Universidade do Minho
Escola de Ciências

Diogo Santos Tavares Carvalho

Desenvolvimento de biofertilizantes para a produção de microalgas marinhas (*Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*) e de água doce (*Chlorella vulgaris*)

outubro de 2024

Desenvolvimento de biofertilizantes para a produção de microalgas marinhas (*Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*) e de água doce (*Chlorella vulgaris*)

Diogo Santos Tavares Carvalho

UMinho | 2024

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Diogo Santos Tavares Carvalho

Desenvolvimento de biofertilizantes para a produção de microalgas marinhas (*Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*) e de água doce (*Chlorella vulgaris*)

Dissertação de Mestrado Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação de
Doutor Pedro Fernandes Seixas
Doutora Ana Cristina Gomes da Cunha

outubro de 2024

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição - Não Comercial - Compartilha Igual

CC BY-NC-SA

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer antes de mais ao Doutor Pedro Seixas que me orientou durante este ano de trabalho, a nível prático e teórico, e que me permitiu realizar o estágio que originou este trabalho. Estágio este que me foi imprescindível, foi uma oportunidade única de trabalhar e adquirir novos conhecimentos, assim como uma valiosa experiência prática. Quero também agradecer a toda a equipa da AQUALGAE e da Eletro-coi que tive o prazer de conhecer e de trabalhar os quais me acolheram nas suas instalações.

À Doutora Ana Cristina Gomes da Cunha que durante todo este trabalho me orientou e auxiliou com a escrita do mesmo.

À minha família que me viu crescer e me acompanha sempre em todas as etapas da minha vida, que vê os meus altos e baixos, as vitórias e as derrotas, e que me dão muito amor. Em especial aos meus avôs, Hipólito e Celeste que sempre cuidaram de mim, e ainda hoje o fazem, aos meus padrinhos, Carlos e Cristina que sempre me apoiaram e incentivaram, e aos meus dois pequenos primos, Carolina e Miguel, que são como irmãos que nunca tive. E claro aos meus pais, Rui e Ermelinda, a quem devo tudo, a pessoa que sou e tudo o que fiz, que me criaram e educaram para ser hoje tudo que sou, sem vocês sempre ao meu lado sem dúvida não seria quem sou, tenho-vos muito carinho e amor.

Aos meus amigos de infância e que ainda hoje me acompanham e que muito me ajudaram a descontrair e desanuviar do stress proveniente de um trabalho destes, Fábio, Inês, Adriano, obrigado por tudo.

À minha companheira, e cúmplice de todas as horas, Marisa, com quem partilho os meus momentos de triunfo e alegria, mas também com quem compartilho os desafios que enfrento, obrigado por me apoiares e motivares sempre. Muitas vezes me viste a stressar e dar em doido com este trabalho. Eu amo-te.

Acabo assim mais uma etapa, mais um desafio superado, o meu Eu de 17 anos, ainda incerto na sua escolha de Bioquímica, nunca seria capaz de se imaginar aqui, mas, no entanto, aqui estou Eu, Orgulhoso.

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.
- Fernando Pessoa

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Desenvolvimento de biofertilizantes para a produção de microalgas marinhas (*Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii)* e de água doce (*Chlorella vulgaris)*

RESUMO

As microalgas são organismos de elevado interesse devido às suas inúmeras aplicações industriais e comerciais, como a indústria aquícola, alimentação e suplementos alimentares, cosmética e farmacêutica, a produção de biofertilizantes para agricultura, matéria-prima para rações animais, e ainda em aplicações ambientais, como a remediação. Face à crescente procura por produtos de origem biológica por parte dos consumidores torna-se relevante substituir os meios de cultura de síntese química, atualmente usados na produção de microalgas, por alternativas à base de biofertilizantes. Assim, o objetivo desta dissertação foi desenvolver, na empresa AQUALGAE Sucursal em Portugal, um meio de cultura com certificação 100% biológica para o cultivo de algumas espécies de microalgas de interesse comercial. As espécies selecionadas foram *Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris*, amplamente utilizadas em biotecnologia e aquacultura devido às suas características e perfil nutricional. Os ensaios de crescimento foram realizados em biorreatores de 1 litro, tendo-se testado, juntamente com o meio standard da empresa (Gold Medium, GM) vários biofertilizantes – Orgatrex (Org), Bionova (BioN), Bio Grow (BG) e Bio Bloom (BB) – e formulações preparadas com misturas destes (O+B e G+BB) com o intuito de identificar uma formulação que pudesse dar origem a boas taxas de crescimento e de biomassa. De um modo geral, as formulações testadas ficaram aquém da obtida com o meio GM, tendo-se constatado, no entanto, que a formulação G+BB, embora ainda não estando ao nível dos meios tradicionalmente usados em aquacultura, como o meio f/2 (Fórmula Guillard), foi a que claramente deu melhores crescimentos. Assim, os resultados obtidos com G+BB demonstraram que esta formulação representa uma base promissora para o desenvolvimento de biofertilizantes 100% biológicos e sustentáveis, sendo necessário prosseguir com análise do perfil nutricional para eventuais reforços e/ou ajustes, e das respostas dependentes da espécie de microalga. Como perspetivas futuras, propõe-se ainda testar fontes biológicas alternativas de nutrientes, a fim de superar as limitações observadas na formulação G+BB e otimizar o cultivo de microalgas, contribuindo para uma produção mais ecológica e economicamente viável.

Palavras-chave: Microalgas, Meio de cultura, Aquacultura, Biofertilizante, Sustentabilidade.

Development of biofertilizers for the production of marine microalgae (*Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*) and freshwater microalgae (*Chlorella vulgaris*)

ABSTRACT

Microalgae are organisms of significant interest due to their numerous industrial and commercial applications, such as aquaculture, food and dietary supplements, cosmetics and pharmaceuticals, biofertilizer production for agriculture, source of animal feed, and environmental applications such as bioremediation. Given the increasing consumer demand for biologically sourced products, it becomes relevant to replace the chemically synthesized culture media, currently used in microalgae production, with biofertilizer based alternatives. The objective of this dissertation, developed in collaboration with the company AQUALGAE branch in Portugal, was to create a culture medium with 100% organic certification for cultivating selected species of commercially valuable microalgae. The selected species were *Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*, and *Chlorella vulgaris*, widely employed in biotechnology and aquaculture due to their nutritional characteristics and profiles. Growth trials were conducted in 1-liter bioreactors, testing the company's standard medium (Gold Medium, GM) along with various biofertilizers – Orgatrex (Org), Bionova (BioN), Bio Grow (BG), and Bio Bloom (BB) – and formulations prepared with these mixtures (O+B and G+BB) to identify a formulation that could yield high growth and biomass rates. In general, the tested formulations fell short of the performance observed with GM. However, the G+BB formulation, while not yet comparable to traditionally used media in aquaculture, such as f/2 (Guillard's Formula), showed the highest growth rates among the experimental groups. Thus, the results obtained with G+BB demonstrated that this formulation represents a promising foundation for developing sustainable, 100% organic biofertilizers. Further analysis of the nutritional profile will be needed for possible adjustments and/or enhancements, as well as species-specific responses. As future perspectives, it is also proposed to test alternative biological nutrient sources to overcome the limitations observed with G+BB and to optimize microalgae cultivation, contributing to a more ecological and economically viable production approach.

Keywords: Microalgae, Culture medium, Aquaculture, Biofertilizer, Sustainability.

ÍNDICE

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS ii
AGRADECIMENTOS iii
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE iv
RESUMO v
ABSTRACT vi
ÍNDICE vii
LISTA DE ABREVIATURAS x
LISTA DE FIGURAS xi
LISTA DE TABELAS xv
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. A empresa AQUALGAE e enquadramento geral do trabalho 1
1.2. Microalgas 1
1.2.1. Evolução da pesquisa em microalgas 4
1.2.2. Principais aplicações 5
1.2.2.1. Aquacultura 6
1.2.2.2. Ingrediente em rações 6
1.2.2.3. Suplementos para consumo humano 7
1.2.2.4. Nutracêuticos 7
1.2.2.5. Cosméticos 8
1.2.2.6. Biofertilizantes 8
1.2.2.7. Tratamento de efluentes 8
1.2.2.8. Biocombustíveis 10
1.2.3. Espécies em estudo 10
1.2.3.1. *Phaeodactylum tricornutum* 11
1.2.3.2. *Tisochrysis lutea* 11
1.2.3.3. *Chaetoceros calcitrans* 12
1.2.3.4. *Tetraselmis chuii* 12
1.2.3.5. *Chlorella vulgaris* 13
1.3. Biorreatores e produção de microalgas 13
1.3.1. Fotobiorreatores 15
1.3.1.1. Principais fatores determinantes no funcionamento de um fotobiorreator 16
1.3.2. Classificação 17
1.3.2.1. Fases de crescimento das culturas celulares 17

1.3.2.2. Modos de operação 20
1.4. Meios de cultura 21
1.4.1. Constituintes de um meio de cultura 21
1.4.2. Meios de cultura mais utilizados na cultura de microalgas 23
1.5. Objetivos 24
2. MATERIAL E MÉTODOS 25
2.1. Material biológico e arranque das culturas de microalgas 25
2.2. Preparação e instalação dos biorreatores 26
2.3. Água para os meios de cultura: recolha, filtração e salinidade 28
2.4. Formulação dos meios de cultura 29
2.5. Formulação dos suplementos 30
2.6. Modo de operação dos biorreatores 31
2.7. Ensaios para avaliação do desempenho dos meios nutritivos 32
2.8. Análise quantitativa de crescimento das culturas 33
2.9. Análise estatística 35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
3.1. Primeira fase – ensaios com os meios de cultura Orgatrex (Org) e Orgatrex+Bionova (O+B) 36
3.1.1. Crescimento de microalgas com os meios Org e O+B 37
3.1.1.1. *Tisochrysis lutea* 37
3.1.1.2. *Phaeodactylum tricornutum* 38
3.1.1.3. *Chaetoceros calcitrans* 40
3.1.1.4. *Tetraselmis chuii* 42
3.1.1.5. *Chlorella vulgaris* 43
3.1.2. Identificação de fatores limitantes: vitaminas e fósforo 46
3.1.2.1. Ensaio com suplementação de vitaminas 47
3.1.2.2. Ensaio com suplementação de fósforo 50
3.2. Segunda fase – ensaios com os meios de cultura Bio Grow (BG) e Bio Grow+Bio Bloom (G+BB) 53
3.2.1. Crescimento de microalgas com meios BG e G+BB 53
3.2.1.1. *Tisochrysis lutea* 53
3.2.1.2. *Phaeodactylum tricornutum* 55
3.2.1.3. *Chaetoceros calcitrans* 56
3.2.1.4. *Tetraselmis chuii* 58
3.2.1.5. *Chlorella vulgaris* 59
3.2.2. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* com os meios GM, Bio Bloom (BB) e G+BB 61
3.3. Terceira fase – ensaios com os meios de cultura Bio Grow+Bio Bloom e meio de Guillard f/2 (f/2) 63

3.3.1. *Tisochrysis lutea* 64
3.3.2. *Phaeodactylum tricornutum* 65
3.3.3. *Chaetoceros calcitrans* 67
3.3.4. *Tetraselmis chuii* 68
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS 72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

LISTA DE ABREVIATURAS

GM – Gold Medium

Org – Orgatrex

BioN – Bionova

O+B – Orgatrex+Bionova

BG – Bio Grow

BB – Bio Bloom

G+BB – Bio Grow+Bio Bloom

f/2 – Meio f/2 de Guillard

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do número de publicações na área das micralgas de 1960 até 2023, com recurso à base de dados Scopus e usando como palavra-chave "microalgae", ... 5
Figura 2 – Montagem de fotografias das várias espécies utilizadas no trabalho. Fotografias de Diogo Carvalho. 11
Figura 3 – Exemplos de biorreatores utilizados no cultivo de microalgas, nomeadamente, da esquerda para a direita, fotobiorreator de coluna de bolhas e tubular. Fotos cedidas pela **AQUALGAE.** 14
Figura 4 – A, Curva típica de crescimento de uma cultura de células em sistema fechado ou batch. **B**, Curva típica de crescimento de uma cultura de células em cultura contínua. 19
Figura 5 – Exemplos ilustrativos de culturas-mãe das espécies Chlorella vulgaris, Chaetoceros gracilis, Cylindrotheca closterium e Thalassiosira pseudonana, mantidas sob condições controladas (18± 3 °C, fotoperíodo 12 h:12 h). 25
Figura 6 – Montagem ilustrando os vários constituintes das garrafas utilizadas como biorreator. **a)** Garrafa de cultura; **b)** tampa adaptada. A, orifício de 3,5 mm. B e C, orifício de 3,0 mm. **c)** Tubagem completa da tampa adaptada; **d)** Visualização das diferentes extremidades dos tubos de silicone. F, extremidade de teflon. G, capilar de 100 µL. 26
Figura 7 – Estante e seus componentes. **a)** Visão frontal da estante. A, secção de ligação do ar; B, secção de ligação do CO_2; **b)** amplificação da secção de ligação do ar. C, filtro de ar. 27
Figura 8 – Controlo das luzes e CO_2. 28
Figura 9 – Mapa da cidade de Viana do Castelo, com a localização da empresa **AQUALGAE** e percurso até à praia onde se faz a recolha da água (Praia Norte). Imagem retirada e adaptada do Google Maps. 29
Figura 10 – Estante operacional durante um ensaio com a espécie Tetraselmis chuii (dia 5 do ensaio). 32
Figura 11 – a), biofertilizantes Bio Grow e Bio Bloom; **b)**, Biofertilizantes Orgatrex e Bionova.. **Erro! Marcador não definido.**
Figura 12 – Câmara de contagem Neubauer Improved 34
Figura 13 – Grelha de contagem da câmara de Neubauer Improved. Área de contagem destacada a vermelho. 34
Figura 14 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10º dia), das suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 37
Figura 15 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de Tisochrysis lutea em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B. 38
Figura 16 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 8 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (8º dia), das suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 39
Figura 17 – Oitavo e último dia de cultura das suspensões de Phaeodactylum tricornutum em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B. 39
Figura 18 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Chaetoceros calcitrans nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Chaetoceros calcitrans nos meios

GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 41
Figura 19 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Chaetoceros calcitrans em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B. 41
Figura 20 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 42
Figura 21 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Tetraselmis chuii em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B. 43
Figura 22 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Chlorella vulgaris nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Chlorella vulgaris nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 44
Figura 23 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Chlorella vulgaris em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B. 45
Figura 24 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, Org e Org+Vit, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, Org e Org+Vit. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 48
Figura 25 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Tisochrysis lutea em meio GM, Org e Org+Vit. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois Org+Vit. 49
Figura 26 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, Org (P) e O+B (P), ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, Org (P) e O+B (P). Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 51
Figura 27 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Tetraselmis chuii em meio GM, Org (P) e O+B (P). Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org (P) e depois O+B (P). .. 52
Figura 28 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 54
Figura 29 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Tisochrysis lutea em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB. 54
Figura 30 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão

(DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 55
Figura 31 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Phaeodactylum tricornutum em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB.. 56
Figura 32 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Chaetoceros calcitrans em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB. 57
Figura 33 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Chaetoceros calcitrans nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Chaetoceros calcitrans nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 57
Figura 34 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 58
Figura 35 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Tetraselmis chuii em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB. 59
Figura 36 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Chlorella vulgaris nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de Chlorella vulgaris nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 60
Figura 37 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Chlorella vulgaris em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB. 60
Figura 38 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, BB e G+BB, ao longo de 7 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (7º dia), das suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, BB e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 62
Figura 39 – Nono e último dia de cultura das suspensões de Phaeodactylum tricornutum em meio GM, BB e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BB e depois G+BB.. 62
Figura 40 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10º dia), das suspensões de Tisochrysis lutea nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 64

Figura 41 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de Tisochrysis lutea em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB. 65
Figura 42 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10° dia), das suspensões de Phaeodactylum tricornutum nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 66
Figura 43 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de Phaeodactylum tricornutum em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB. 66
Figura 44 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Chaetoceros calcitrans nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10° dia), das suspensões de Chaetoceros calcitrans nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 67
Figura 45 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de Chaetoceros calcitrans em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB. 68
Figura 46 – A: Curvas de crescimento de suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10° dia), das suspensões de Tetraselmis chuii nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05). 69
Figura 47 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de Tetraselmis chuii em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipologias de fotobiorreator considerando a performance em determinados parâmetros operacionais*. 16
Tabela 2 – Lista de micronutrientes e elementos traço. 22
Tabela 3 – Espécies utilizadas nos vários ensaios e habitat. 25
Tabela 4 – Nomes dos meios comerciais, siglas usadas e proporções dos produtos comerciais na solução stock e nos meios nutritivos finais. 30
Tabela 5 – Composição das soluções de meio ou nutrientes inorgânicos para espécies de água doce. 30
Tabela 6 – Suplementos adicionais utilizados, respetivas espécies, modo de preparação e concentração utilizada nos ensaios. 31

1. INTRODUÇÃO

1.1. A empresa AQUALGAE e enquadramento geral do trabalho

O presente trabalho de mestrado surgiu da vontade em aplicar conhecimentos adquiridos na área de Biotecnologia e realizar a tese em ambiente empresarial e foi possível concretizar no âmbito da parceria estabelecida com a empresa **AQUALGAE** (aqualgae.com), a qual já tem 13 anos de experiência no mercado, e que disponibilizou espaço, material e orientação essenciais à elaboração do mesmo.

A AQUALGAE apresenta uma variedade de serviços e produtos, como o desenho, fabricação e instalação de fotobiorreatores da escala laboratorial à industrial e serviços de consultoria, assim como o fornecimento de serviços de automação, monitorização e controlo de qualidade das unidades de aquacultura, e, por fim, uma vertente biológica relacionada com a produção de microalgas, fornecendo inóculos e biomassa liofilizada assim como meios de cultura otimizados.

Os seus serviços e produtos abrangem uma variedade de áreas e setores, como a aquacultura e agricultura, nomeadamente com vista ao consumo humano, tratamento de águas residuais, cosmética, farmacêutica e mitigação de CO_2.

Devido à crescente procura de produtos de origem biológica por parte dos consumidores, há também a necessidade de introduzir na cadeia de produção alternativas de reagentes/aditivos/meios/conservantes de base biológica. No caso da AQUALGAE pretende-se identificar substitutos aos atuais meios de cultura de síntese química, usados na produção de microalgas para consumo humano e animal. Os meios de cultura presentemente utilizados são de síntese química e, como tal, pretendemos com este trabalho encontrar uma alternativa à base de biofertilizantes com certificação biológica.

1.2. Microalgas

O termo microalgas provém do facto destas algas, ao contrário das restantes (macroalgas), serem organismos unicelulares e como o próprio nome indica são de escala microscópica, apesar de haver algumas que formam colónia. Apesar do seu tamanho microscópico estes organismos fotoautotróficos são de grande interesse económico e científico devido às suas diversas aplicações, as quais iremos detalhar mais adiante. Devido ao aumento da população mundial e à consequente necessidade de aumentar a produção alimentar e de outros bens, associada à pressão por métodos de produção mais sustentáveis e saudáveis, torna-se premente a utilização de alternativas biológicas sobre o uso produtos de síntese química. O setor das microalgas não é exceção, sendo os atuais meios de cultura utilizados preparados a partir de químicos de síntese ou de extração de recursos na natureza,

com consumo de recurso fósseis, como tal, é de elevado interesse encontrar alternativas biológicas, de igual ou superior qualidade, aos produtos atualmente utilizados.

O primeiro registo do uso de microalgas por seres humanos remonta a milhares de anos atrás, quando na China se recorreu ao consumo de algas do género Nostoc para sobreviver a um período de fome extrema (Qiu *et al.*, 2002). Da mesma forma, *Spirulina platensis* era consumida por tribos africanas na região do Lago Chade, enquanto *Spirulina geitleri* fazia parte da dieta dos aztecas que habitavam nas proximidades do Lago Texcoco, perto da atual Cidade do México (Santillan, 1982). As microalgas são seres unicelulares encontrando-se presentes numa grande diversidade de ambientes com condições variadas, sendo possível encontrar microalgas em água doce, água salobra e água salgada (Rodríguez-Palacio *et al.*, 2012). Para além destes exemplos, também é possível encontrar microalgas em alguns dos ambientes mais extremos presentes na Terra como, fissuras hidrotermais, fontes termais e no gelo na Antártica (Jensen *et al.*, 2001).

A diversidade destes seres vivos não se observa apenas no vasto leque de habitats nos quais se encontra. As algas, tanto macro como microalgas, são grupos polifiléticos. Isto é, as algas não formam um único grupo monofilético, mas sim vários grupos monofiléticos diferentes que independentemente desenvolveram características semelhantes, como a fotossíntese. Estes diferentes grupos de organismos desenvolveram características semelhantes por convergência evolutiva, ao invés de um antepassado comum (Metting, 1996).

Esta diversidade evolutiva das microalgas é refletida nas suas composições genéticas, morfologias e características funcionais, as quais influenciam os seus papeis ecológicos e possíveis aplicações biotecnológicas. Estas características são realçadas pelas diferentes vias metabólicas, componentes estruturais e produtos secundários que cada espécie apresenta, o que concede um interesse em várias espécies para diferentes indústrias como alimentar, farmacêutica e biocombustíveis. Assim como uma capacidade de prosperar em diversos ambientes distintos (De Jesus Raposo & De Morais, 2015; Bernaerts *et al.*, 2019).

Desta grande diversidade referida anteriormente, segundo Robert Edward Lee (2018), podemos dividir as algas em quatro grandes grupos, nos quais se englobam as microalgas, ou seja:

(1) Procariotas. As cianobactérias são as únicas algas procarióticas;

(2) Algas eucarióticas com cloroplastos rodeados por ambas as membranas do cloroplasto;

(3) Algas eucarióticas com o cloroplasto rodeado por apenas uma membrana do retículo endoplasmático do cloroplasto;

(4) Algas eucarióticas com o cloroplasto rodeado por duas membranas do retículo endoplasmático do cloroplasto.

