seco ao longo do experimento, verificando o acúmulo ou perda de determinados compostos, além de determinar as quantidades de compostos bioquímicos (proteínas, lipídeos, dentre outros) produzidos pelas condições testadas, analisando assim a utilização do meio fertilizante acrescido ou não com melaço de cana-de-açúcar para a produção de células para uma determinada finalidade.

7 CONCLUSÃO

A microalga *Nannochloropsis oceanica* não obteve bom desempenho no crescimento em culturas onde o meio fertilizante foi utilizado quando comparado a culturas em meio f/2. Entretanto, um melhoramento foi alcançado com a utilização do melação de cana-de-açúcar em uma concentração de 0,25 g/L. O melação de cana-de-açúcar, com inclusão de 0,25 g/L, em adição ao meio fertilizante à plena iluminação obteve um desempenho igual ao meio f/2, podendo ser uma alternativa de menor custo a ser aplicada em cultivos de larga escala, sem alterações significativas no pH. A espécie testada não apresentou uma redução no número de células produzidas com uma redução na iluminação. As alterações de peso seco fornecem um indício sobre possíveis modificações bioquímicas nas células. Entretanto se faz necessário a análise bioquímica das células produzidas, para determinar a influência desse novo meio de cultivo nas condições celulares e inferir se as células produzem um bom nível de compostos bioquímicos para o qual a sua utilização é destinada, como proteínas e lipídios.

8 REFERÊNCIAS

- ACIÉN, F. G.; FERNANDÉZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. **Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it.** *Biotechnology advances*, 2012.
- ALVES, S. P; MENDONÇA, S. H; SILVA, J. L; BESSA, R. J. ***Nannochloropsis oceanica*, a novel natural source of rumen-protected eicosapentaenoic acid (EPA) for ruminants.** *Nature*, 2018.
- ASHOUR, M; ELSHOBARY, M. E.; EL-SHENODY, R; KAMIL, A; ABOMOHRRA, A. **Evaluation of a native oleaginous marine microalgae *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed.** *Biomass and bioenergy*, 2019.
- BARKA, A; BLECKER, C. **Microalgae as potential source of single-cell proteins. A review.** *Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement*, 2016.
- BARROS, A; GUERRA, L. T; SIMÕES, M; SANTOS, Edgar; FONSECA, Diana; SILVA, Joana; COSTA, Luís; NAVALHO, João. **Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures.** *Algal research*, 2017.
- BARTLEY, M. L; BOEING, W. J; DUNGAN, B. N; HOLGUIN, F. O; SCHAUB, T. **pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms.** *Journal of applied phycology*, 2014.
- BASSO, L. C; BASSO, T. O; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation.** *Biofuels production*, 2011.
- BENVENUTI, G; BOSMA, R; CUARESMA, M; JANSSEN, M; BARBOSA, M. J.; WIJFFELS, René H. **Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation.** *Journal of applied phycology*, 2015.
- BEUCKLERS, A; SMOLDERS, E; KOENRAAD, M. **Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment.** *Water research*, 2015.
- CHEW, K. W; CHIA, S. R.; SHOW, P. L; YAP, Y. J; LING, T. C; CHANG, J. **Effects of water culture medium, cultivation system and growth modes for microalgae cultivation: a review.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2018. P. 332 – 344.
- CHOJNACKA, K; NOWORYTA, A. **Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures.** *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. P. 461 – 465.
- CLARKE, M. A. **Encyclopedia of food sciences and nutrition (second edition)**, 2003.
- EL-GENDY, N. S; MADIAN, H. R; AMR, S. S. A. **Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology.** *International journal of microbiology*. 2013.
- ELNABRIS, K. J. **Development of cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on agricultural grade fertilizers available in the local market of Gaza strip.** *Journal of Al Azhar*, 2012.

- FERNÁNDEZ, F. G. A; SEVILLA, J. M. F; GRIMA, E. M. **Costs analysis of microalgae production.** Biofuels from algae, 2019. P. 551 – 566.
- FERNÁNDEZ-LINARES, L. C; BARAJAS, C. G; PÁRAMO, E D; CORONA, J. A. B. **Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium.** Bioresource Technology, 2017.
- FERNÁNDEZ-LINARES, L; PÁRAMO, E. D; BARAJAS, C. G. **A scale-up evaluation of a semicontinuous culture of *Scenedesmus* sp. In a raceway under greenhouse conditions using a commercial fertilizer as culture medium.** Biofuels, 2019.
- GOLDEN, C. D; ALLISON, E. H; CHEUNG, W. W. L; DEY, M. M; HALPERN, B. S; MCCAULEY, D. J; SMITH, M.; VAITLA, B; ZELLER, D; MYERS, S. S. **Nutriton: Fall in fish catch threatens human health.** Nature, 2016.
- GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.
- HU, J; NAGARAJAN, D; ZHANG, Q; CHANG, J; LEE, D. **Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review.** Biotechnology advances, 2018.
- JANSSEN, M. **Chapter Four – Microalgal Photosynthesis and Growth in Mass Culture.** Advances in Chemical Engineering, 2016. P. 185 – 256.
- JEROMSON, S; GALLAGHER, I. J.; GALLOWAY, S. D. R.; HAMILTON, D. L. **Omega - 3 fatty acids and skeletal muscle health.** Marine drugs, 2015. P. 6977 – 7004.
- JI, M. K; YUN, H. S; PARK, Y. T; KABRA, A. N; OH, I. H; CHOI, J. **Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and the flue gas CO₂ for biomass production.** Journal of Environmental Management, 2015.
- LEE, R. E. **Phycology.** Cambridge, 2008.
- LEE, Y.K; ZHANG, D.H; **Production of astaxanthin by *Haematococcus*.** Chemicals from Microalgae, 1999.
- LEESING, R; KOOKKHUNTHOD, S; NONTASO, N. **Microalgal Lipid production by microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2.** International journal of Biotechnology and Bioengineering, 2011.
- LI, Y; HUANG, A; GU, W; WU, S; XIE, X; WANG, G. **Effects of inorganic carbon and light on acetate assimilation by *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) in mixotrophic cultivation.** European journal of phycology, 2019.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2007.
- LOWREY, J; BROOKS, M. S.; MCGINN, P. J. **Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewater and associated challenges – a critical review.** Journal of applied phycology, 2015.
- MARTINS, D. A; CUSTÓDIO, L; BARREIRA, L; PEREIRA, H; BEN-HAMADOU, R; VARELA, J; ABU-SALAH, K. M. **Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae.** Marine drugs, 2013.