As **cianobactérias (1)** apresentam clorofila *a* (sendo possível observar em algumas também clorofila *b* ou *d*), ficobiliproteínas, glicogénio como produto de armazenamento e paredes celulares constituídas por aminoácidos e açúcares com grupo amino.

O segundo grupo **(2)** é constituído por três divisões, Glaucophyta, Rhodophyta e Chlorophyta. Destacando a divisão Chlorophyta, o qual engloba duas espécies abordadas neste trabalho *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii*. Esta divisão caracteriza-se pela presença de clorofila *a* e *b* e pigmentos de cloroplastos semelhantes aos das plantas superiores, sendo o carotenoide principal é a luteína. Além disso, a formação de amido, composto por amilose e amilopectina, ocorre dentro do cloroplasto, em associação com um pirenoide, se estiver presente, contrastando as restantes algas eucarióticas onde a formação do produto de armazenamento ocorre no citoplasma. A divisão Chlorophyta é constituído maioritariamente por espécies de água doce, sendo apenas 10% marinhas.

O género *Chlorella* em particular tem aplicações na área alimentar devido ao facto de produzir pouca celulose, deste modo, uma maior percentagem da célula é digerível do que em espécies com grande quantidade de celulose. O género *Tetraselmis* é das poucas algas que apresentam sifonoxantina e o seu éster sifoneina.

No terceiro grupo **(3)** encontram-se os únicos grupos de algas com apenas uma única membrana do retículo endoplasmático (R.E.) do cloroplasto a envolver o cloroplasto, nomeadamente, Euglenophyta, Dinophyta e Apicomplexa. Estas algas apresentam um mecanismo de regulação dos níveis de CO_2, o que permite superar outras espécies em ambientes com baixos níveis de CO_2 dissolvido. Isto deve-se ao facto de o pH no espaço entre a membrana do cloroplasto e a do R.E. do cloroplasto ser ácido, o que se traduz numa alta concentração de CO_2 relativamente à concentração de HCO_3^-, devido ao efeito do pH no equilíbrio das duas substâncias, conforme a equação **(i)**. Deste modo, a membrana do cloroplasto torna-se altamente permeável a CO_2 assegurando níveis altos do mesmo no cloroplasto, característica importante especialmente em ambientes marinhos onde, devido ao pH mais elevado, as concentrações de CO_2 dissolvido são menores, marcando assim a sua vantagem competitiva perante outras espécies.

(i) $$H_2O + CO_2 \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \Leftrightarrow 2H^+ + CO_3^{2-}$$

O grupo **(4)** apresenta espécies com duas membranas do retículo endoplasmático (R.E.) do cloroplasto têm a membrana interna do R.E. do cloroplasto a envolver o cloroplasto. A membrana externa do R.E. do cloroplasto é contínua com a membrana exterior do envelope nuclear e tem ribossomas na

superfície exterior. Este grupo está dividido em quatro divisões, Chlorarachniophyta, Cryptophyta, Heterokontophyta, Prymnesiophyta. As restantes espécies que vão ser abordadas neste trabalho pertencem a este grupo*, Tisochrysis lutea* pertencente à divisão Prymnesiophyta, *Phaeodactylum tricornutum* e *Chaetoceros calcitrans* à divisão Heterokontophyta, mais especificamente à classe Bacillariophyceae.

As espécies que constituem a classe Bacillariophyceae, também denominadas por diatomáceas, são encontradas em quase todos os habitats aquáticos. As suas principais características são, a coloração dourada acastanhada proveniente da fucoxantina, e a presença de uma parede celular de sílica que envolve a célula, denominada de frústula. Os cloroplastos destas microalgas contêm clorofila *a*, c_1 e c_2.

A divisão Prymnesiophyta é composto por flagelados que possuem um haptonema entre dois flagelos lisos, ao contrário das Heterokontophyta não apresentam mastigonemas nos flagelos. Enquanto as diatomáceas dominam nos habitats de águas costeiras, ricas em nutrientes, as Prymnesiophyta prosperam em alto mar, onde os nutrientes são limitantes. Os cloroplastos apresentam clorofilas *a* e c_1/c_2, β-caroteno, diadinoxantina e diatoxantina, e o produto de armazenamento principal é o manitol. Apesar desta divisão se caracterizar por dois flagelos suaves, vários géneros, como *Isochrysis*, que têm haptonema rudimentar ou não existente, são agrupados nesta divisão.

As microalgas são cruciais para o funcionamento das redes tróficas e dos ecossistemas aquáticos (Nava & Leoni 2021), atuando como produtores primários. As microalgas são dos maiores produtores de oxigénio global. Apesar das microalgas não serem habitualmente consumidas diretamente pelo ser humano, muitos dos seres vivos que consumimos, mais elevados na cadeia alimentar, utilizam as microalgas como principal fonte de alimento, como por exemplo, peixes, crustáceos e moluscos (Lee 2018).

1.2.1. Evolução da pesquisa em microalgas

Dado o crucial papel das microalgas nos ecossistemas, assim como do vasto leque de suas aplicações, estas têm suscitado um enorme aumento no número de publicações, o qual traduz num aumento do interesse nesta área de estudo.

Garrido-Cárdenas e colaboradores (2018), fazendo a análise do número de publicações na área de microalgas de 1968 a 2017, observaram um pico no número de publicações de 2005 em diante. Como mencionado por estes autores, este aumento no número de publicações é consistente com a maior demanda por produtos à base de microalgas no mercado, assim como o aumento nas instalações para produção das mesmas (Forján *et al.*, 2014).

Dado que a análise realizada por Garrido-Cárdenas e colaboradores (2018) terminava em 2017, decidimos atualizá-la recorrendo à base de dados Scopus (www.scopus.com) e, seguindo a metodologia estabelecida por Garrido-Cárdenas e colaboradores (2018), foi-nos possível aceder ao número de documentos publicados de 1960 a 2023 (**Figura 1**).

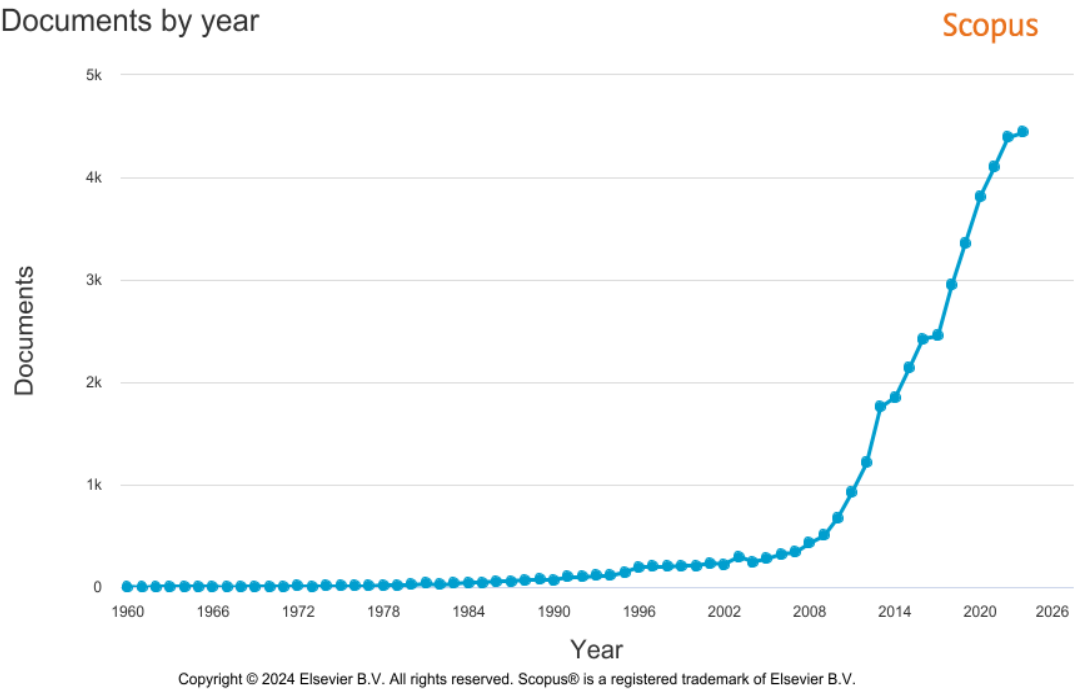

Figura 1 – Evolução do número de publicações na área das micralgas de 1960 até 2023, com recurso à base de dados Scopus e usando como palavra-chave "microalgae",

Tal como atrás referido, estes dados foram obtidos com recurso à base de dados Elsevier Scopus, tendo-se utilizado como termo de pesquisa **[TITLE-ABS-KEY (microalgae)]**. Com esta pesquisa foram recolhidos 41.483 documentos de várias tipologias, como artigos (76,9%), revisões (9,1%), capítulos de livros (6,3%), artigos de conferências (6,0%), entre outros (1,7%). A **Figura 1** demonstra a tendência para o aumento de publicações na área das microalgas continuou até ao presente momento. Vários fatores podem estar relacionados com o aumento no interesse em microalgas, mas as várias aplicações comerciais que elas permitem não é um fator menor, certamente.

1.2.2. Principais aplicações

As microalgas têm uma vasta gama de aplicações em diferentes indústrias devido às suas propriedades versáteis e ao seu elevado valor nutricional. Estas aplicações variam desde o uso em aquacultura e como ingredientes de rações, até à produção de compostos bioativos e à sua utilização

em tratamentos ambientais. A seguir, são descritas algumas das principais áreas onde as microalgas desempenham um papel relevante.

1.2.2.1. Aquacultura

Sendo um dos setores cruciais da produção de comida a nível global, a aquacultura enfrenta várias dificuldades, como surtos de doenças e poluição ambiental, as quais afetam a sua sustentabilidade (Vijayaram *et al.*, 2024). As microalgas no setor da aquacultura têm várias aplicações, como a produção de farinha de peixe a partir de microalgas secas e processadas para formar um alimento rico em nutrientes, uso como alimento vivo (do inglês *live feed*), preferencialmente utilizado para alimentar animais aquáticos juvenis ou na fase de larva e em biorremediação de águas residuais (Singh & Tiwari, 2023; Maznah & Zulaihat, 2024). Cerca de 40 espécies de microalgas são utilizadas neste setor devido aos seus diversos benefícios e aplicações. Alguns dos benefícios são: fortalecer o sistema imunológico, promover o crescimento, conferir maior resistência a doenças em animais aquáticos, assim como, conferir um valor nutricional melhorado pela presença de proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Hemaiswarya *et al.*, 2010; Singh & Tiwari, 2023; Vijayaram *et al.*, 2024). Devido ao facto da produtividade do viveiro estar diretamente relacionada com a quantidade e qualidade do alimento utilizado, vários viveiros de moluscos e peixes têm integrado sistemas de produção de microalgas lado a lado com a produção animal, realçando assim a importância das microalgas como alimento vivo para várias espécies aquáticas, em diferentes fases de desenvolvimento (Catarina & Xavier, 2012).

1.2.2.2. Ingrediente em rações

As culturas de plantas oleaginosas representam cerca de 23% da área de terra agrícola mundial, porém, apenas 6% desta é utilizada para alimentar a população diretamente (Fawcett *et al.*, 2022). De acordo com El-Hamidi e Zaher (2018), de 1983 até 2013 houve um aumento de 240% na produção de oleaginosas, e esta tendência de crescimento irá manter-se com o aumento na população global. É previsto a produção de gado duplicar de 2022 para 2050, o que significa também um aumento significativo na produção de oleaginosas que lhe servem de alimento (Hoque *et al.*, 2022). As microalgas apresentam uma maior quantidade de óleo produzido por área ocupada em comparação às oleaginosas, contudo, perdura a dificuldade em se reduzir o custo de produção das microalgas em relação às oleaginosas (Rodolfi *et al.*, 2008). Para além de serem fonte de lípidos as microalgas também podem aumentar o valor nutricional da ração animal devido aos compostos bioativos com atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Fawcett *et al.*, 2022). São de salientar também as vantagens a nível das condições de cultivo, pois, mesmo sendo aquáticas, as microalgas não requerem tanto consumo de água, não causam eutrofização e acidificação do solo derivado do excesso de

fertilizantes e conferem a possibilidade de produção em mais regiões do globo do que as oleaginosas (Cheregi *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019; Tu *et al.*, 2019; Dalin, 2021; Wu *et al.*, 2022;).

1.2.2.3. Suplementos para consumo humano

As microalgas têm-se destacado como um complemento promissor na dieta humana, devido à sua composição nutricional abrangente e aos potenciais benefícios para a saúde. Representam uma fonte sustentável de nutrientes essenciais, incluindo ácidos gordos ómega-3, proteínas, vitaminas e minerais, todos indispensáveis ao bem-estar humano (Perdana *et al.*, 2021; Williamson *et al.*, 2023). Além disso, as microalgas são ricas em compostos bioativos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, o que contribui para o seu potencial terapêutico na gestão da síndrome metabólica e de várias doenças (Goshtasbi *et al.*, 2023; Selvan *et al.*, 2023). Como evidenciado por Bito e colaboradores (2020), a suplementação com *Chlorella* demonstrou melhorias em fatores de risco cardiovascular, como os níveis de colesterol e a pressão arterial, devido à sinergia entre os seus nutrientes. Contudo, apesar das diversas vantagens aqui referidas, ainda existem desafios significativos relacionados com a produção e processamento de microalgas em larga escala, particularmente no que diz respeito aos métodos de colheita, que são energeticamente intensivos e podem envolver o uso de químicos nocivos (Laamanen *et al.*, 2021). Deste modo, assegurar a segurança e qualidade dos produtos derivados de microalgas é imprescindível, já que estes podem ser contaminados com substâncias indesejadas durante o cultivo e processamento (De Oliveira & Bragotto, 2022).

1.2.2.4. Nutracêuticos

Devido aos vários compostos produzidos pelo metabolismo primário e secundário das microalgas, estas surgem como uma interessante fonte de compostos com atividade biológica para a indústria farmacêutica. Estes compostos são formados a partir de vias metabólicas distintas, normalmente associadas a processos de defesa contra vários stresses. Existe uma panóplia de compostos ativos produzidos pelas microalgas, com naturezas e estruturas químicas diversas como, por exemplo, ácidos gordos, compostos fenólicos, ficocianinas, polissacarídeos e carotenoides (Singh *et al*, 2013). Estes compostos podem apresentar uma variedade de atividades farmacológicas, tais como, anticancerígena, antiviral e antioxidante, assim como efeitos hepatoprotetores, cardioprotetores e imunomoduladores (El-Baz *et al.*, 2018; Hussein *et al.*, 2019). A presença destes compostos e das suas respetivas bioatividades permite a aplicação de extratos de microalgas para finalidades farmacêuticas.

1.2.2.5. Cosméticos

Existe uma procura constante por alternativas biológicas a alguns compostos de síntese usados na indústria dos cosméticos. Também neste setor as microalgas podem surgir como possíveis alternativas para obtenção de pigmentos, por exemplo, devido à concentração e variedade presentes na sua composição, como, carotenoides, clorofilas e ficobiliproteínas. Mais, diversas espécies de microalgas são capazes de acumular lípidos em quantidades apreciáveis, sendo estes um dos principais ingredientes dos produtos cosméticos (De Luca *et al.*, 2021). Assim, as microalgas podem ser fonte de compostos com diversas propriedades e funções, apresentando ainda um elevado potencial de marketing devido ao rótulo biológico do produto (Ariede *et al.*, 2017; Morocho-Jácome *et al.*, 2020).

1.2.2.6. Biofertilizantes

As microalgas têm-se destacado como uma alternativa promissora aos fertilizantes convencionais, oferecendo inúmeros benefícios para uma agricultura sustentável. Estes microrganismos são ricos em nutrientes essenciais como, azoto, fósforo e potássio, que são cruciais para o crescimento das plantas e a fertilização das terras agrícolas (Gonçalves *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023). Estudos demonstraram que biofertilizantes à base de microalgas podem aumentar o rendimento e a qualidade das colheitas, como observado em pomares de espinheiro branco, onde o rendimento de frutos aumentou até 29,6% sem um aumento correspondente nas emissões de gases de efeito estufa (Ma *et al.*, 2024). Da mesma forma, as microalgas têm mostrado potencial na melhoria da saúde do solo, ao aumentar o teor de matéria orgânica e nutrientes, como evidenciado por Castro e colaboradores (2024), a aplicação de microalgas resultou num aumento de 9% de azoto e 12% da matéria orgânica presente no solo. As microalgas também são capazes de produzir substâncias bioativas, como as fito-hormonas, que influenciam diretamente os processos fisiológicos das plantas e promovem o seu crescimento (Gonçalves *et al.*, 2023). A integração de microalgas nas práticas agrícolas está em sintonia com os princípios da economia circular, oferecendo uma solução sustentável para reduzir a dependência de fertilizantes sintéticos e mitigar os impactos ambientais (Ng *et al.*, 2023, Osorio-Reyes *et al.*, 2023), para além que, a sua capacidade de sequestrar carbono através da fotossíntese contribui para a redução da pegada de carbono das atividades agrícolas (Gonçalves *et al.*, 2023; Diaz-Troya & Huertas, 2024).

1.2.2.7. Tratamento de efluentes

Tem aumentado a presença de contaminantes no meio ambiente, provenientes das indústrias e associados ao consumo humano, sendo exemplos, fármacos, metais pesados e microplásticos. Estes contaminantes têm consequências negativas em toda a cadeia trófica, chegando ao ser humano. O consumo de fármacos tem aumentado nos últimos anos (Sharma *et al.*, 2021) e, por conseguinte,

aumenta também a sua concentração nos ecossistemas aquáticos (Fayaz *et al.*, 2024). Estes compostos chegam ao ambiente através de várias fontes, tais como descargas sanitárias provenientes de hospitais e casas particulares, da atividade pecuária e dos escoamentos superficiais da aquacultura e agricultura (Gao *et al.*, 2020; Fayaz *et al.*, 2024).

Os **fármacos** mais detetados em ambientes aquáticos são: antibióticos, hormonas, analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides, agentes cardiovasculares, medicação para o sistema nervoso central, antipsicóticos e antidepressivos. As técnicas de biorremediação com recurso a microalgas são capazes de remover estes fármacos a partir de processos de bioadsorção, bioacumulação, biodegradação, fotodegradação e co-metabolismo (Zhou *et al.*, 2023). A presença de antibióticos nos ecossistemas promove o aparecimento de resistências a antibióticos por parte das bactérias ambientais, problemática que se alastra devido ao uso excessivo e incorreto de antibióticos (Arora *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2024).

Os **microplásticos** têm suscitado preocupações devido ao seu grande potencial de perturbação dos ecossistemas marinhos e terrestres, e também devido ao seu efeito tóxico com impacto na saúde humana (Su *et al.*, 2023), tendo sido detetados microplásticos na carne ou no músculo de peixes, de espécies ingeridas por seres humanos (Das *et al.*, 2023). Existem vários tipos de plásticos que contribuem para a poluição marinha, como o polietileno (PE), poliestireno (PS), politereftalato de etileno (PET), policloreto de vinila (PVC), poliuretano (PU), polipropileno (PP), náilon e acetato de celulose (Revel *et al.*, 2018; Prata *et al.*, 2019). A utilização de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) excretadas pelas microalgas para remover microplásticos mostrou repetibilidade e o scale-up do processo é relativamente direto. Devido às características dos EPS, estes conseguem afetar a biodisponibilidade dos microplásticos, por meio da formação de heteroagregados (EPS, microalgas e microplásticos) (Shah *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2019; Cheng and Wang, 2022).

Os **metais pesados**, como Cd, Pb, entre outros, são outros contaminantes comummente encontrados em meios aquáticos sendo prejudiciais, e até tóxicos, para todos os organismos. (Baghayeri *et al.*, 2020; Al-Khiat *et al.*, 2023). As fontes mais comuns são: águas residuais provenientes de refinarias, instalações de galvanoplastia, curtumes, operações mineiras, entre outras (Izquierdo *et al.*, 2010; Calero *et al.*, 2018; Kumar and Chawla 2014 citado em Dulla *et al.*, 2020). Os metais pesados podem ser absorvidos pelo corpo humano de diversas formas e causar danos a vários sistemas (Godt *et al.*, 2006). As microalgas podem atuar como biossorventes devido à sua abundante disponibilidade, alta afinidade de ligação com metais e boas características de superfície, que se devem, principalmente, aos grupos funcionais à superfície, como carboxílicos, amina e hidroxila, que se ligam a iões metálicos (Dulla *et al.*, 2020).

1.2.2.8. Biocombustíveis

A necessidade de procurar novas fontes de energia como alternativa aos combustíveis fósseis tem sido uma preocupação constante há várias décadas, mas continua a ser uma questão premente. Este tema de investigação permanece relevante, devido à diminuição das reservas fósseis e ao impacto ambiental causado pelo seu uso. Apesar disso, os combustíveis fósseis ainda persistem como a principal fonte de energia a nível global, com a produção de petróleo a não conseguir acompanhar a crescente demanda energética (Krishnamoorthi *et al.*, 2019, citado em Kandasamy *et al.*, 2022). Durante anos, as microalgas foram consideradas uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis, uma vez que convertem energia solar em compostos de carbono que podem ser transformados em biodiesel, bioetanol e biometanol (Yan *et al.*, 2019, citado em Kandasamy *et al.*, 2022). No entanto, nos últimos anos, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem sido progressivamente abandonada, devido a desafios técnicos, altos custos de produção e limitações na escalabilidade do processo, levando a uma diminuição no interesse comercial por esta aplicação específica das microalgas

1.2.3. Espécies em estudo

A escolha destas espécies (**Figura 2**) para a elaboração deste estudo deveu-se à sua relevância para uso como alimento em aquacultura, devido ao seu valor nutricional. O valor nutricional de uma espécie depende maioritariamente da sua composição química e estrutura celular, as quais podem ser influenciadas pelas condições de cultura. As microalgas para uso em aquacultura devem possuir os componentes nutricionais essenciais, não ser tóxicas, apresentar tamanho adequado a ser digeridas e uma parede celular digestível, de forma a disponibilizar os nutrientes (Becker, 2004).

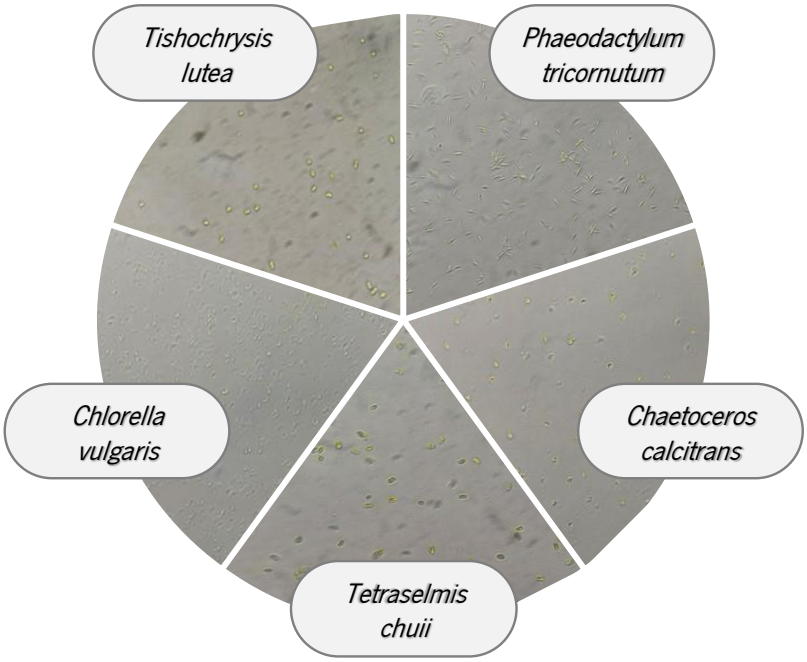

Figura 2 – Montagem de fotografias das várias espécies utilizadas no trabalho. Fotografias de Diogo Carvalho.

1.2.3.1. *Phaeodactylum tricornutum*

Esta é uma diatomácea marinha, com um volume celular de cerca de 40 μm^3, pertencente à classe *Bacillariophyceae*, que ao contrário de outras, apresenta três morfologias principais, cada uma com suas características estruturais e metabólicas distintas: fusiforme, oval e trirradiado. O pleomorfismo demonstrado por esta espécie deve-se ao seu metabolismo único que a permite adaptar-se às condições ambientais, como temperatura e salinidade (Helm *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2020; Galas *et al.*, 2021). *Phaeodactylum tricornutum* é uma espécie de interesse para várias aplicações devido ao seu metabolismo lipídico com a produção de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (You *et al.*, 2022), sendo relevante para a produção de nutracêuticos, fármacos e biocombustível (Lupette *et al.*, 2019; Ozcan & Ovez, 2022; Fierli *et al.*, 2023).

1.2.3.2. *Tisochrysis lutea*

Uma pequena microalga marinha da classe *Haptophyceae* com cerca de 40-50 μm^3 de volume celular médio (Helm *et al.*, 2004; Orlova *et al.*, 2023). Esta espécie é conhecida por habitar vários oceanos - Atlântico, Pacífico e Índico – estando ausente nas regiões ártica e antártica (Carrier *et al.*, 2023). A importância de *Tisochrysis lutea* deve-se ao elevado conteúdo lipídico, tornando-a uma fonte de alimento altamente desejável para larvas de peixes, crustáceos e moluscos, além de servir como uma

excelente fonte de fucoxantina, carotenóides com aplicações em suplementos, cosméticos e produtos farmacêuticos (De Oliveira-Júnior *et al.*, 2020).

1.2.3.3. *Chaetoceros calcitrans*

Esta é uma diatomácea de pequenas dimensões com cerca de 35 μm^3 de volume celular médio, pertencente à classe *Bacillariophyceae*, que apresenta uma morfologia particular - as suas células são cilíndricas e possuem cerdas, estruturas finas e longas, à base de sílica, que surgem dos cantos da célula (Helm *et al.*, 2004). Para além disso, as células desta espécie podem ser observadas juntas, formando cadeias. Esta espécie pode ser encontrada em habitats de água salobra e marinhos (Grzebyk *et al.*, 2022). Em termos de aplicações *Chaetoceros calcitrans* demonstra ser também bastante versátil devido às propriedades dos compostos que apresenta e o seu conteúdo elevado em proteína faz com que seja bastante utilizada para aquacultura de várias espécies, como, por exemplo, camarão (Turnip *et al.*, 2020). Apresenta também uma elevada resistência a cádmio o que pode possibilitar aplicações em biorremediação (Makkasau & Sahabuddin, 2023). Além disso, sobre condições otimizadas, foram alcançados níveis de lípidos que poderão ser explorados para produção de biocombustível (Sas *et al.*, 2023). Por fim, apresenta vários compostos de interesse, com diversas aplicações, para a indústria cosmética e farmacêutica (Sedjati *et al.*, 2019; Bai & Saravana, 2022; Bastos *et al.*, 2022; Jose *et al.*, 2022)

1.2.3.4. *Tetraselmis chuii*

Uma microalga marinha flagelada de grandes dimensões, com um volume médio de 300 μm^3 de volume celular médio, normalmente encontrada em águas costeiras, da classe *Chlorophyceae* (Becker, 2004; Helm *et al.*, 2004). Apresenta quatro flagelos que emergem perto do ápice da célula, organizados em dois pares opostos, uma característica prevalente em outras espécies do género *Tetraselmis* (Hyung *et al.*, 2021). Como outras espécies, *Tetraselmis chuii* apresenta um perfil bioquímico bastante rico surgindo com isso várias aplicações de interesse, como, por exemplo, na indústria alimentar, graças à sua composição em proteínas, aminoácidos, vitaminas, entre outros compostos de interesse (Pereira *et al.*, 2019). Tem também potencial em biorremediação (Lauritano *et al.*, 2019; Buhani *et al.*, 2023). Esta espécie é bastante utilizada em aquacultura devido ao seu valor nutricional, como, por exemplo, na alimentação de larvas de moluscos, rotíferos e larvas de camarão (Day & Fenwick, 1993)

1.2.3.5. *Chlorella vulgaris*

Esta é uma microalga verde, unicelular, pertencente à classe *Chlorophyceae*, que apresenta uma morfologia esférica e se apresenta tipicamente isolada, no entanto, outras espécies do mesmo género podem formar colónias e possuir um invólucro mucilaginoso (Luo *et al.*, 2010). Esta espécie pode ser encontrada em habitats aquáticos assim como terrestres, estando adaptada a condições diferentes que permitam a sua sobrevivência (Aigner *et al.*, 2020). *Chorella vulgaris* apresenta várias aplicações de interesse, devido à sua composição, como, por exemplo, suplemento para alimentação de animais, aplicações medicinais, biorremediação, suplemento agrícola, produção de biocombustíveis. Este vasto leque de aplicações demonstra a importância desta espécie como alvo de investigação (Ayatollahi *et al.*, 2021; Moradi *et al.*, 2021; He *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2024).

1.3. Biorreatores e produção de microalgas

Um biorreator, segundo a definição de John Daintith (2008) em *A Dictionary of Chemistry (6 ed.)*, é "a large stainless steel tank used to grow producer microorganisms in the industrial production of enzymes and other chemicals. After the tank is steam-sterilized, an inoculum of the producer cells is introduced into a medium that is maintained by probes at optimum conditions of temperature, pressure, pH, and oxygen levels for enzyme production. An agitator (stirrer) mixes the medium, which is constantly aerated. It is essential that the culture medium is sterile and contains the appropriate nutritional requirements for the microorganism. When the nutrients have been utilized the product is separated; if the product is an extracellular compound the medium can be removed during the growth phase of the microorganisms, but an intracellular product must be harvested when the batch culture growth stops. Some bioreactors are designed for continuous culture.".



Figura 3 – Exemplos de biorreatores utilizados no cultivo de microalgas, nomeadamente, da esquerda para a direita, fotobiorreator de coluna de bolhas e tubular. Fotos cedidas pela **AQUALGAE.**

No entanto, os biorreatores podem estar sujeitos a várias modificações de acordo com o objetivo e microrganismo utilizado pois, os biorreatores são utilizados em diversas indústrias, com variados propósitos, como, por exemplo, na indústria farmacêutica, alimentar, química, no tratamento de águas residuais ou como utilizados no nosso ensaio, para o cultivo de microalgas (**Figura 3**).

Devido às várias funções que um biorreator pode desempenhar é crucial que na fase de idealização do sistema, este seja desenhado e concebido tendo em conta o material biológico que vai ser utilizado e as suas respetivas necessidades, de modo a fornecer as condições e requisitos adequados que permitam alcançar os objetivos de produção, sendo alguns exemplos, o modo de agitação, a introdução de gases, o controlo de temperatura, a composição do meio de cultura. A escolha, o dimensionamento e o design específicos de um biorreator estão dependentes de uma série de decisões que vão desde a microbiologia e bioquímica básicas até à engenharia de processos e marketing. O objetivo final será proporcionar um ambiente ideal para o sistema biológico em particular, que possibilite a operação a um custo mínimo, maximizando a produtividade e os benefícios do processo (Asenjo & Merchuk, 1994).

Nos requisitos básicos e condições favoráveis para um material biológico específico, podemos incluir a suscetibilidade aos danos e decisão de danos mínimos, o volume máximo a usar no biorreator, a máxima transferência de massa gás-líquido e/ou máxima transferência de massa do líquido. Embora a transferência de massa gás-líquido seja frequentemente o processo limitante do processo, as espécies

biológicas podem enfrentar limitações adicionais. Por exemplo, certas espécies biológicas podem-se apresentar como muito sensíveis ao cisalhamento, enquanto outras podem não crescer bem em condições de fluxo laminar, mas prosperar em condições muito turbulentas (Bliem & Katinger, 1988a; Hoffmann *et al.*, 2008, citado em Kadic & Heindel, 2014). Por outras palavras, o biorreator deve acomodar condições ambientais muito específicas, intimamente associadas ao sistema biológico que pretende crescer/propagar, e o operador deve estar atento a isso e escolher o design e as condições operacionais ideais do biorreator (Kadic & Heindel, 2014).

Com isto fica claro que um design único de biorreator nunca será capaz de corresponder às necessidades de todos os tipos de material biológico e objetivos de produção, como tal, é necessário estudar e implementar designs especificamente adaptados de forma a recriar e manter o conjunto específico de condições ideais ao crescimento do material biológico em questão. Existem vários designs de biorreatores utilizados nas várias indústrias, sendo alguns exemplos: os biorreatores de tanque agitado, de membrana, de leito fluidizado, leito fixo, de coluna de bolhas, airlift e **fotobiorreatores**.

1.3.1. Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores inserem-se numa vertente especializada de biorreatores especificamente desenhados para material biológico fotossintético, como é o caso das microalgas, havendo várias tipologias consoante a aplicação e as condições pretendidas. Das diversas tipologias de fotobiorreatores podemos fazer uma distinção entre dois grandes grupos: os fotobiorreatores "a céu aberto", ou seja, sistemas abertos, no exterior com a cultura exposta aos elementos e sujeita a fatores ambientais; e os de "sistema fechado", em que a cultura está isolada do exterior e sujeita a condições controladas em vários parâmetros (**Tabela 1**). A escolha de tipologia do fotobiorreator deve ter em conta vários fatores de forma a selecionar a mais adequada para a cultura em questão.

Tabela 1 – Tipologias de fotobiorreator considerando a performance em determinados parâmetros operacionais*.

Parâmetros	A céu aberto	Sistema fechado
Custo	Baixo custo inicial e operacional	Alto custo inicial e operacional
Controlo das condições físicas	Baixo, exposto aos elementos	Alto, total controlo
Eficiência de Luz	Menor eficiência	Maior eficiência
Risco de Contaminação	Alto	Baixo
Aplicações	Produção em larga escala de biomassa (alimentação humana, suplementos, tratamento efluentes)	Produção de produtos de alto valor (aquacultura, fármacos, suplementos)
Complexidade	Operação e manutenção mais simples	Operação e manutenção mais complexa
Designs	Raceways, Placa plana, Tubulares	Coluna de bolhas, Airlift, Tanque agitado, Tubulares

* (Genin *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2019; Barboza-Rodríguez *et al.*, 2024).

Os fotobiorreatores, de escala laboratorial, utilizados no nosso trabalho podem ser descritos como sendo **fotobiorreatores de coluna de bolhas.**

1.3.1.1. Principais fatores determinantes no funcionamento de um fotobiorreator

Os fotobiorreatores são sistemas complexos sendo que a produtividade está diretamente dependente de uma série de fatores, tais como: luz, temperatura, concentração e composição dos nutrientes, pH, concentração de oxigénio e de CO_2, agitação e salinidade, entre outros. Detalham-se de seguida alguns dos mais importantes para o nosso trabalho e que foi possível controlar.

- **Luz –** A luz é talvez o fator de maior relevância visto se usarem estes biorreatores para crescer material biológico fotossintético. Em termos de intensidade não deve ser demasiado baixa para não limitar a fotossíntese nem demasiado elevada para não causar fotoinibição. O espectro de luz a usar também deve ser tido em consideração, tendo cada espécie os seus comprimentos de onda mais adequados. Por último, o fotoperíodo, ou seja, a duração do período de luz no ciclo de 24 horas, também deve ser adaptado a cada espécie.

- **pH –** O arejamento nas culturas promove a agitação necessária para garantir a exposição uniforme à luz, a mistura eficiente dos nutrientes e a remoção do oxigénio produzido, criando um ambiente ideal para o crescimento das microalgas. As injeções de CO_2 permitem regular o pH do meio, contrariando a tendência para a alcalinização do meio, a partir do aumento de $[H^+]$ que diminui o pH (Cole & Prairie, 2014), e também o fornecimento do substrato para a fotossíntese.
- **Temperatura –** Todos os organismos apresentam um intervalo de temperaturas no qual o seu metabolismo é ótimo, por isso, no biorreator a temperatura deve ser ajustada de acordo com os requerimentos térmicos da espécie em questão.

1.3.2. Classificação

Os biorreatores podem ser classificados com base em diferentes critérios, para além do tipo de design. De entre eles podemos enumerar: i) o tipo de material biológico - bactérias, leveduras, células animais, células vegetais, entre outras; ii) o estado físico das célula - cultura em suspensão ou imobilizada; iii) o objetivo de produção - a multiplicação celular com intuito de aumentar a biomassa ou a produção de um composto secundário do metabolismo das células; iv) a escala do projeto - laboratorial, piloto ou industrial (para uma produção em grande escala); v) os modos de operação - a classificação que iremos detalhar mais à frente e que tem por base o modo de funcionamento do biorreator. Estas classificações ajudam a determinar o tipo de biorreator mais adequado para uma aplicação específica, com base nas características do sistema biológico e nas necessidades de produção.

1.3.2.1. Fases de crescimento das culturas celulares

O acompanhamento das curvas de crescimento em biorreatores é fundamental para a otimização dos processos biotecnológicos. Ao compreender as diferentes fases de crescimento do material biológico, é possível ajustar as condições operacionais de forma a maximizar a produção de biomassa ou de metabólitos de interesse. Para tal, detalhamos as várias fases de crescimento e como são observadas, numa cultura em batch (**Figura 4A**) e contínua (**Figura 4B**).

Fase de latência ou fase lag (do inglês *lag phase*) **-** Esta é a fase inicial do crescimento celular esta ocorre imediatamente após a inoculação. É um período em que as células de organismos multicelulares ou os microrganismos em suspensão se adaptam ao novo ambiente - a maquinaria celular e molecular se adapta às condições ambientais e nutricionais do meio, por exemplo, sintetizando novas enzimas e/ou reprimindo a síntese de outras (Shuler & Kargi, 2002). Durante esta fase, a taxa específica de crescimento é muito baixa, não havendo um aumento significativo na densidade celular. Isto deve-se

não apenas ao processo de ambientação ao novo meio, mas também ao baixo volume de inóculo ou da condição do mesmo (Shuler & Kargi, 2002; Lee *et al.*, 2013).

Fase exponencial - A fase exponencial surge após a adaptação ao novo meio, na qual as células se começam a multiplicar rapidamente. Durante esta fase as células dividem-se como uma função exponencial do tempo, desde que os nutrientes e a energia luminosa sejam saturantes (Lee *et al.*, 2013).

Fase linear - A quantidade de energia luminosa absorvida por uma cultura fotossintética é em grande parte determinada pela concentração celular e não apenas uma função direta da densidade de fluxo de fotões. De facto, se com uma baixa densidade de fluxo, a maioria dos fotões consegue passar através de uma cultura de baixa concentração celular podendo, ainda assim, haver saturação da atividade fotossintética, só com uma elevada densidade de fluxo os fotões poderão ser capturados por uma boa parte de uma cultura de alta concentração celular. Assim, a concentração celular de uma cultura fotossintética continuará a aumentar exponencialmente até todas as células da suspensão terem a possibilidade de receber fotões incidentes, ou seja, que continue a haver disponibilidade de fotões fotossinteticamente ativos para toda a suspensão celular. Uma vez atingida essa concentração celular, a acumulação de biomassa passa a ocorrer a uma taxa constante - fase de crescimento linear -, até que algum substrato no meio de cultura ou o surgimento de inibidores se torne um fator limitante de crescimento (Lee *et al.*, 2013). Alguns autores não distinguem fase exponencial e fase linear, sendo descritas como uma mesma fase de crescimento (McDuffie, 1991; Shuler & Kargi, 2002).

Fase de desaceleração - Este momento de desaceleração do crescimento celular ocorre após a fase exponencial/linear. Nesta fase, o crescimento desacelera devido à redução de um ou mais dos nutrientes essenciais para níveis limitantes, ou à acumulação de subprodutos tóxicos ao crescimento. Na fase de desaceleração, os stresses induzidos pelo esgotamento dos nutrientes ou acumulação de resíduos causam uma reestruturação metabólica da célula fazendo face ao ambiente hostil (Shuler & Kargi, 2002).

Fase estacionária - Inevitavelmente, um ou mais substratos do meio de cultura esgotam-se, o que dá início à fase estacionária da cultura. Durante esta fase, a fotossíntese ainda está a ser realizada e produtos de armazenamento de carbono, tais como amido e lípidos neutros, são acumulados, mas a taxa de divisão celular/crescimento atinge um ponto em que a taxa líquida de produção de células é zero, isto é, a taxa de produção igual à taxa de morte celular (McDuffie, 1991; Lee *et al.*, 2013). Embora a taxa de crescimento seja nula, as células mantêm-se metabolicamente ativas e produzem metabolitos secundários. Durante este período, a concentração total de massa celular pode permanecer constante,

mas o número de células viáveis começa a diminuir. As células podem também produzir metabolitos secundários caso algumas concentrações de nutrientes, como carbono e nitrogénio, estejam baixas.

Fase de morte - A fase de morte, ou fase de declínio, sucede à estacionária, havendo um aumento mais acelerado e inexorável de células inviáveis. A morte celular tem, contudo, início ainda na fase estacionária, pelo que nem sempre é possível diferenciar claramente o momento de transição entre as duas fases. Frequentemente, células mortas sofrem lise e nutrientes intracelulares libertados para meio podem ser usados pelas células vivas/viáveis durante a fase estacionária. No final da fase estacionária, devido ao esgotamento dos nutrientes e/ou à acumulação de produtos tóxicos no meio desencadeia a fase de morte (Shuler & Kargi, 2002).

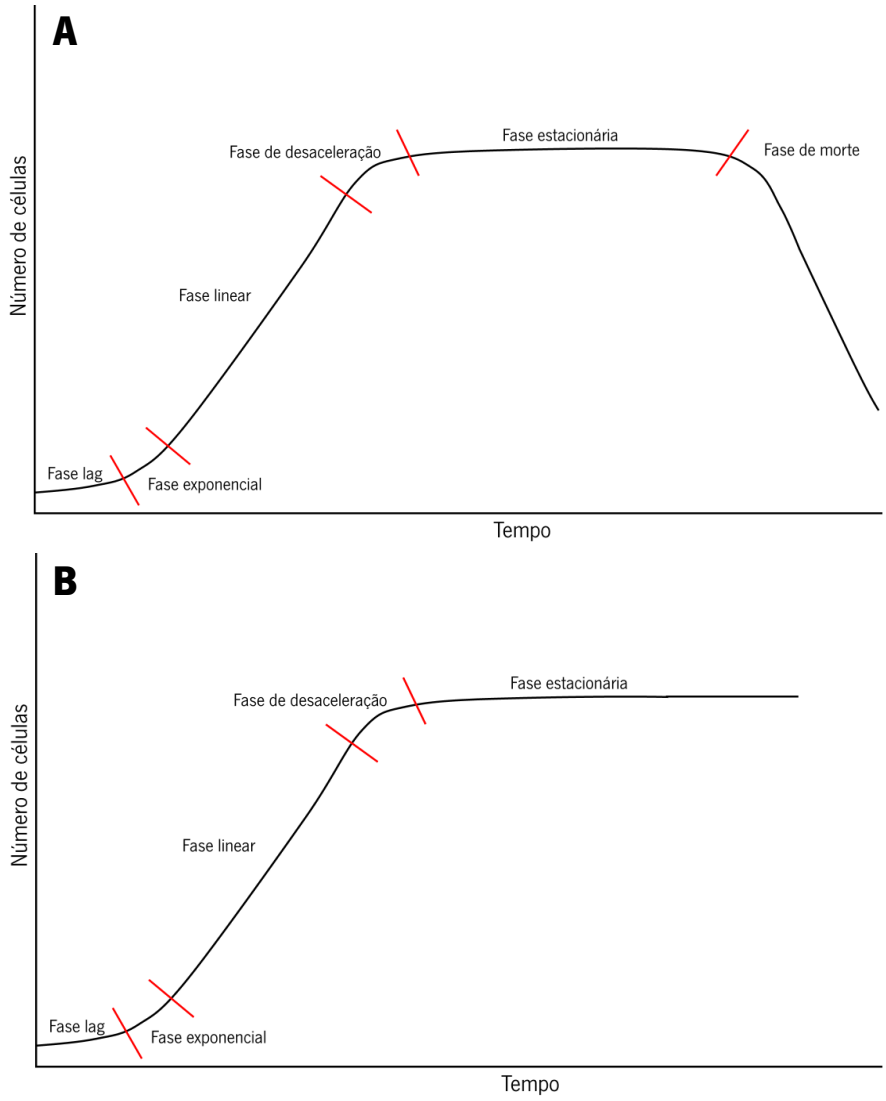

Figura 4 – A, Curva típica de crescimento de uma cultura de células em sistema fechado ou batch. **B**, Curva típica de crescimento de uma cultura de células em cultura contínua.