- MATA, T. M; MARTINS, A. A; CAETANO, N.S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review**. Renewable and sustainably energy reviews, 2010.
- MENEGOL, T; VILLEGAS, G. I. R; RODRÍGUEZ, M. L; LÓPEZ, E. N; ROSALES, L. L; CHISTI, Yusuf; GARCÍA, M. C; GRIMA, E. M. **Mixotrophic production of polyunsaturated fatty acids and carotenoids by the microalga *Nannochloropsis gaditana***. Journal of applied phycology, 2019.
- Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Produção brasileira de cana-de-açúcar, açúcar e etanol**, 2019.
- MOHSENPOUR, S. F; WILLOUGHBY, N. **Effect of CO₂ aeration on cultivation of microalgae in luminescent photobioreactors**. Biomass and Bioenergy, 2016.
- NAGAJARAN, D; LEE, D; CHANG, J. **Heterotrophic microalgal cultivation**. Bioreactors for microbial biomass and energy conversion, 2018.
- NETO, W. A. F; MENDES, C. R. B; ABREU, P. C. **Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture medium**. Aquaculture research, 2018.
- ODJADJARE, E. C; MUTANDA, T; OLANIRAN, A. O. **Potential technological application of microalgae: a critical review**. Critical reviews in biotechnology, 2017.
- OLIVEIRA, N. G; TAVARES, T. C. L; BARROSO, H. S; SOARES, M. O. **Utilização do melaço de cana como fonte de nutrientes alternativa no cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata***. Resumo no congresso XXX Semana nacional da oceanografia,. Universidade federal do Rio Grande, 2018.
- PODEVIN, M; FRANSCISCI, D; HOLDT, S. L.; ANGELIDAKI, I. **Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high-throughput in vivo microplate autofluorescence method**. Journal of applied Phycology, 2015.
- QIU, R; GAO, S; LOPEZ, P. A.; OGDEN, K. L. **Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana***. Algal research, 2017.
- RASOULI, Z; VALVERDE-PEREZ, B; D'ESTE, M; FRANCISCI, D; ANGELIDAKI, Irini. **Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs**. Biochemical Engineering Journal, 2018.
- RAZZAK, S. A; ILYAS, M; ALI, S. A. M; HOSSAIN, M. M. **Effects of CO₂ concentration and pH on Mixotrophic Growth of *Nannochloropsis oculata***. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015.
- RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology**. Blackwell science, 2004.
- ROCHA, J.M.S; GARCIA, J.E.C; HENRIQUES, M.H.F. **Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana***. Biomolecular engineering. 2003
- ROSELET, M. C. T. **Efeito da matéria orgânica dissolvida na concentração da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica***. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Rio Grande, 2017.

- RUANGSOMBOON, S. **Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition.** Bioresource technology, 2015.
- SAHA, S. K; MCHUGH, E; HAYES, J; MOANE, S; WALSH, D; PATRICK, M. **Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haemotococcus pluvialis*.** Bioresource technology, 2013.
- SAJJADI, B; CHEN, W; RAMAN, A. A. A; IBRAHIM, S. **Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition.** Renewable and sustainable energy reviews, 2018. P. 200 – 232.
- SÁNCHEZ, D. M; RODRIGUEZ, O. A. M. **Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015.
- SHUBA, E. S; KIFLE, D. **Microalgae to biofuels: 'promising' alternative and renewable energy, review.** Renewable and sustainable energy reviews, 2018. P. 743 – 755.
- TOCHER, D. R. **Omega – 3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective.** Aquaculture, 2019. P. 94 – 107.
- WAHIDIN, S; IDRIS, A; SHALEH, S. R. M. **The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp..** Bioresource technology, 2013. P. 7 -11.
- WANG, Y; HE, B; SUN, Z; CHEN, Y. **Chemically enhanced lipid production from microalgae under low sub-optimal temperature.** Algal research, 2016.
- WRIGHT, A. G.; ELLIS, T. P.; LLAG, L. L. **Filtered molasses concentrate from sugar cane: Natural functional ingredient effective in lowering the glycaemic index and insulin response of high carbohydrate foods.** Plant foods humans nutrition, 2014.
- YAMASHITA, C; MAGALHÃES, P. M. D. S. **Método simples para o cultivo da alga *Tetraselmis chuii*.** EMPARN, 1984. Boletim de pesquisa, 7: 1-20.
- ZHU, C., J.; LEE, Y., K.. **Determination of biomass dry weight of marine microalgae.** Journal of applied technology, 1997.
- ZHU, L. **Microalgal culture strategies for biofuel production: a review.** Biofuels, bioproducts & biorefining, 2015.