1.3.2.2. Modos de operação

O biorreator a operar **em batch** é um dos modos mais antigos e amplamente utilizados na indústria (Bellgardt, 2000b; Branyik *et al.*, 2005, citado em Kadic & Heindel, 2014) e também em contexto de investigação. Os seus usos mais conhecidos e tradicionais são na fabricação de bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho, e também na produção de pão (Kadic & Heindel, 2014). A cultura em batch é também comumente utilizada para o cultivo comercial de algas devido à facilidade de operação e sistema de cultura simples. Os biorreatores em batch combinam os componentes essenciais - um pequeno inóculo do material biológico e uma quantidade limitada de meio de cultura -, e operam num recipiente (biorreator) que forneça as condições favoráveis ao crescimento, sendo este mantido em condições operacionais constantes até que a concentração máxima possível do produto seja alcançada, momento no qual este é extraído. Idealmente, o produto é extraído assim que uma concentração satisfatória é alcançada, no entanto, o produto na cultura em batch também é extraído na eventualidade de um, ou vários, ingredientes necessários se tiverem esgotado. Num biorreator em batch sobre condições ideais, nada seria introduzido ou removido do sistema durante o processo de crescimento. No entanto, por norma, existe a necessidade de alimentação de gases e vários reagentes são adicionados para manter condições constantes de pH (McDuffie, 1991; Lee *et al.*, 2013; Kadic & Heindel, 2014). As culturas em biorreator, todas elas, apresentam diferentes fases de crescimento que refletem mudanças na biomassa e no substrato da cultura.

Durante uma cultura em batch o ambiente altera-se continuamente à medida que o crescimento celular, a formação de produtos e a utilização de substratos evoluem ao longo do tempo, sendo geralmente ciclos curtos e determinados. Em contraste, a **cultura contínua** mantém o crescimento celular e a formação de produtos a níveis controlados e durante longos períodos, graças ao fornecimento constante de meio de cultura fresco, a uma cultura bem agitada, enquanto simultaneamente ocorre a extração de produtos e matéria orgânica. O biorreator eventualmente atinge um estado de equilíbrio, fase estacionária, onde as concentrações de células, produtos e substratos permanecem constantes, proporcionando assim condições adequadas e constantes ao crescimento e formação de produtos de qualidade uniforme (Shuler & Kargi, 2002; Lee *et al.*, 2013). Como mencionado anteriormente, os biorreatores a operar em modo contínuo atingem uma fase estacionária que é mantida indeterminadamente, o que impede processos de limpeza ou esterilização sem recorrer ao recomeço da cultura (Kadic & Heindel, 2014). De modo a facilitar o equilíbrio durante a fase estacionária, a maioria dos biorreatores em modo contínuo opera a um volume constante, com taxas de fluxo volumétrico

uniformes de substrato e produto, assegurando-se, por via de agitação mecânica ou de injeção de gases, que a cultura se mantém homogeneamente misturada (Kadic & Heindel, 2014). Este modo de operação permite abordar a depleção de substratos bem como a acumulação de produtos que inibem o crescimento, por via da reposição do substrato limitante ao crescimento e diluindo os produtos inibidores através da adição de meio de cultura fresco (Lee *et al.*, 2013)

O modo de operação **semicontínuo** pode ser descrito como um híbrido entre os dois referidos anteriormente, permitindo aproximar o processo do que seria uma cultura em modo contínua, mas sem alguns dos seus desafios logísticos. Neste modo de operação uma quantidade fixa de volume de cultura é retirada e substituída por igual volume de meio de cultura fresco, repetindo-se este processo diariamente. Um estado de equilíbrio é alcançado no biorreator quando o crescimento do material biológico entra num ciclo diário.

1.4. Meios de cultura

A base fundamental para o crescimento do material biológico no fotobiorreator, assim como em qualquer outro biorreator ou fermentador, é o meio de cultura ou meio nutritivo. Neste meio estão presentes todos os elementos necessários ao crescimento e desenvolvimento saudável das células e/ou produção dos compostos/metabolitos de interesse. Os componentes principais são os nutrientes: a(s) fonte(s) de carbono, as fontes de elementos minerais, como o nitrogénio, fósforo, enxofre, entre outros elementos essenciais.

1.4.1. Constituintes de um meio de cultura

Um meio de cultura deve ser ajustado para corresponder, o melhor possível, às necessidades do material biológico em cultura. Os meios de cultura para microalgas, assim como para qualquer outro organismo, são constituídos por diversos compostos, os quais fornecem os elementos químicos imprescindíveis para o desenvolvimento dos organismos. Estes elementos, de acordo com a quantidade em que são requeridos pela cultura, podem ser categorizados por macronutrientes, micronutrientes e elementos traço.

Como macronutrientes temos:

- **Azoto (N) -** Componente fundamental dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, que são vitais para a estrutura e função celular (Slinksienė *et al.*, 2022).
- **Fósforo (P) -** Crucial em vários processos biológicos, incluindo a formação de DNA, RNA e ATP, essenciais, respetivamente, para replicação da informação genética e armazenamento de energia (Khanzada, 2020).

- **Potássio (K) -** Vital para a fotossíntese, síntese proteica, ativação enzimática e regulação do equilíbrio osmótico (Zhang *et al.*, 2019).
- **Magnésio (Mg) -** Desempenha vários papéis importantes, incluindo ser o átomo central da cabeça tetrapirrólica da clorofila e atuar como co-factor para muitas enzimas (Sarma *et al.*, 2014).
- **Cálcio (Ca) -** Importante para a estabilidade da parede celular e função enzimática.
- **Enxofre (S) -** Componente de aminoácidos e vitaminas.

Na **Tabela 2** encontram-se listados os principais micronutrientes e elementos traço usados nos meios de cultura, nomeadamente de microalgas.

Tabela 2 – Lista de micronutrientes e elementos traço.

Micronutrientes	Elementos traço
Ferro (Fe)	Boro (B)
Manganês (Mn)	Cloro (Cl)
Zinco (Zn)	Cobalto (Co)
Cobre (Cu)	Níquel (Ni)
Molibdénio (Mo)	Silício (Si)

Para além dos vários elementos referidos anteriormente, um meio de cultura terá outros componentes importantes na sua constituição, como tampões para estabilizar o nível de pH, agentes quelantes para prevenir a precipitação de metais, e por fim, vitaminas e alguma fonte de carbono. Esta é imperativa para as culturas, impactando o crescimento, as vias metabólicas e a síntese de diversos compostos. Sendo fundamental para o armazenamento de energia, síntese molecular e fotossíntese. Em culturas de tecido vegetal algumas fontes de carbono comumente utilizadas são por exemplo, a sacarose e a frutose (Yaseen *et al.*, 2013).

A escolha de fonte de carbono pode alterar conforme o objetivo desejado, material biológico e espécie específica, influenciando a acumulação de biomassa e produção de metabolitos secundários (Uliesther *et al.*, 2023). No caso específico de culturas de microalgas a fonte de carbono utilizada costuma ser CO_2, em semelhança ao trabalho desenvolvido, esta vai ser utilizada como substrato na fotossíntese pelas microalgas em cultura (Häder, 2022). No entanto, existem outras fontes de carbono,

como por exemplo, glucose, e outros açucares, e bicarbonato e carbonato, fontes orgânicas e inorgânicas de carbono, respetivamente (Gao *et al.*, 2022; Ogbonna *et al.*, 2024). A composição exata do meio de cultura deve ser ajustada à espécie de microalga utilizada e do objetivo do cultivo.

A escolha do meio de cultura adequado é **crucial para otimizar** a produtividade do biorreator, como tal devemos ter vários fatores em atenção, os principais sendo:

- **O tipo de meio:** sintético, natural, ou uma combinação de ambos.
- **A espécie utilizada:** diferentes espécies possuem diferentes necessidades.
- **O objetivo da produção:** produção de biomassa, lipídios, pigmentos ou outros compostos de interesse.

1.4.2. Meios de cultura mais utilizados na cultura de microalgas

Com o desenvolver dos estudos na área foram criadas várias formulações de meios de cultura, tendo já sido profusamente estudadas e testadas para diversos objetivos. Apesar destes meios serem apresentados com concentrações determinadas é prática comum fazerem-se adaptações conforme as necessidades do operador. Alguns dos meios de cultura bastante utilizados e relatados na literatura são, o meio **f/2** (Guillard & Ryther, 1962), **Walne** (Walne, 1970), **ALGAL** (Fábregas *et al.* 1984) e **Conway** (Tompkins, 1995) para microalgas marinhas, e os meios **BG-11** (Stanier *et al.*, 1979), **Erd-Schreiber's** (Schreiber, 1927; Hämmerling, 1931; Føyn, 1934) e **Bold's Basal** (Bold, 1949; Bischoff & Bold, 1963) para microalgas de água doce.

O **f/2** é um meio sintético, para espécies marinhas, composto principalmente por sais inorgânicos e vitaminas, sendo bastante utilizado em investigação e indústria devido à sua capacidade de suportar diversas espécies (Stiawan, 2022; Naik *et al.*, 2024). Em semelhança ao meio f/2 também o de **Walne** é direcionado a espécies marinhas, sendo sintético e com presença de sais inorgânicos e vitaminas, mas em diferentes proporções (Stiawan, 2022). Devido a estas diferenças nas suas composições escolha do meio dependente da espécie e objetivo, pois os resultados obtidos com cada meio serão diferentes (El-Kassas, 2013). O meio **Gold Medium (GM)** baseia-se no meio **ALGAL**, reconhecido como um dos meios que proporciona os melhores resultados no crescimento de microalgas. Para espécies de água doce, como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Botryococcus*, e *Chlorococcum*, é possível utilizar o meio **BG-11**, que possibilita uma concentração de biomassa e lípidos (Pandey *et al.*, 2023). Ademais, este meio demonstrou capacidade de ser utilizado em conjunto com águas residuais, contribuindo para a sustentabilidade ambiental (Peter *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2024). Por último, o meio **Bold Basal**, que também permite o cultivo de espécies de água doce, apresenta-se como um meio

versátil, tendo apresentado bons resultados em espécies como por exemplo, *Monoraphidium sp*. e *Scenedesmus obliquus* (Yadav *et al*., 2023).

1.5. Objetivos

Como referido anteriormente o objetivo deste trabalho é a procura de biofertilizantes naturais com certificação biológica que possam servir como meios de cultura no cultivo de microalgas. A escolha das espécies de microalgas selecionadas para este estudo teve como base o seu uso no setor da aquacultura devido ao seu valor nutricional. De tal modo, a formulação de um meio de cultura biológico irá permitir a obtenção de um certificado de produção 100% biológico nos produtos resultantes da aquacultura, como bivalves e marisco, sendo esta certificação de elevado interesse e valor para estes produtos.

Sendo o meio GM altamente optimizado para o crescimento de microalgas marinhas, procuram-se encontrar combinações de biofertilizantes cuja composição seja o mais similar possível ao **Gold Medium.** Procura-se também uma sólida base a partir da qual desenvolver futuros trabalhos e optimizações de forma a desenvolver uma alternativa equiparável ao GM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e arranque das culturas de microalgas

As espécies de microalgas utilizadas neste trabalho encontram-se indicadas na **Tabela 3**. Estas microalgas são mantidas na empresa na forma de culturas-mãe, em meio de cultura GM, em Erlenmeyers de 250 mL (**Figura 5**), sob condições controladas de temperatura (18± 3 °C), fotoperíodo (12 h:12 h).

Tabela 3 – Espécies utilizadas nos vários ensaios e habitat.

Habitat	Nome da espécie
Marinho	*Tisochrysis lutea*
Marinho	*Phaeodactylum tricornutum*
Marinho	*Chaetoceros calcitrans*
Marinho	*Tetraselmis chuii*
Água doce	*Chlorella vulgaris*

Para a utilização destas culturas-mãe em ensaios foram retirados inóculos de 100 mL para um biorreator de 1 L, à chama de bico de Bunsen, iniciando-se assim uma nova cultura. A inoculação faz-se quando a cultura termina a fase de crescimento exponencial e entra em fase estacionária, altura em que atinge um máximo de densidade celular, promovendo-se, assim, uma fase de latência mais curta na nova cultura que se vai iniciar. Em cada ensaio específico, uma cultura-mãe é fonte de inóculos (100 mL) para os vários biorreatores utilizados nesse ensaio.

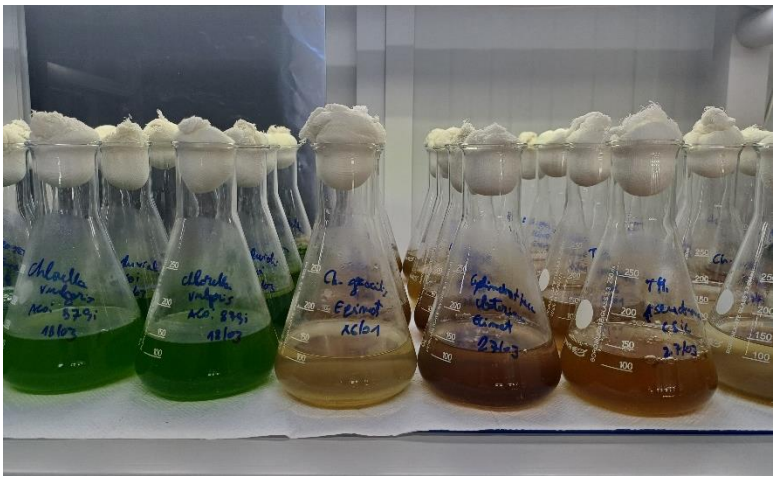

Figura 5 – Exemplos ilustrativos de culturas-mãe das espécies *Chlorella vulgaris*, *Chaetoceros gracilis*, *Cylindrotheca closterium* e *Thalassiosira pseudonana*, mantidas sob condições controladas (18± 3 °C, fotoperíodo 12 h:12 h).

2.2. Preparação e instalação dos biorreatores

Os biorreatores são garrafas de 1 litro com tampa adaptada com três orifícios (A, B e C) para permitir a passagem de tubagem de silicone para circulação de ar e CO_2 (**Figura 6**).

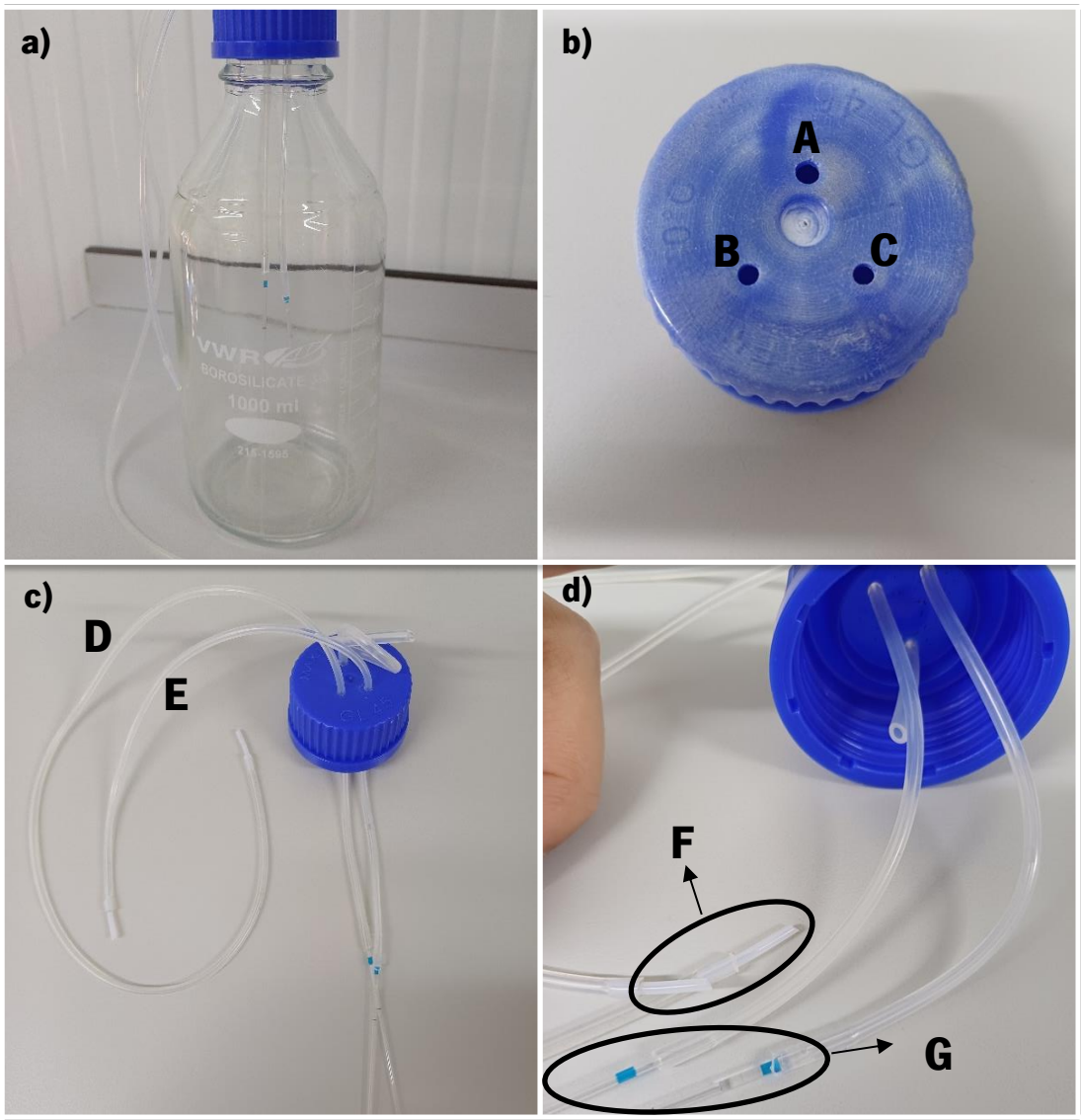

Figura 6 – Montagem ilustrando os vários constituintes das garrafas utilizadas como biorreator. **a)** Garrafa de cultura; **b)** tampa adaptada. A, orifício de 3,5 mm. B e C, orifício de 3,0 mm. **c)** Tubagem completa da tampa adaptada; **d)** Visualização das diferentes extremidades dos tubos de silicone. F, extremidade de teflon. G, capilar de 100 µL.

Os orifícios B e C têm diâmetro de 3,0 mm e o A de 3,5 mm (**Figura 6b)**). Estes orifícios têm o intuito de possibilitar a entrada de ar (**Figura 6b) B**) que têm como função o arejamento e homogeneização da cultura, a entrada de CO_2 (**Figura 6b) C**) que têm como função o controlo do nível de pH, e a saída do ar/pressão (**Figura 6b) A**), a partir da passagem de tubos de silicone. Os tubos de silicone D e E (**Figura 6c)**) apresentam extremidades que são distintas: a extremidade do segmento exterior ao frasco com uma secção de teflon, que permite a ligação à alimentação do ar e CO_2 (ver setas

na **Figura 6d) F**), e o segmento que fica para o interior do biorreator, que termina com um capilar de vidro de 100 µL (ver setas na **Figura 6d) G**).

Após a preparação dos biorreatores com a montagem da tubagem, estes foram envolvidos em papel de alumínio e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, os biorreatores foram colocados na estante na sala de culturas (**Figura 7**), feita a ligação ao tubo de alimentação do ar (A) e, quando necessário, foi feita a ligação ao tubo de alimentação do CO_2 (B). Entre a tubagem de circulação do ar e o tubo de admissão no biorreator (A) é colocado um filtro (C) para manter a assépcia (filtros Midisart2000 da SARTORIUS, poro 0,20 micra).

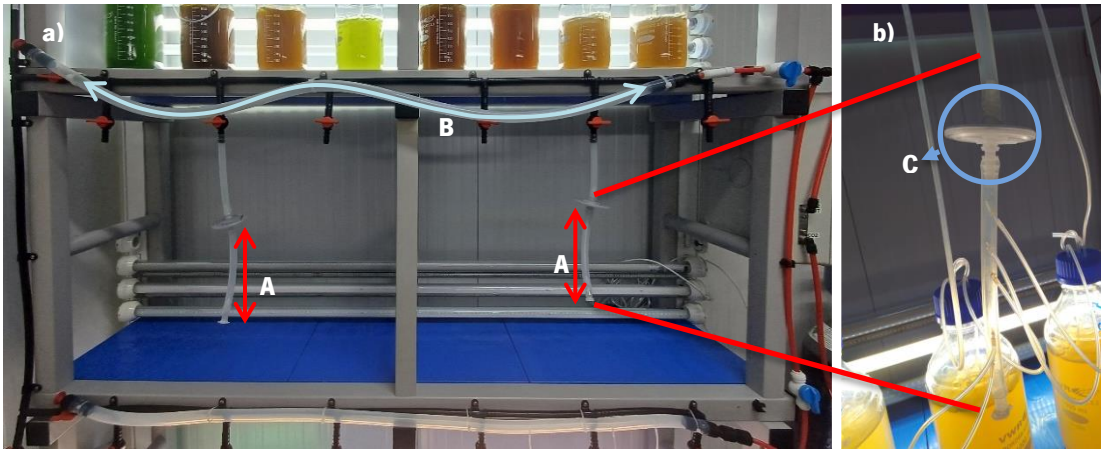

Figura 7 – Estante e seus componentes. **a)** Visão frontal da estante. A, secção de ligação do ar; B, secção de ligação do CO_2; **b)** amplificação da secção de ligação do ar. C, filtro de ar.

Do ponto de vista operacional, a estante apresenta ainda um sistema de controlo que permite regular as injeções de CO_2 e as luzes (automata SIEMENS Logo), nomeadamente o número de lâmpadas que estão ligadas e o fotoperíodo, representado na **Figura 8**.



Figura 8 – Controlo das luzes e CO_2.

2.3. Água para os meios de cultura: recolha, filtração e salinidade

A água do mar é utilizada na empresa como base para preparar os meios de cultura nutritivos, garantindo, assim, que é utilizada água com uma composição e características do habitat natural das espécies marinhas de microalgas usadas. Neste trabalho a água foi coletada na praia Norte em Viana do Castelo (**Figura 9**), próxima às instalações da empresa, de modo a usar-se sempre água fresca.

Devido ao facto de a água ser recolhida *in loco,* esta pode conter resíduos sólidos indesejados, como tal, a água é primeiramente filtrada, recorrendo a filtros Nitex com poro de 1 micra absoluto da marca SEFAR, para remoção de partículas de maior tamanho. Posteriormente, efetuou-se o ajuste da salinidade para uma salinidade de 30 ‰ (p/v). Por último, a água foi submetida a esterilização por autoclave, nas condições acima referidas. No caso de espécies de água doce foi utilizada água desmineralizada.

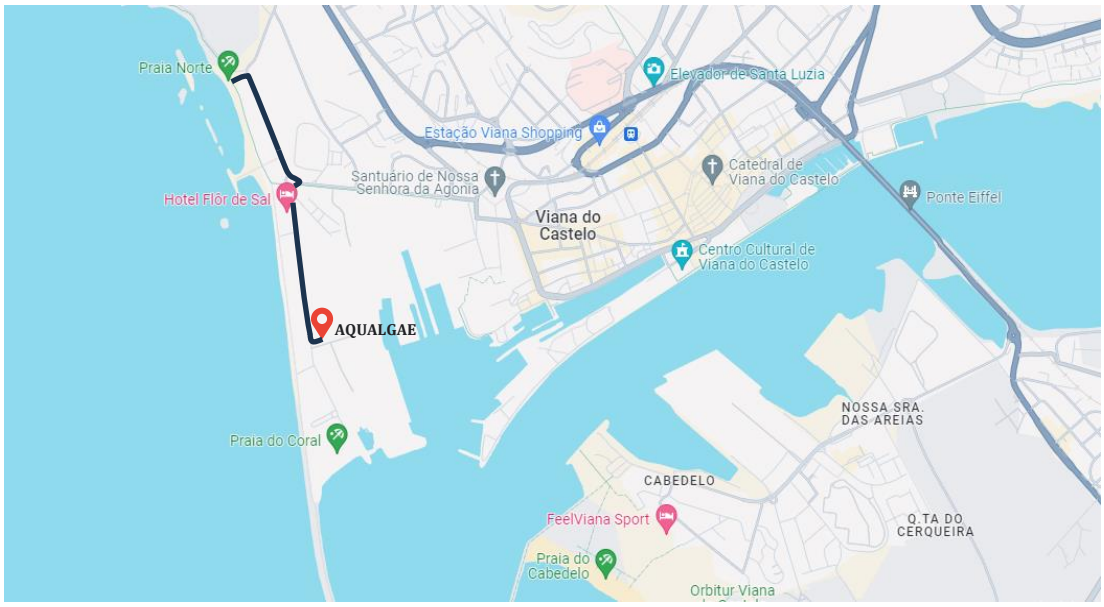

Figura 9 – Mapa da cidade de Viana do Castelo, com a localização da empresa **AQUALGAE** e percurso até à praia onde se faz a recolha da água (Praia Norte). Imagem retirada e adaptada do Google Maps.

2.4. Formulação dos meios de cultura

No decurso deste trabalho foram preparados/formulados vários meios nutritivos à base de biofertilizantes disponíveis no mercado. O meio de cultura Gold Medium, usado como standard pela empresa AQUALGAE, foi utilizado como controlo em todos os ensaios, isto é, foi considerado o valor de referência para comparação do desempenho dos outros meios nutritivos.

Numa primeira abordagem optou-se por fazer uma normalização dos meios para o nível de nitrogénio total (N) presente no Gold Medium (0,0280 g/L), sendo os restantes meios preparados de forma a ficarem com uma concentração de N semelhante à do GM (**Tabela 4**). No caso dos meios Bionova (BioN) e Bio Bloom (BB), como se pretendia testá-los em combinação com, respetivamente, Orgatrex (Org) e Bio Grow (BG) (**Tabela 4**), as suas soluções stock foram preparadas com 50% do N de GM. A solução conjugada dos dois biofertilizantes apresentou, contudo, o mesmo nível de N que o Gold Medium. Esta mistura de biofertilizantes teve como objetivo avaliar possíveis vantagens provenientes da conjugação de diferentes biofertilizantes.

Tabela 4 – Nomes dos meios comerciais, siglas usadas e proporções dos produtos comerciais na solução stock e nos meios nutritivos finais.

	Nome	Sigla	Proporção na solução stock	Proporção da solução stock no meio final (mL/L)
Controlo	Gold Medium	GM	19 g 'sol. A' + 0,25 g 'sol. B' /L	10
Primeira abordagem	Orgatrex	Org	43,10 mL/L	10
	Bionova	BioN	129,70 mL/L	-
	Orgatrex+ Bionova	O+B	-	5 (Org) + 10 (BioN)
Segunda abordagem	Bio Grow	BG	53,87 mL/L	10
	Bio Bloom	BB	131,16 mL/L	10
	Bio Grow+Bio Bloom	G+BB	-	5 (BG) + 10 (BB)

No caso da *Chlorella vulgaris,* por ser uma espécie de água doce, não foi utilizada a formulação de GM normal, em alternativa, foi preparado um meio de cultura a partir das soluções A e B de GM mais duas soluções de sais minerais (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Composição das soluções de meio ou nutrientes inorgânicos para espécies de água doce.

	Composição	Concentração (g/L)
Solução A	Solução A do GM	51,5
Solução B	Sulfato de magnésio	15
Solução C	Cloreto de cálcio	5
Solução D	Solução B do GM	0,25

2.5. Formulação dos suplementos

Algumas espécies ou grupos de microalgas necessitam de compostos/suplementos específicos para se desenvolverem adequadamente, como por exemplo, as diatomáceas, que necessitam de adição

de silicatos no meio. Por esta razão, prepararam-se algumas soluções stock para posteriormente se adicionarem aos meios formulados com biofertilizantes para determinadas espécies (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Suplementos adicionais utilizados, respetivas espécies, modo de preparação e concentração utilizada nos ensaios.

	Espécie	Composição	Concentração stock (g/L)	Concentração utilizada (ml/L)
Suplemento de silicatos	*Chaetoceros calcitrans*	Silicato de sódio	45	10
Suplemento de magnésio	*Chlorella vulgaris*	Sulfato de magnésio	15	10
Premix de vitaminas	*Tisochrysis lutea*	Biotina	0,00176	10
		Tiamina	0,0034	
		Cobalamina	0,0023	
Suplemento de fósforo	*Tetraselmis chuii*	Dihidrogenofosfato de sódio dihidratado	2	10

O suplemento de silicatos e o de magnésio foram utilizados devido às reconhecidas necessidades específicas das espécies indicadas, já o suplemento de fósforo e o premix de vitaminas foram utilizados para analisar possíveis elementos limitantes do meio.

2.6. Modo de operação dos biorreatores

Os ensaios realizados para avaliação do desempenho dos meios de cultura decorreram durante duas semanas. A primeira semana foi dedicada à preparação do material, biorreatores e água, e início das culturas, sendo que todo o material foi devidamente esterilizado em autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Durante os primeiros dias de cultura, os biorreatores foram operados em modo descontínuo, sendo retiradas apenas pequenas amostras, entre 5 a 10 mL, para acompanhar o crescimento celular e medir os níveis de pH, que foi monitorizado para se manter entre 7,5 e 8 ao longo de todo o ensaio. Durante a segunda semana, os biorreatores operaram em modo semicontínuo, com renovações diárias de 25% do volume total (900 mL). Além disso, as culturas foram mantidas sempre sob iluminação por via de lâmpadas LED (VALOYA NS12), com uma intensidade luminosa média de 108,378 ± 6,143 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, e uma temperatura controlada

de 18± 3 °C, para assegurar um ambiente ideal ao crescimento das microalgas. Na **Figura 10**, pode ver-se, a título ilustrativo, os biorreatores em operação em um ensaio com a espécie *Tetraselmis chuii*.

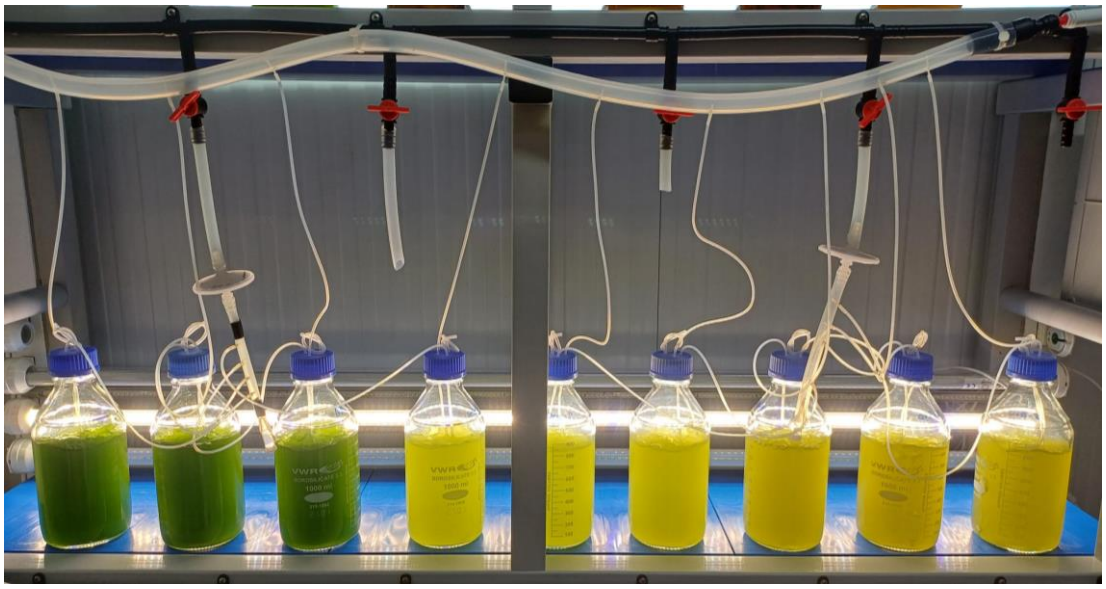

Figura 10 – Estante operacional durante um ensaio com a espécie *Tetraselmis chuii* (dia 5 do ensaio).

2.7. Ensaios para avaliação do desempenho dos meios nutritivos

De forma a poder avaliar o desempenho das várias formulações de meios de cultura foram realizados diversos ensaios com as 5 espécies de microalgas mencionadas anteriormente, pertencentes a famílias e habitats distintos (**Tabela 3**).

Os ensaios realizaram-se em dois momentos distintos, com base nas formulações de biofertilizantes utilizados. Numa primeira abordagem foram selecionados dois biofertilizantes disponíveis no mercado, o Orgatrex (BioTabs) e o Bionova (BIONOVA Roots) (**Figura 11b)**), tendo-se testado Orgatrex individualmente e a combinação de ambas, para além do meio standard: GM, Org, O+B (**Tabela 4**), em todas as espécies de microalgas referidas (**Tabela 3**). Durante esta primeira abordagem foram também realizados dois ensaios complementares, com o objetivo de avaliar se determinados fatores nutritivos poderiam ser limitantes do crescimento das culturas demonstrados durante os ensaios principais, de tal modo, testaram-se os suplementos inorgânicos mencionados anteriormente, o suplemento de fósforo e o premix de vitaminas (**Tabela 4**).

Num segundo momento de ensaios recorreu-se ao uso de novos biofertilizantes, também disponíveis no mercado: Bio Grow (Biobizz) e Bio Bloom (Biobizz) (**Figura 11a)**), tendo-se testado as formulações individualmente e a combinação de ambos: GM, BG, G+BB, BB (**Tabela 4**), em todas as espécies de microalgas (**Tabela 3**).



Figura 11 – a), biofertilizantes Bio Grow e Bio Bloom; **b)**, Biofertilizantes Orgatrex e Bionova.

Numa última fase de ensaios, foram realizados novos testes com as espécies mencionadas anteriormente (**Tabela 3**) exceto *Chlorella vulgaris*, o objetivo foi comparar o desempenho do meio G+BB com o meio f/2, de acordo com a formulação de Guillard e Ryther (1962), que é amplamente utilizado como referência na literatura para o cultivo de microalgas. Este ensaio comparativo foi realizado seguindo os mesmos parâmetros que nos ensaios anteriores, com o intuito de avaliar o potencial do meio G+BB face ao meio f/2.

2.8. Análise quantitativa de crescimento das culturas

De modo a acompanhar o crescimento das suspensões de microalgas e comparar o desempenho dos vários meios nutritivos procedeu-se à análise quantitativa da variação da densidade celular ao longo do tempo a partir de contagens celulares regulares.

A contagem de células é um método bastante utilizado em várias áreas da biologia para quantificação da proliferação de células/organismos unicelulares, sendo o uso das câmaras de contagem Neubauer Improved bastante comum devido à sua qualidade e aplicações (Zuvela & Matson, 2020; Malafaia *et al.*, 2022). Em conformidade, durante os nossos ensaios recorremos a câmara de contagem Neubauer Improved para determinar a densidade celular, a partir do número de células contadas ao microscópio óptico.

A câmara de Neubauer, que no fundo é uma lâmina especial para microscopia óptica, consiste de duas áreas de contagem (ver setas a cheio na **Figura 12**) na zona central, separadas por uma ranhura entre elas, paralela ao eixo maior da lâmina (ver linha tracejada na **Figura 12**).

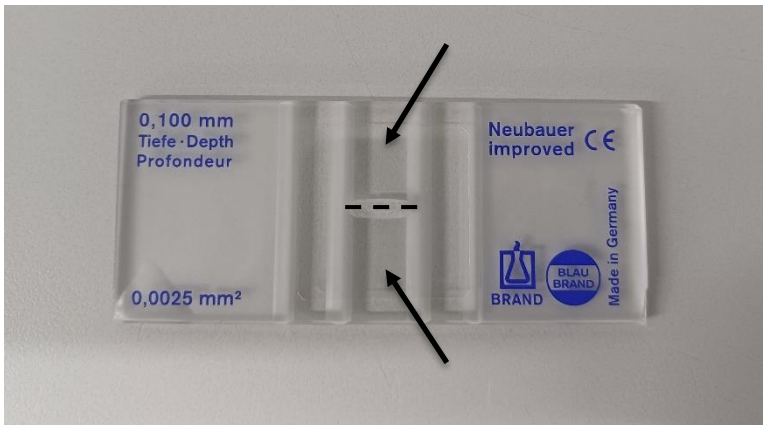

Figura 12 – Câmara de contagem Neubauer Improved

Quando a lamela está corretamente colocada sobre a câmara fica a uma distância de 0,1 mm da superfície da câmara. Se a montagem da lamela não for adequada esta distância será superior o que fará com que as contagens celulares na amostra não sejam rigorosas.

Cada uma das duas áreas de contagem acima referidas (**Figura 12**) apresenta uma grelha na qual podemos identificar 4 quadrantes de malha mais aberta, junto aos vértices (**Figura 13**, região destacada a vermelho). Para recolher os dados do número de células as contagens foram efetuadas em dois desses quadrantes, sempre em posições diametralmente opostas, obtendo-se, assim, um total de 4 contagens por amostra.

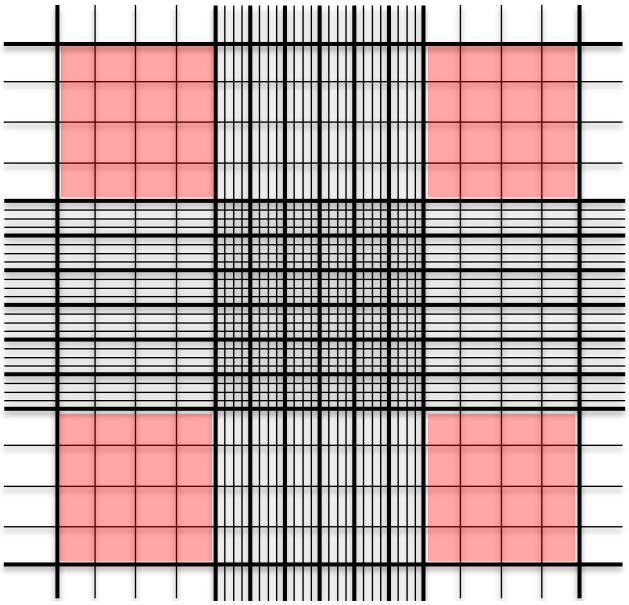

Figura 13 – Grelha de contagem da câmara de Neubauer Improved. Área de contagem destacada a vermelho.

Após o carregamento da amostra por pipetagem cuidadosa da suspensão na região central da lâmina, cada uma das áreas de contagem irá conter 0,1 µL de suspensão, como tal, o cálculo da concentração de células na suspensão foi realizado seguindo a seguinte formula:

Concentração (células/mL) = N x D x 10.000

Onde N corresponde à média das contagens realizadas em cada um dos 4 quadrantes selecionados e D à diluição aplicada à amostra antes do carregamento e 10.000 corresponde ao fator de conversão do volume medido em µL para mL.

2.9. Análise estatística

Com os dados recolhidos das contagens de células foram construídas curvas de crescimento para os vários ensaios realizados e espécies de microalgas estudadas, de modo a se poder fazer para uma análise comparativa, recorrendo ao programa Microsoft Excel, versão 2406. Os dados obtidos no final dos ensaios foram analisados estatisticamente, através de 1-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, com um nível de significância de 0,05, recorrendo ao programa SPSS Statistics, versão 29.0.2.0, de forma a identificar possíveis diferenças de desempenho dos meios nutritivos testados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho na empresa foi dividido em diferentes fases, consoante a abordagem, tendo por base os meios nutritivos e formulações combinadas utilizadas nos ensaios de crescimento das microalgas: na primeira fase testou-se Orgatrex (Org) e Orgatrex mais Bionova (O+B), na segunda, BioGrow (BG) e BioGrow mais BioBloom (G+BB); e, na terceira, o meio de Guillard f/2 (f/2) e G+BB. Como mencionado anteriormente, o fator de normalização usado para os meios foi o nível de azoto (N), visto este ser um nutriente fundamental para as microalgas, sendo os níveis das formulações igualados ao do meio Gold Medium (GM; standard da empresa). O azoto, e o fósforo (P) são os macronutrientes mais utilizados pelas microalgas durante o seu crescimento e multiplicação (Santos & Pires, 2020). O azoto é necessário para a construção de proteínas e ácidos nucleicos, entre outras moléculas, o que o torna crucial para o desenvolvimento das microalgas (Akgül, 2019); e o P na formação de ATP e ácidos nucleicos, sendo crucial para a fotossíntese, respiração e divisão celular (Solovchenko *et al.*, 2024), sendo ambos imprescindíveis para algas e plantas que obtêm os minerais essenciais a partir do meio ambiente. As microalgas sofrem alterações bioquímicas com variações na concentração de azoto no meio, sendo que, apenas numa gama de concentrações adequadas, a qual é dependente da espécie, se pode observar uma boa taxa de crescimento e multiplicação celular. De facto, se numa situação de privação de azoto se pode observar uma diminuição na produção de pigmentos e proteínas, numa situação de excesso de azoto pode observar-se uma perda de densidade celular e diminuição de produção de pigmentos, proteínas e lípidos, possivelmente devido a um desequilíbrio de nutrientes ou à toxicidade causada por excesso de azoto (Zarrinmehr *et al.*, 2019).

3.1. Primeira fase – ensaios com os meios de cultura Orgatrex (Org) e Orgatrex+Bionova (O+B)

Com o objetivo de desenvolver um meio de cultivo para microalgas totalmente biológico, a primeira fase deste estudo explorou a utilização de dois biofertilizantes como fonte de nutrientes. Como tal, foram testados dois novos meios de cultura: **Org**, composto exclusivamente pelo biofertilizante Orgatrex, e **O+B**, uma combinação dos biofertilizantes Orgatrex e Bionova. O desempenho destes novos meios de cultura foi comparado com o meio de eleição da empresa **AQUALGAE**, o **Gold Medium, GM**, que funcionou como grupo controlo em todos os ensaios realizados ao longo deste trabalho.

3.1.1. Crescimento de microalgas com os meios Org e O+B

3.1.1.1. *Tisochrysis lutea*

Na **Figura 14A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos agora testados, sendo evidente a diferença de crescimento celular entre os grupos controlo e experimentais, bem como entre estes dois, com as curvas dos 3 grupos muito distintas entre si: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 6º dia, 29,13±1,67 x10^6 células/mL, e ao fim de 10 dias de cultura terminou com 18,02±0,66 x10^6 células/mL; enquanto que com Org e O+B atingiu-se um pico ao 6º dia de apenas 8,00±1,67 x10^6células/mL e 8,00±0,39 x10^6 células/mL, respetivamente, decrescendo posteriormente para 5,54±0,27 x10^6 células/mL e 4,41±0,45 x10^6 células/mL no final do ensaio.

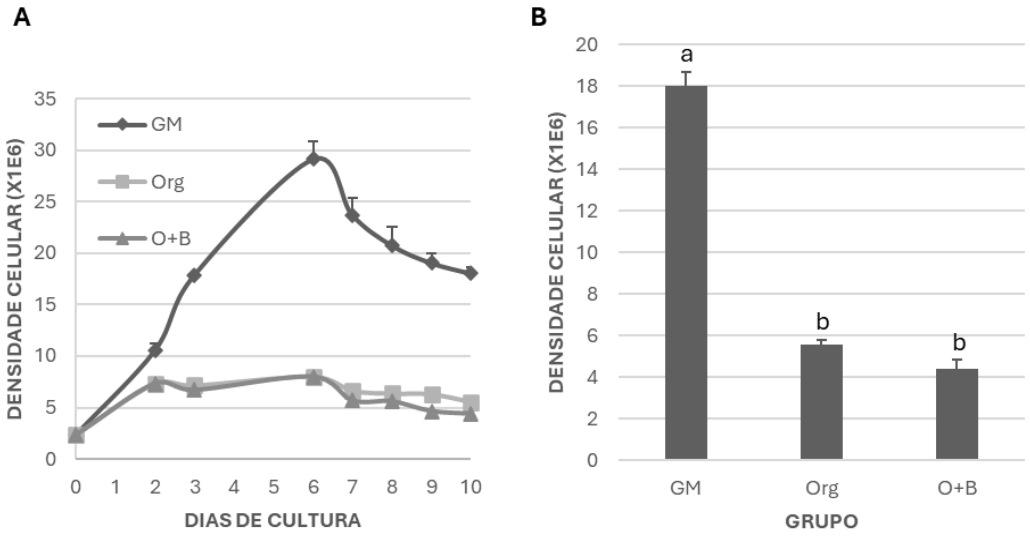

Figura 14 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10º dia), das suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

Apesar de se verificar uma tendência para a diminuição na densidade celular da suspensão no meio GM a partir do 6º dia esta continua a apresentar uma densidade bastante superior às registadas com Org e O+B. Podemos também constatar as diferenças referidas quer por observação direta das culturas (**Figura 15**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 14B**), onde podemos verificar que as densidades finais atingidas com Org e O+B não foram significativamente diferentes entre si, mas muito diferentes das obtidas com GM, respetivamente, cerca de 1/3 e 1/4 do seu valor.

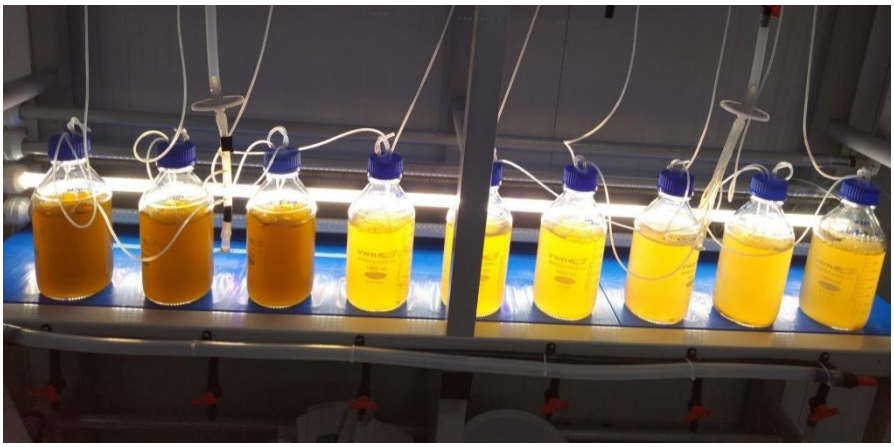

Figura 15 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de *Tisochrysis lutea* em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B.

3.1.1.2. *Phaeodactylum tricornutum*

Na **Figura 16A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas com a espécie *Phaeodactylum tricornutum* nos 3 meios nutritivos testados, sendo também evidente a diferença de crescimento celular entre os grupos controlo e experimentais, bem como entre estes dois: com Org e O+B as suspensões alcançaram valores de estabilização de 3,74±0,16 x10^6 e 11,04±2,35 x10^6 células/mL respetivamente, em que, no caso do grupo Org, este apresentou uma grande dificuldade na manutenção da cultura, tendo terminado o ensaio quase com a mesma densidade celular de quando foi inoculado; no grupo controlo, GM, as suspensões alcançaram uma concentração de estabilização de 30,53±0,54 x10^6 células/mL ao fim de 8 dias de cultura, sendo possível observar no grupo GM o pico característico de densidade celular no 5º dia de cultura, 33,35±1,78 x10^6 células/mL, que corresponde ao fim da fase de cultivo em batch e o subsequente decréscimo nos restantes dias. Com esta espécie observou-se uma melhor estabilização da curva de crescimento por parte do grupo GM comparativamente ao ensaio anterior (**Figura 14A**).

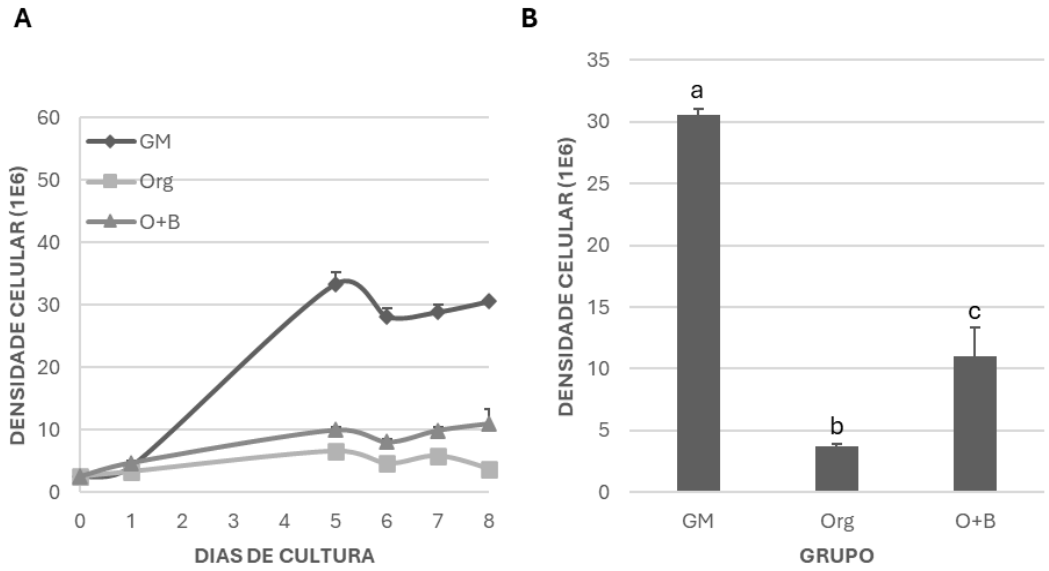

Figura 16 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 8 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (8º dia), das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

A diferença na densidade celular entre o grupo GM e os outros dois grupos manteve-se, podendo-se constatar estas diferenças tanto por observação direta das culturas (**Figura 17**), como pela comparação estatística das densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 16B**). Contrariamente ao ensaio anterior, podemos verificar que os valores das densidades de estabilização alcançadas nos grupos Org e O+B apresentaram diferenças significativas entre si, sendo, respetivamente, cerca de 1/7 e 1/4 do valor de GM, ou seja, o meio Org é claramente menos adequado para esta espécie do que para a anterior (**Figura 14B**). Estas diferenças são bem visíveis no contraste de coloração observado na **Figura 17**.

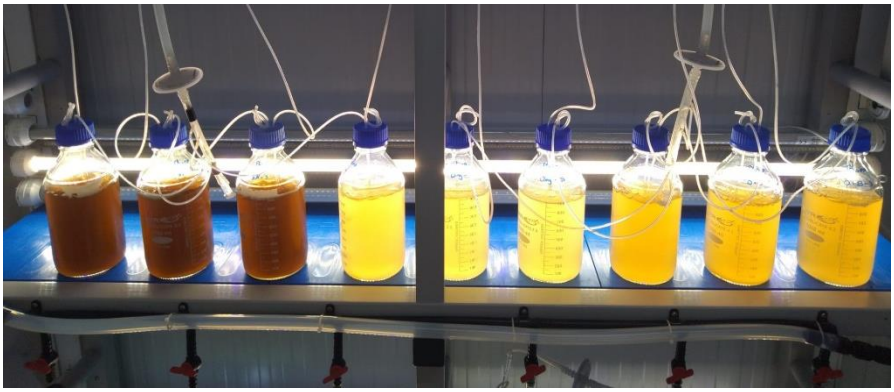

Figura 17 – Oitavo e último dia de cultura das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B.

Analisando a literatura disponível encontrou-se um trabalho de Santos-Ballardo e colaboradores (2016) no qual cultivaram a espécie *Phaeodactylum tricornutum* com um meio que consiste de água salgada natural suplementada com as vitaminas tiamina e biotina. Usaram duas modalidades de biorreator no exterior, em saco e em coluna de bolhas, obtendo resultados de 3,90 x10^6 e 5,13 x10^6 células/mL, respetivamente, e um biorreator interior de coluna de bolhas em que obtiveram uma densidade celular de 16,66 x10^6 células/mL. A discrepância de valores de densidade obtida entre os biorreatores exteriores e interior deve-se à exposição dos meios a fatores abióticos não controlados, tendo-se observado elevadas variações na radiação solar e na temperatura das culturas exteriores durante o período de estudo. As vantagens oferecidas pelos biorreatores interiores a nível de controlo das culturas são bastante documentadas (Barboza-Rodríguez *et al.*, 2023), assim como evidenciado pelos resultados do trabalho de Santos-Ballardo e colaboradores (2016). Comparando estes resultados com os obtidos com Org e O+B, respetivamente 3,74±0,16 x10^6 e 11,04±2,35 x10^6 células/mL, podemos verificar que resultado obtido com o grupo Org se aproxima bastante dos ensaios realizados no exterior por aqueles autores. Este resultado é interessante pois, sendo o meio de cultura utilizado por Santos-Ballardo e colaboradores (2016) apenas composto por água salgada natural com adição de vitaminas, à partida mais pobre em nutrientes que um meio comercial, provavelmente a suplementação de vitaminas poderá ser um factor a testar para melhorar o desempenho dos meios Org e O+B, já que com GM (máximo de 30,53±0,54 x10^6 células/mL) já se obtiveram valores de densidade superiores aos destes autores.

3.1.1.3. *Chaetoceros calcitrans*

Na **Figura 18A** encontram-se representadas as curvas de crescimento de *Chaetoceros calcitrans* revelando algumas diferenças relativamente às obtidas com as espécies anteriores: o grupo GM parece estabilizar após o 5º dia, sem decaimento posterior, atingindo no final do ensaio um valor estável de 8,16±0,28 x10^6 células/mL; e os grupos Org e O+B apresentaram um comportamento quase idêntico, com um pico de densidade celular ao 2º dia (cerca de 4 x10^6 células/mL), decrescendo posteriormente até valores de 1,43±0,14 x10^6 células/mL e 1,57±0,15 x10^6 células/mL, respetivamente. Estes dois valores são inferiores ao da densidade celular de inoculação (2,09±0,04 x10^6 células/mL), o que sugere que os meios Org e O+B não foram capazes de manter as culturas de *Chaetoceros calcitrans*. Esta decadência da cultura durante os últimos dias do ensaio, nestes dois grupos, poderá ser explicada pela falta de um, ou vários, elementos essenciais para esta espécie.

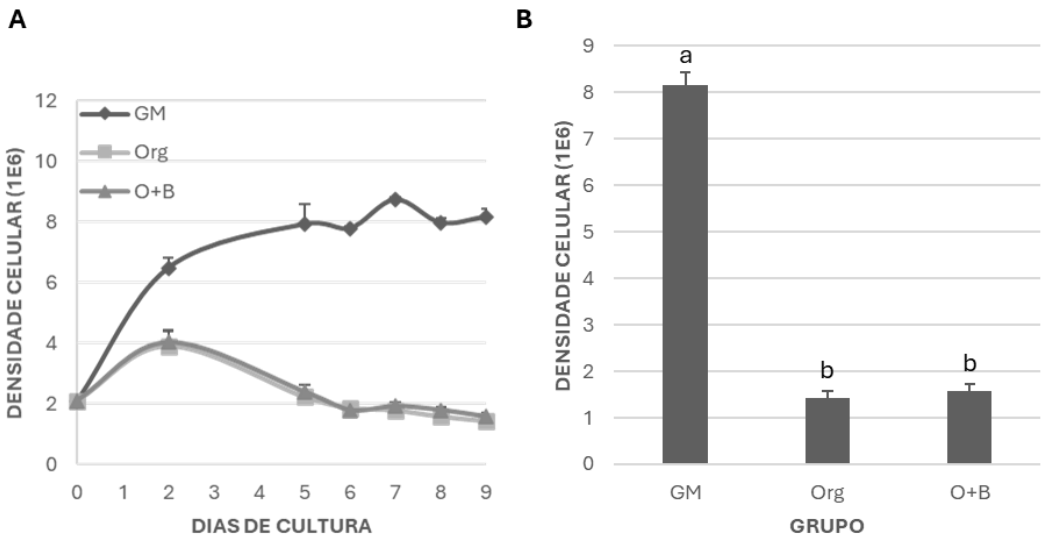

Figura 18 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Chaetoceros calcitrans* nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9° dia), das suspensões de *Chaetoceros calcitrans* nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

Este efeito dramático pode ser constatado na **Figura 18B**, onde podemos verificar que as densidades finais atingidas com os meios Org e O+B não foram significativamente diferentes entre si, e apenas cerca de 1/8 do valor de GM, a maior diferença até agora encontrada entre os meios em teste e o meio standard. Podemos, igualmente, constatar as diferenças entre os grupos experimentais pela observação das culturas e o contraste na sua coloração (**Figura 19**).

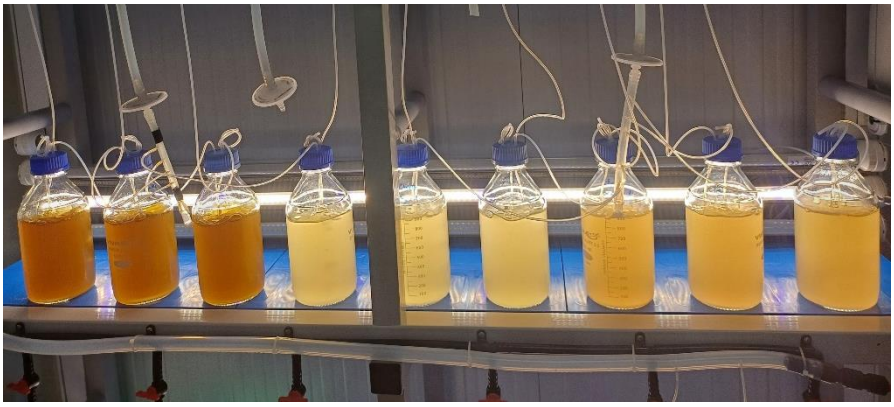

Figura 19 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Chaetoceros calcitrans* em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B.

Shei e colaboradores (2008), num estudo com a mesma espécie em que pretendiam desenvolver formulações de água marinha artificial como alternativa à água marinha natural, de modo a evitar

contaminações e garantir qualidade consistente, realizaram crescimentos em meio de cultura de Conway, em Erlenmeyers de 500 mL, sendo as culturas agitadas pelo fornecimento de ar e mantidas num fotoperíodo de 12 h. Durante o ensaio obtiveram densidades celulares de 7,5 x10^6 células/mL (obtido num grupo de água marinha artificial), um valor próximo do por nós obtido com o grupo GM (8,16±0,28 x10^6 células/mL).

3.1.1.4. *Tetraselmis chuii*

Na **Figura 20A** encontram-se as curvas de crescimento obtidas para esta espécie sendo também muito evidente a diferença de crescimento celular com GM e com os dois meios nutritivos em teste: com GM, ao fim do 5º dia a cultura estabilizou com uma densidade de cerca de 2,97±0,23 x10^6 células/mL; enquanto que com Org e O+B apenas se atingiram densidades máximas igualmente por volta do 5º dia, mas apenas de cerca de 1 x10^6 células/mL, decrescendo de modo constante até 0,5 x10^6 células/mL no final do ensaio.

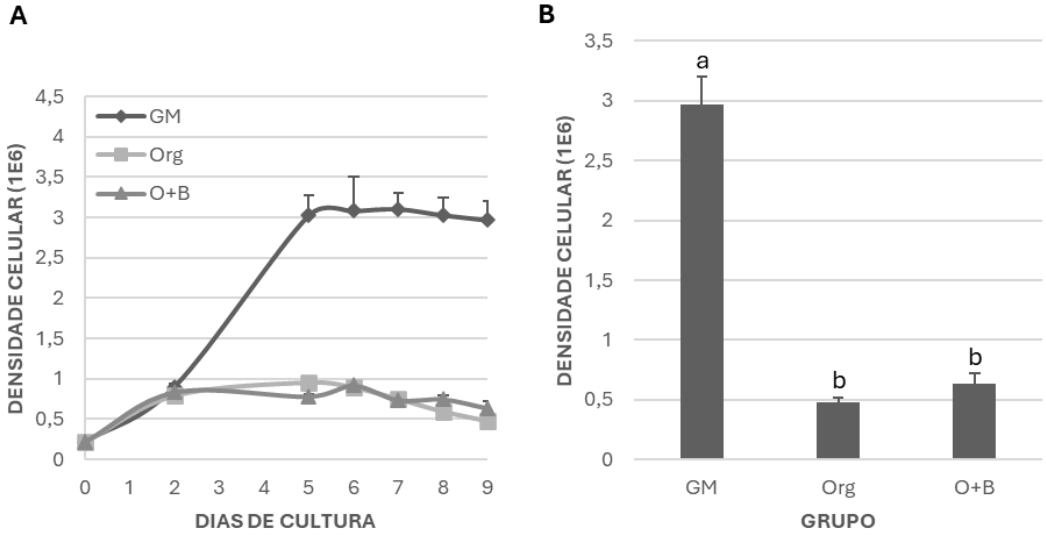

Figura 20 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

Podemos constatar estas diferenças entre os grupos não só a partir da observação das culturas, onde os grupos Org e O+B não apresentam coloração verde devido à baixa densidade (**Figura 21**), como ainda, pela comparação estatística das densidades das suspensões no dia final do ensaio (**Figura 20B**), onde podemos verificar que as densidades finais atingidas com os meios Org e O+B não foram

significativamente diferentes entre si, e bastante inferiores às obtidas com GM, cerca de 1/6 do valor deste.

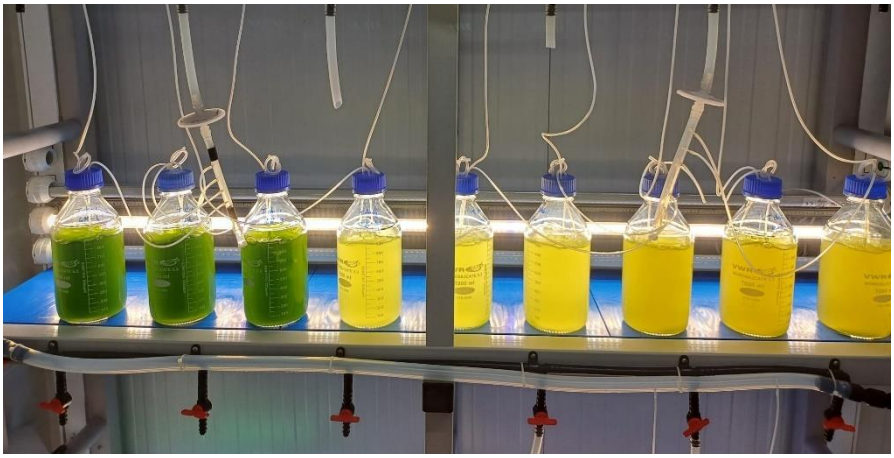

Figura 21 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Tetraselmis chuii* em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B.

Na bibliográfica foi possível encontrar vários trabalhos realizados com esta espécie e com diferentes meios, como o meio Erdschreiber, onde se obteve uma densidade celular de 2,59 x10^6 células/mL (Sebastien & Klein, 2006), semelhante ao valor por nós obtido com o grupo GM (2,97±0,23 x10^6 células/mL). Todavia, surgem trabalhos, como o de Day e Tsavalos (1996), em que obtiveram densidades celulares entre as 5-7 x10^6 células/mL com meio TM4, ou seja, superiores ao nosso grupo GM. Estes resultados, conjuntamente com os anteriormente referidos, mostram que meios diferentes apresentam performances distintas para uma dada espécie, e que espécies diferentes têm melhores comportamentos com determinados meios, sublinhando que existem especificidades em requisitos nutricionais e culturais que devem ser bem conhecidas antes de se iniciarem produções em escala.

3.1.1.5. *Chlorella vulgaris*

Por último, nesta primeira fase, fez-se o ensaio com *Chlorella vulgaris,* a única espécie de água doce utilizada neste trabalho, estando representadas na **Figura 22A** as curvas de crescimento obtidas para os 3 meios nutritivos. Embora seja igualmente evidente a diferença de crescimento celular entre os grupos teste e o grupo controlo, para esta espécie, o perfil de crescimento é bastante paralelo nos 3 meios: com todos se alcançou um máximo de densidade no dia 5 – com GM 98,25±3,95 x10^6 células/mL e com Org e O+B cerca de 60 x10^6 células/mL – decrescendo posteriormente, até estabilizar no GM e mais abruptamente com os meios teste, até ao final do ensaio, atingindo-se com GM um estado de estabilização, com uma densidade de 70,96±5,83 x10^6 células/mL, com Org de 20,08±1,95 x10^6 células/mL e com O+B uma densidade de 18,54±0,31 x10^6 células/mL, terminando estes dois meios

com densidades celulares abaixo dos níveis de inoculação (26,62±1,39 x10^6 células/mL), tal como se tinha observado para *Chaetoceros calcitrans* (**Figura 18A**). É importante notar que *Chlorella vulgaris* é uma espécie caracterizada por atingir densidades celulares muito elevadas, no entanto, os resultados obtidos nos grupos experimentais não refletem este potencial, evidenciando o défice nutritivo a que as microalgas ficarão sujeitas com estes meios.

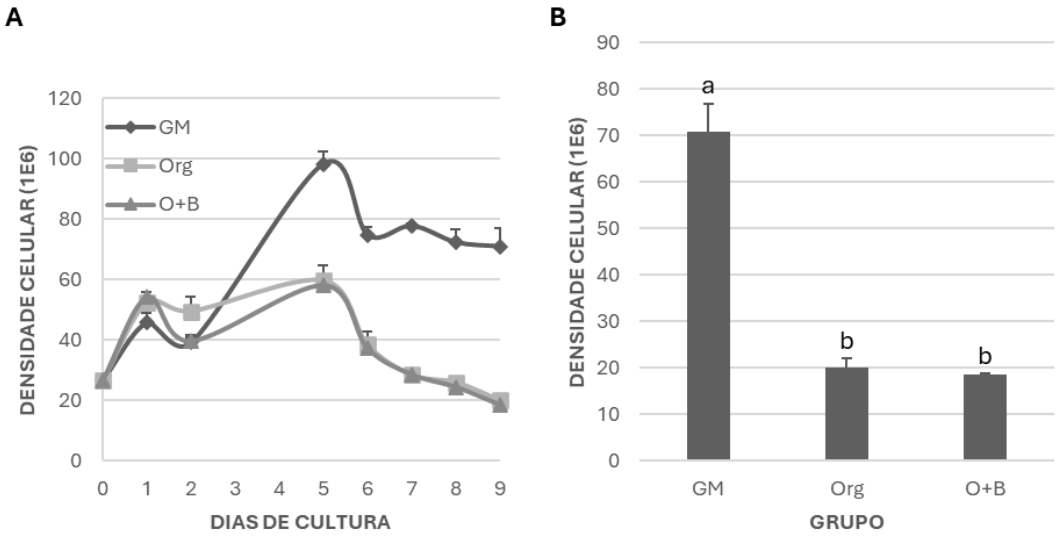

Figura 22 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Chlorella vulgaris* nos meios GM, Org e O+B, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de *Chlorella vulgaris* nos meios GM, Org e O+B. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

À semelhança dos ensaios anteriores é possível observar as diferenças entre GM e os outros dois meios pela observação das culturas (**Figura 23**), e pela análise estatística das densidades das suspensões no último dia do ensaio (**Figura 22B**), onde podemos verificar que as densidades finais atingidas nos grupos Org e O+B não foram significativamente diferentes entre si, e ambas foram bastante diferentes da obtida com o grupo GM, com cerca de 1/3-1/4 do seu valor.

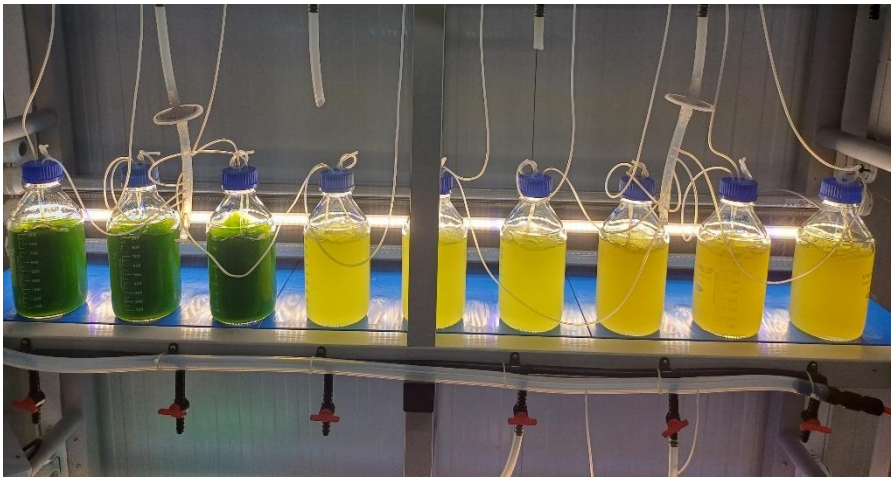

Figura 23 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Chlorella vulgaris* em meio GM, Org e O+B. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois O+B.

Wong e colaboradores (2016), usando um biorreator de bolhas e dois air-lifts de 16 L, obtiveram densidades celulares de 14 x10^6 células/mL, 11 x10^6 células/mL e 7 x10^6 células/mL, respetivamente, mostrando que a homogeneização da cultura tem um grande impacto no crescimento celular, visto o biorreator de bolhas ser o que apresenta melhor homogeneização. Não é possível fazer uma comparação direta com os nossos resultados, pois o processo de homogeneização num biorreator de 16 L é muito mais complexo do que em biorreatores de escala laboratorial de 1 L, onde se torna possível alcançar condições de cultura físicas mais controladas e ideais. Em contraste, Rai e colaboradores (2014), usando um biorreator de escala piloto (5 L) e meio BG11 adaptado, registaram valores de 122,7 ×10^6 células/mL, um valor de densidade muito mais elevado e bem mais próximo do valor máximo por nós obtido com GM (98,25±3,95 x10^6 células/mL).

Como já mencionado, o objetivo desta primeira fase de ensaios era testar as formulações com os biofertilizantes Org e O+B, na tentativa de encontrar um meio de cultura biológico que possa substituir os de síntese química e, assim, contribuir para uma maior sustentabilidade ecológica dos processos. No entanto, como foi possível constatar, após a realização desta primeira série de ensaios, torna-se evidente uma tendência transversal a todos eles: o meio GM apresentou sempre resultados de densidade celular muito superiores aos grupos experimentais, Org e O+B, variando os valores obtidos com estes meios, no final dos ensaios, entre 1/3 a 1/8 dos valores de densidade obtidos com GM. De assinalar ainda que, nos ensaios com *Chaetoceros calcitrans* e *Chlorella vulgaris*, houve mesmo uma dificuldade na manutenção da viabilidade das culturas com estes dois meios experimentais, tendo-se registado, no final dos ensaios, valores de densidade celular inferiores aos de inoculação, possivelmente devido a deficiências vitais no perfil nutricional do meio para aquelas espécies. Ademais, com a análise estatística

no final dos ensaios foi percetível o facto de os dois grupos experimentais raramente terem apresentado diferenças significativas entre si, com exceção do ensaio realizado com *Phaeodactylum tricornutum*, no qual o meio O+B resultou numa densidade celular cerca de 3x superior à obtida com o meio Org. Em conjunto, estes resultados revelaram que os dois meios em teste não têm o perfil nutricional adequado para o crescimento das 5 espécies de microalgas em estudo. Lembrando que se procedeu a uma normalização das formulações testadas para o nível de N do meio GM, importava tentar agora identificar possíveis desequilíbrios e/ou deficiências em nutrientes que se possam ter sido introduzidas com esse procedimento.

3.1.2. Identificação de fatores limitantes: vitaminas e fósforo

Do conjunto dos primeiros ensaios com os meios Orgatrex (Org) e Orgatrex e Bionova (O+B) normalizados para nível de N do Gold Medium (GM), verificou-se que os meios em teste não ofereceram as condições nutritivas mínimas para um bom desenvolvimento da cultura das microalgas em estudo, ficando sempre muito aquém do desempenho de GM. Deste modo, e tendo em consideração que as condições físicas de cultura foram sempre iguais não só entre os grupos como entre ensaios, é plausível colocar a hipótese que a razão para a discrepância nos resultados de densidade celular seja devido a diferenças na composição química dos meios de cultura. Assim, colocou-se a possibilidade de haver um défice de algum nutriente, orgânico ou inorgânico, e recorreu-se à **Lei do Mínimo de Liebig, "Liebig's Law of the minimum" (LLM),** com o intuito de testar esta hipótese. Este é um modelo biológico utilizado para analisar como a escassez de um nutriente pode limitar o crescimento e a produtividade dos organismos. Este modelo sugere que, num ambiente onde estão presentes múltiplos fatores, o crescimento de uma planta (alga ou microalga) é limitado pelo nutriente que está em menor quantidade, independentemente da disponibilidade dos restantes nutrientes. Carl Sprengel foi o primeiro a formular esta lei em 1828, no entanto, foi Justus von Liebig que, mais tarde, consegue popularizar o conceito (Gröger, 2010). Embora a LLM forneça uma perspetiva interessante sobre a limitação do crescimento, ela pode ser vista como uma simplificação excessiva do fenómeno. Autores como Tang e Riley (2021) afirmam que este modelo restringe o organismo a ter uma estequiometria fixa, o que impossibilita a incorporação de adaptações biológicas. Realmente, outro fator não considerado neste modelo é a adaptação dos organismos perante situações de stresse que podem resultar em alterações na regulação genética de vias metabólicas (Warsi *et al.*, 2017). Novos modelos podem ser elaborados com base no LLM, como é o caso do de Dolman e Wiedner (2014), que propõem uma abordagem mais dinâmica, que melhor representa os efeitos do rácio N:P, o que permite uma maior precisão nos resultados obtidos. Contudo, estando cientes das limitações apresentadas por este modelo, o LLM continua a ser um bom

ponto de partida para a formulação da nossa hipótese teórica, sendo o objetivo identificar onde se encontra a limitação dos meios Org e O+B. Deste modo, e tendo em consideração, por um lado, o bom desempenho do meio constituído apenas por água salgada suplementado com vitaminas testado por Santos-Ballardo e colaboradores (2016) para o crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* (vide ponto 3.1.1.2), e, por outro, que juntamente com o N, o fósforo é dos macronutriente requeridos em maiores concentrações, foram realizados dois ensaios em que se pretendeu avaliar se vitaminas e/ou o nível de fósforo, poderiam constituir possíveis fatores limitantes nos meios Org e O+B.

3.1.2.1. Ensaio com suplementação de vitaminas

As vitaminas são essenciais para o bom desenvolvimento das microalgas, como descrito por Coronado-Reyes e González-Hernández (2023), os quais reportaram que, pelo menos, 306 espécies de microalgas necessitam de vitaminas como a tiamina (B1), biotina (B7) e cobalamina (B12), entre outras, para o seu desenvolvimento. As microalgas, embora sejam capazes de produzir várias vitaminas, dependem frequentemente de fontes externas para obter certas vitaminas essenciais, como a vitamina B12, devido à ausência das respetivas vias metabólicas para a sua síntese. O processo de absorção de vitamina B12 nas microalgas envolve proteínas específicas, como a proteína de aquisição de cobalamina 1 (CBA1), e estudos mostraram que a ausência da CBA1 em espécies como *Chlamydomonas reinhardtii* e *Phaeodactylum tricornutum* impede a capacidade de absorção da vitamina B12 (Sayer *et al.*, 2023). Além disso, algumas espécies de microalgas adquirem a vitamina B12 através de relações simbióticas com bactérias que produzem esta vitamina, sendo esta interação mutualista vital para a sobrevivência destas espécies de microalgas quando em ambientes privados de vitaminas essenciais (Croft *et al.*, 2005; Cooper *et al.*, 2019). Um exemplo do valor destas interações é o caso da espécie *Ostreococcus tauri*, que ultrapassa a sua carência de vitamina B12 e B1 ao ser co-cultivada com a bactéria *Dinoroseobacter shibae* (Cooper *et al.*, 2019).

Com base nesta informação, e devido ao baixo conteúdo de vitaminas no biofertilizante Bionova (tiamina 0,3 %) e aparente ausência no Orgatrex, decidiu-se suplementar o meio Org com uma mistura das 3 vitaminas, em quantidade igual às presentes no GM, referidas anteriormente, B1, B7 e B12 (ver **Tabela 6**), e comparar os crescimentos de *Tisochrysis lutea* em meio Org com (**Org+Vit)** e sem (**Org**) suplementação vitamínica, mantendo o meio controlo **GM**, em ensaios de crescimento análogos aos anteriormente descritos. A espécie foi selecionada por ser auxotrófica para a vitamina B12, a qual é crucial para a síntese de metionina e para determinados processos metabólicos (Nef *et al.*, 2019; Nef *et al.*, 2020).

Na **Figura 24A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas neste ensaio, sendo notória a diferença de crescimento celular entre os vários meios, em particular, a ausência de efeito da suplementação vitamínica. Assim, GM, novamente sustentando valores muito mais elevados de densidade celular, alcançou um pico ao dia 5, de modo semelhante ao primeiro ensaio com esta espécies embora com uma densidade inferior (**Figura 14A**), subindo ligeiramente no últimos 2 dias para 21,43±0,27 x10^6 células/mL, não sendo este um perfil habitual, o que poderá dever-se a possíveis erros; já os grupos Org e Org+Vit depois de atingirem uma densidade máxima de cerca de 4 x10^6 células/mL no dia 5, esta decresceu posteriormente para 1,55±0,03 x10^6 células/mL e 1,34±0,02 x10^6 células/mL, respetivamente, ao fim de 9 dias, ambos inferiores aos do meio inicial após inoculação.

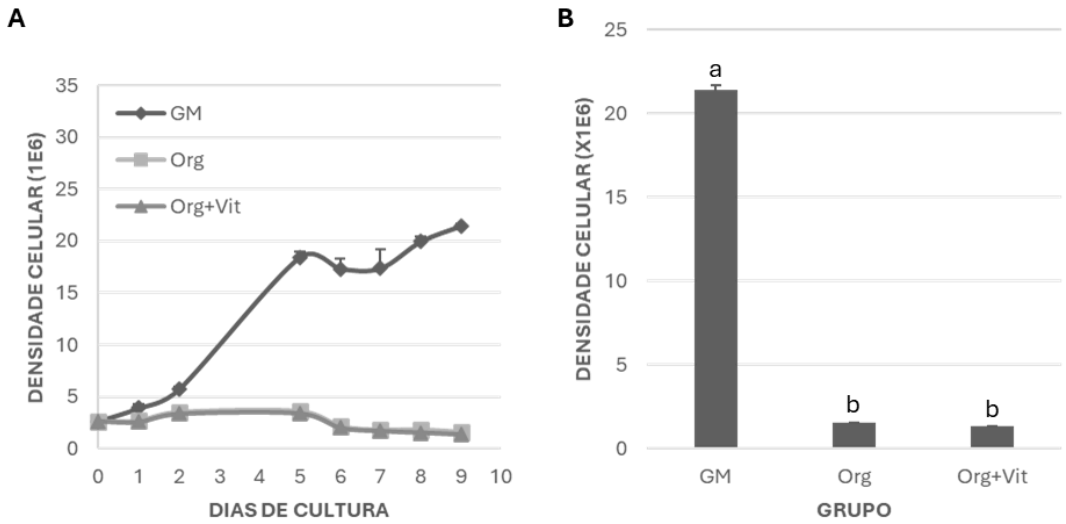

Figura 24 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, Org e Org+Vit, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9° dia), das suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, Org e Org+Vit. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

Podemos constatar estas diferenças tanto pela observação das culturas (**Figura 25**), como na comparação estatística das densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 24B**), onde podemos verificar que as densidades finais atingidas com Org e Org+Vit não foram significativamente diferentes entre si, mas deveras inferiores às obtidas com o grupo GM, com uma densidade celular cerca de 14x superior. Esta ausência de resposta parece sugerir que a suplementação vitamínica não é o fator limitante ou, pelo menos, o único.

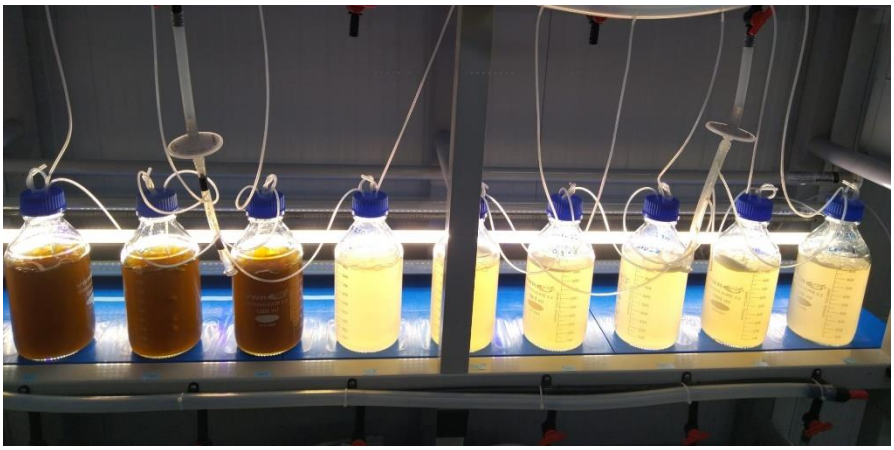

Figura 25 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Tisochrysis lutea* em meio GM, Org e Org+Vit. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org e depois Org+Vit.

A suplementação vitamínica desempenha um papel significativo na melhoria do crescimento e produtividade das culturas de microalgas, incluindo *Tisochrysis lutea*, pois como atrás referido, é crucial para a síntese de metionina e para determinados processos metabólicos (Nef *et al.*, 2019; Nef *et al.*, 2020). A suplementação com vitaminas, particularmente do complexo B, tem demonstrado a capacidade de aumentar a produtividade lipídica nas culturas de microalgas. Por exemplo, o estudo de Policastro e colaboradores (2023), onde a suplementação com vitaminas B numa cultura mista de microalgas levou à duplicação da produtividade lipídica, e o estudo de Danesh e colaboradores (2018), no qual a presença de vitaminas no meio de cultura aumentou significativamente o conteúdo de lípidos e amido das microalgas, destacando assim a importância da suplementação vitamínica no armazenamento de lípidos. Isto é particularmente relevante para a espécie *Tisochrysis lutea*, que é valorizada pelo seu elevado conteúdo de ácidos gordos polinsaturados e potencial como fonte de biocombustível (Almutairi, 2020).

No entanto, não é apenas a espécie *Tisochrysis lutea* que beneficia de uma suplementação de vitaminas, como evidenciado no estudo de Ferreira e colaboradores (2023) onde mostraram que a suplementação com vitamina B3 (niacina) em culturas de *Chlorella vulgaris* aumentou significativamente a concentração celular, a biomassa e a capacidade fotossintética medida pela fixação de CO_2. Além disso, essa suplementação reduziu o stresse oxidativo e melhorou as propriedades físico-químicas do meio de cultura, como o pH e o potencial de oxidação-redução. Adicionalmente, Hamouda e colaboradores (2022) demonstraram que a suplementação com vitamina B1 (tiamina), não só aumentou a biomassa de culturas de *Chlorella vulgaris,* como o conteúdo de pigmentos, proteínas e hidratos de carbono, evidenciando que esta vitamina atua como um potente antioxidante e promotor de crescimento. Ainda relativamente à suplementação com tiamina, Ruangsomboon e colaboradores (2018) num estudo com

Botryococcus braunii, demonstraram que promoveu um aumento significativo na produção de biomassa e de hidratos de carbono, tornando a biomassa microalgal mais adequada para a produção de biocombustíveis, visto melhorar propriedades como o número de cetano e o ponto de entupimento do filtro a frio. A capacidade das microalgas de fixar carbono e produzir metabolitos de interesse, como destacado por Tandon e colaboradores (2017) e Sarada e Kobi (2022), pode ser otimizada pela suplementação vitamínica, resultando em biocombustíveis de melhor qualidade e com perfil lipídico mais adequado para aplicações comerciais. Também com a espécie *Tetraselmis chuii* a otimização das concentrações de vitaminas no meio resultou num aumento significativo da biomassa, atingindo 5,72 g/L, aproximadamente 2,4x superior ao controlo sem suplementação (Dammak *et al.*, 2017).

3.1.2.2. Ensaio com suplementação de fósforo

Uma vez que o fósforo (P) é também um elemento fundamental para as microalgas, desempenhando um papel crucial nos processos de transdução de energia (ATP), biossíntese de ácidos nucleicos e na estrutura das membranas celulares (presente nos fosfolípidos, por exemplo), suscitou-se a hipótese de o nível de fósforo ser um possível fator limitante nas formulações experimentais Org e O+B, pelo que se realizou um ensaio com o intuito de avaliar os efeitos que um suplemento de P teria no crescimento de microalgas. Para tal foi selecionada a espécie *Tetraselmis chuii*, na qual a absorção de fósforo é realizada a partir de transportadores de fosfato de alta afinidade, codificados pelo gene *TcPHO* que se encontra presente em *T. chuii* (Chung *et al.*, 2003), sendo posteriormente armazenado através da síntese de compostos de armazenamento, como grânulos de polifosfato, pronto a ser utilizado em situações de escassez (Bossa *et al.*, 2024). *Tetraselmis chuii* tem várias aplicações, de entre elas a produção de biocombustíveis, para a qual a produção de lípidos é importante. Como reportado por Khatoon (2023), *T. chuii* demonstra uma maior necessidade de fósforo de forma a otimizar a produção lipídica.

Assim, e em concordância com a abordagem do ensaio anterior, foi adicionado um suplemento de P aos meios Org e O+B (**Tabela 6**) de modo a ajustar aos níveis presentes no meio GM, estando representadas na **Figura 26A** as curvas de crescimento de *T. chuii* obtidas com os 3 meios nutritivos testados: **GM**, **Org(P)** e **O+B(P)**. É evidente a muito melhor performance do meio GM relativamente aos outros dois meios, todos com igual suplementação em P: o grupo GM alcançou o valor máximo de 3,55±0,54 x10^6 células/mL no dia 5, à semelhança do ensaio anteriormente realizado com esta espécie (**Figura 20A**), decrescendo ligeiramente até final do ensaio onde estabiliza os seus valores de renovação, terminando com uma densidade de 2,82±0,18 x10^6 células/mL; enquanto que os grupos Org(P) e O+B(P), que também atingiram um máximo ao dia 5, decresceram para valores de 0,52±0,01

x10^6 células/mL e 0,69±0,03 x10^6 células/mL, respetivamente, no final do ensaio, valores estes consistentes com os obtidos no primeiro ensaio com esta espécie (**Figura 20A e 20B**).

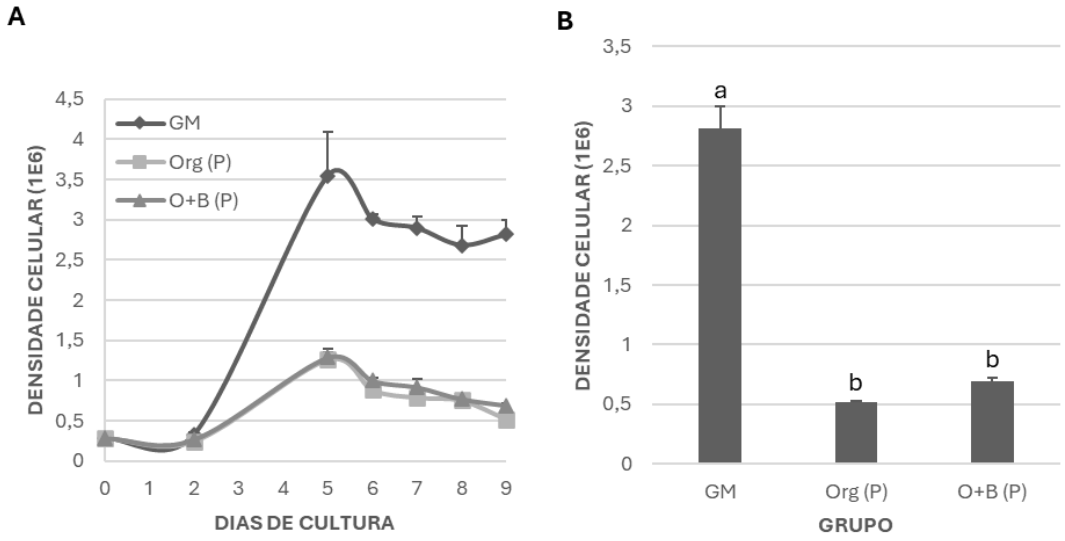

Figura 26 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, Org (P) e O+B (P), ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9° dia), das suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, Org (P) e O+B (P). Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

Embora se tenha procedido à suplementação com P, este ensaio reproduziu, de certo modo, os resultados obtidos no primeiro ensaio com esta espécie e os meios GM, Org e O+B, sendo possível constatar as diferenças (ou ausência delas) encontradas entre os 3 meios aqui testados quer por observação das culturas (**Figura 27**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 26B**), onde podemos verificar que as densidades finais atingidas com Org(P) e O+B(P) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si e são muito inferiores às obtidas com o grupo GM. À semelhança do que se havia discutido para a suplementação vitamínica, esta ausência de resposta parece sugerir que a suplementação em P não é o fator limitante ou, pelo menos, não é o único.

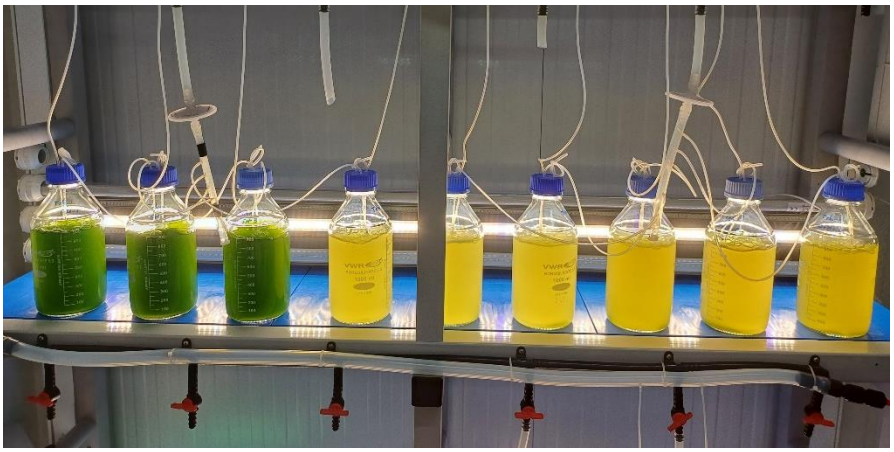

Figura 27 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Tetraselmis chuii* em meio GM, Org (P) e O+B (P). Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de Org (P) e depois O+B (P).

A suplementação de fósforo em culturas de microalgas, particularmente na espécie *Tetraselmis chuii*, tem demonstrado um papel crucial na melhoria do crescimento e na composição bioquímica, podendo alterar a composição dos ácidos gordos nas microalgas, algo que é essencial para a compreensão da ecologia trófica do fitoplâncton. A privação de fosfatos leva a mudanças específicas no perfil de ácidos gordos, que variam entre espécies e podem influenciar a qualidade nutricional da biomassa produzida (Cañavate *et al.*, 2017). Outro processo relevante que ocorre na espécie *Tetraselmis chuii*, apresentado por Solovchenko e colaboradores (2019), é a capacidade desta realizar a chamada "absorção de luxo", na qual as microalgas captam e armazenam fósforo em excesso, permitindo-lhes sobreviver em ambientes com disponibilidades flutuantes de nutrientes. Este mecanismo torna esta espécie ideal para aplicações em biorremediação e recuperação de nutrientes de águas residuais, tal como, a recuperação de fósforo de efluentes (Wang *et al.*, 2023).

Em termos de produção de biomassa e composição bioquímica, a suplementação de fósforo tem demonstrado também melhorar a concentração de clorofilas e carotenóides em culturas de *Tetraselmis sp.* (Dammak *et al.*, 2017). Contudo, níveis excessivos de fósforo podem causar toxicidade, inibindo o crescimento e comprometendo a estrutura celular, como demonstrado com *Chlorella regularis* por Fu e colaboradores (2019). Em sistemas cíclicos de água do mar e águas residuais suplementadas com fósforo, *Chlorella pyrenoidosa* demonstrou uma maior assimilação de azoto e carbono, o que se traduziu num aumento da biomassa obtida, bem como de lípidos e proteínas, com o conteúdo lipídico a atingir 40,1% da biomassa seca (Ma *et al.*, 2024). Outras espécies, como *Scenedesmus* sp. e *Coelastrella terrestris*, a suplementação de fósforo em conjunto com outros nutrientes, como a glucose e bicarbonato de sódio, mostrou aumentar significativamente a produção de biomassa e lípidos, sugerindo que a

interação entre nutrientes é um fator chave para otimizar o crescimento e o rendimento em compostos bioquímicos (Ghosh *et al.*, 2021; Sangela *et al.*, 2022).

Sumariamente, da análise dos resultados obtidos nesta primeira fase foi possível concluir que nem os biofertilizantes testados (Org e O+B) se aproximaram da performance do meio de cultura standard da empresa (GM), nem as hipóteses formuladas, de que o teor de vitaminas e/ou fósforo nos meios de cultura fossem o fator limitante de crescimento das espécies de microalgas podem ser aceites. Na verdade, as vitaminas e fósforo até podem não estar em quantidades suficientes nos meios Org e O+B, mas não serão o único fator limitante, pois resolvida uma limitação poderá a ausência de outro constituinte estar a limitar o crescimento das microalgas nestes meios. Assim, é importante explorar e testar meios de cultura alternativos que incorporem composições nutricionais variadas, com o objetivo de identificar formulações com as quais se poderia potencialmente obter taxas de crescimento mais elevadas e próximas de GM.

3.2. Segunda fase – ensaios com os meios de cultura Bio Grow (BG) e Bio Grow+Bio Bloom (G+BB)

Com base nos resultados anteriores, e como atrás avançado, decidiu-se testar novas formulações com base em diferentes biofertilizantes, sendo assim usados o **meio BG**, que é o biofertilizante **Bio Grow**, e a formulação **G+BB**, que representa uma mistura dos biofertilizantes **Bio Grow e Bio Bloom** (1:1). Estes biofertilizantes foram selecionados com o mesmo racional, ou seja, encontrar alternativas biológicas para o cultivo das microalgas em estudo, avaliando-se a sua performance com base no crescimento celular obtido. De modo análogo à primeira fase, o desempenho destes novos meios de cultura foi comparado com o do meio de eleição da empresa AQUALGAE, **Gold Medium** (**GM**), que atua como grupo controlo em todos os ensaios realizados.

3.2.1. Crescimento de microalgas com meios BG e G+BB

3.2.1.1. *Tisochrysis lutea*

Na **Figura 28A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos agora testados, onde de imediato se destaca o diferente padrão de resposta relativamente à primeira fase, com as curvas dos 3 grupos muito distintas entre si: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 5º dia, 33,67±1,31 x10^6 células/mL, e ao fim de 9 dias de cultura terminou com 23,6±0,84 x10^6 células/mL; com BG atingiu-se um pico ao 3º-5º dias de apenas aproximadamente 5,25 x10^6 células/mL, decrescendo posteriormente para 2,58±0,04 x10^6 células/mL no final do ensaio; com G+BB atingiu-se um máximo ao 5º dia, tal como GM, mas numa densidade

intermédia comparativamente às anteriores, de aproximadamente 15 x10^6 células/mL, mantendo-se mais ou menos estável até ao final dos 9 dias de cultura.

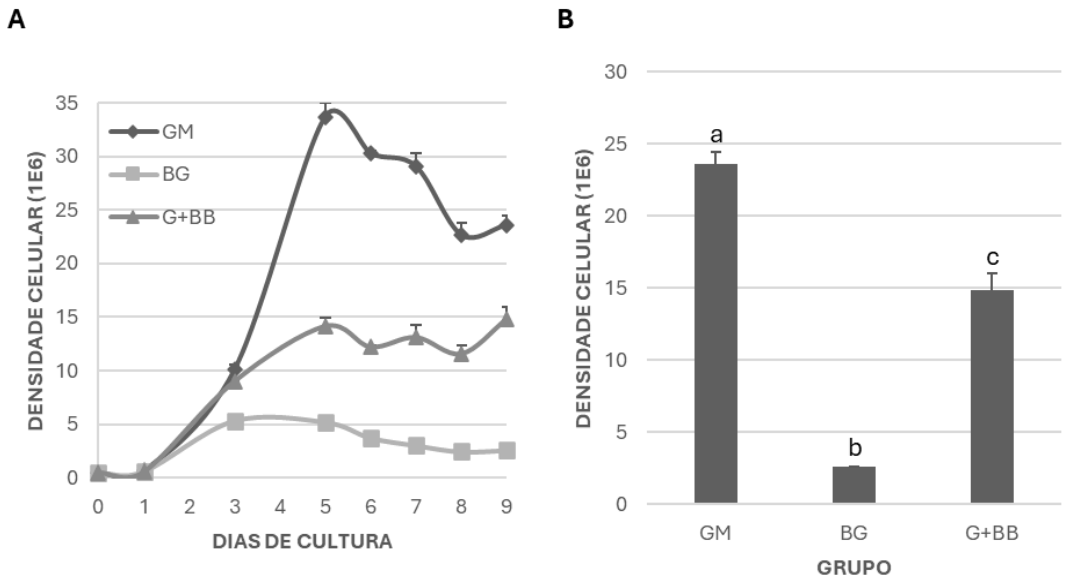

Figura 28 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9° dia), das suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças reportadas anteriormente entre os meios são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 29**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 28B**), onde podemos verificar que existem diferenças significativas entre todos os meios.

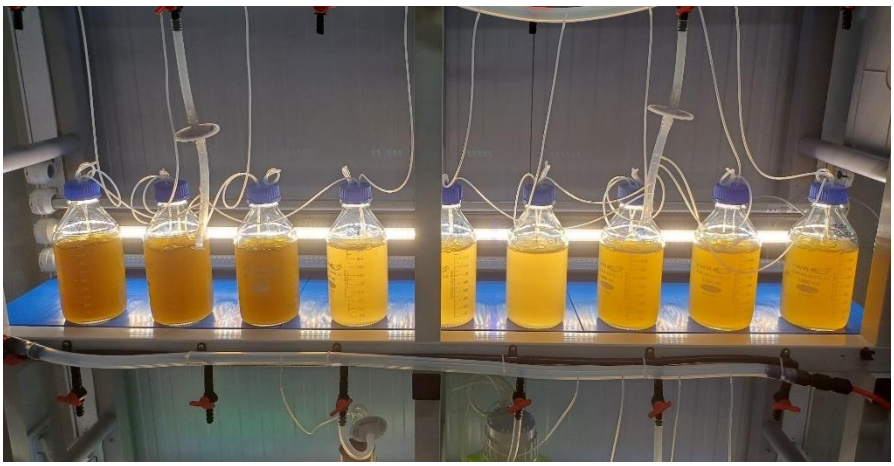

Figura 29 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Tisochrysis lutea* em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB.

O meio BG parece apresentar um resultado ao mesmo nível dos grupos Org e O+B da fase anterior, no entanto, o meio G+BB destacou-se com um valor a aproximar-se do grupo controlo, GM, com cerca de 2/3 da densidade celular obtida com GM.

3.2.1.2. *Phaeodactylum tricornutum*

Na **Figura 30A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os mesmos 3 meios nutritivos em teste, onde se observa um padrão de resposta semelhante ao ensaio anterior (**Figura 28**), com as curvas dos 3 grupos muito distintas entre si: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 5º dia, 34,12±2,62 x10^6 células/mL, e ao fim de 9 dias de cultura terminou com uma densidade de 29,62±1,23 x10^6 células/mL bastante estável; com BG atingiu-se um pico ao 5º dia de apenas 10,24±1,01 x10^6 células/mL, decrescendo posteriormente para cerca de metade do valor (5,21±0,30 x10^6 células/mL) no final do ensaio; com G+BB atingiu-se um máximo ao 5º dia, tal como nos restantes meios, mas numa densidade intermédia comparativamente às anteriores, de 15,26±1,30 x10^6 células/mL, mantendo-se também mais ou menos estável até ao final dos 9 dias de cultura tal como aconteceu com GM.

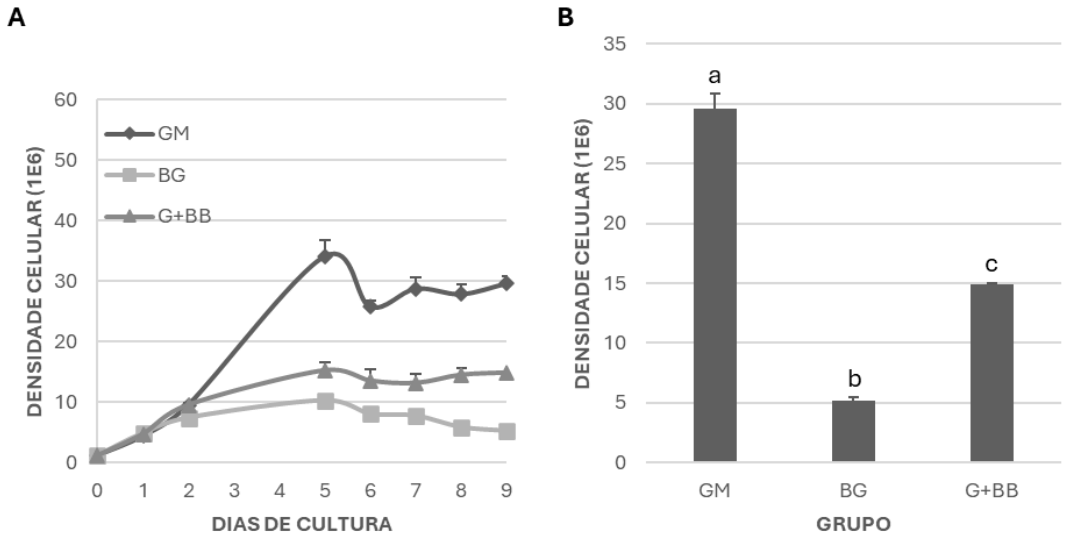

Figura 30 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

As diferenças relatadas anteriormente entre os meios são possíveis de constatar tanto por observação direta das culturas (**Figura 31**), como por via de comparação estatística das densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 30B**), onde podemos verificar que com estes novos meios

existem diferenças significativas entre todos eles, sendo os valores de densidade obtidos com BG e G+BB de 1/6 e 1/2, respetivamente, do valor de GM.



Figura 31 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB.

3.2.1.3. *Chaetoceros calcitrans*

Na **Figura 32A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos em teste, com as curvas dos 3 grupos, novamente, muito distintas entre si: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 5º dia, 9,99±0,34 x10^6 células/mL, decrescendo de modo oscilante até ao fim de 9 dias de cultura, terminando com uma densidade celular de 6,64±0,20 x10^6 células/mL; com BG atingiu-se um pico ao 5º dia de apenas 2,30±0,26 x10^6 células/mL, decrescendo posteriormente para 0,95±0,08 x10^6 células/mL no final do ensaio; com G+BB atingiu-se um máximo ao 5º dia de 3,98±0,03 x10^6 células/mL, decrescendo posteriormente até ao final do ensaio para 2,73±0,23 x10^6 células/mL, resposta que não se tinha observado antes com este meio, para as espécies *Tisochrysis lutea* (**Figura 28**) e *Phaeodactylum tricornutum* (**Figura 30**).

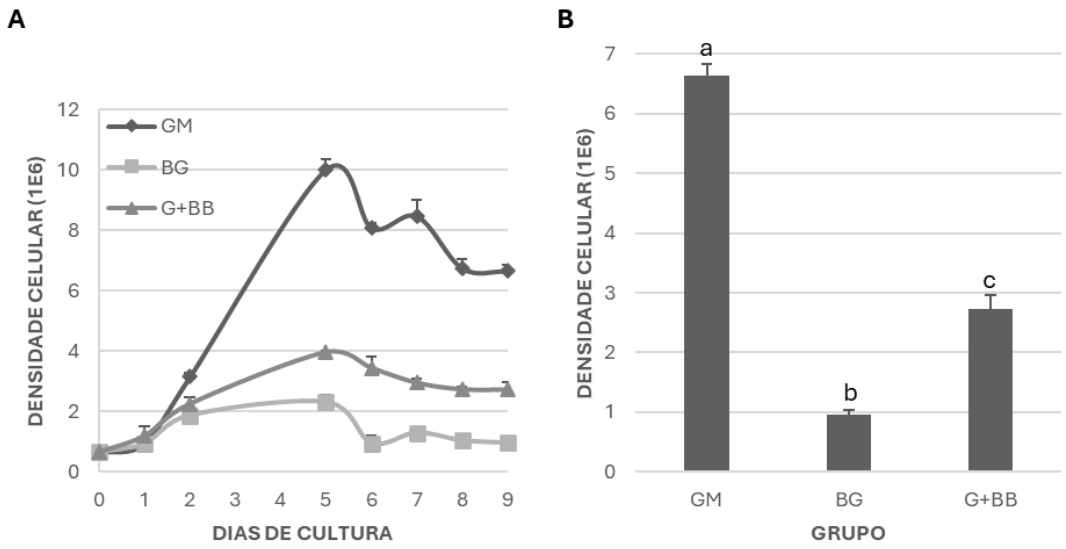

Figura 33 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Chaetoceros calcitrans* nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9° dia), das suspensões de *Chaetoceros calcitrans* nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças referidas entre os meios são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 33**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 32B**), onde podemos verificar que existem diferenças significativas entre todas elas, sendo os valores de densidade obtidos com BG e G+BB de 1/6 e um pouco mais de 1/3 do valor de GM, respetivamente.

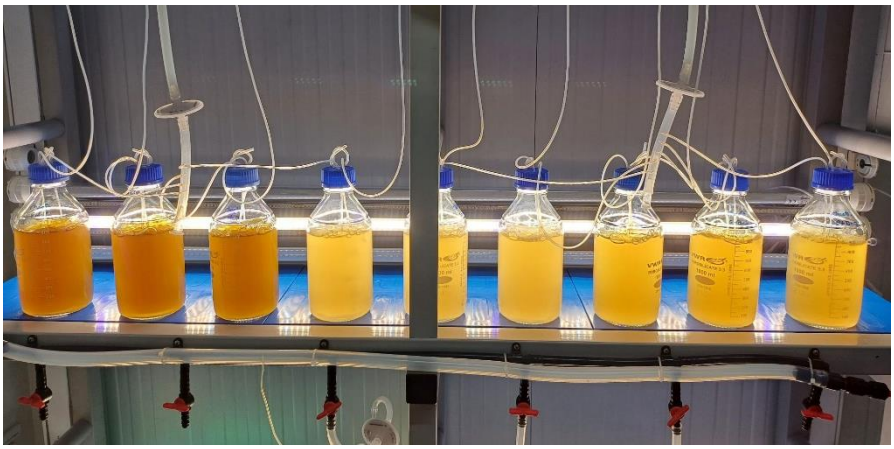

Figura 32 – Nono e último dia de cultura das suspensões *de Chaetoceros calcitrans* em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB.

3.2.1.4. *Tetraselmis chuii*

Na **Figura 34A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos em teste, com as curvas dos 3 grupos, novamente, muito distintas entre si: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 5º dia, 3,41±0,23 x10^6 células/mL, no 7º dia, em semelhança ao ensaio anterior com esta espécie (**Figura 20**) apresentou um segundo pico de 3,31±0,30 x10^6 células/mL, no entanto, apresenta uma boa estabilização e ao fim de 9 dias de cultura terminou com 2,93±0,24 x10^6 células/mL; com BG atingiu-se um pico ao 5º dia de apenas 1,35±0,21 x10^6 células/mL, decrescendo consistentemente até ao final do ensaio para cerca de metade da densidade (0,59±0,06 x10^6 células/mL); com G+BB atingiu-se um máximo de densidade ao 5º dia, de 1,84±0,08 x10^6 células/mL, decrescendo ligeiramente no 6º dia, e depois mantendo-se com um valor estável de cerca de 1,5 x10^6 células/mL até final do ensaio. É de notar que, com as espécies estudadas até ao momento, este meio G+BB foi o único com o qual ou não se observaram decréscimos relevantes após se atingir um pico de densidade celular ou se registou mais ou menos uma manutenção da densidade após esse pico.

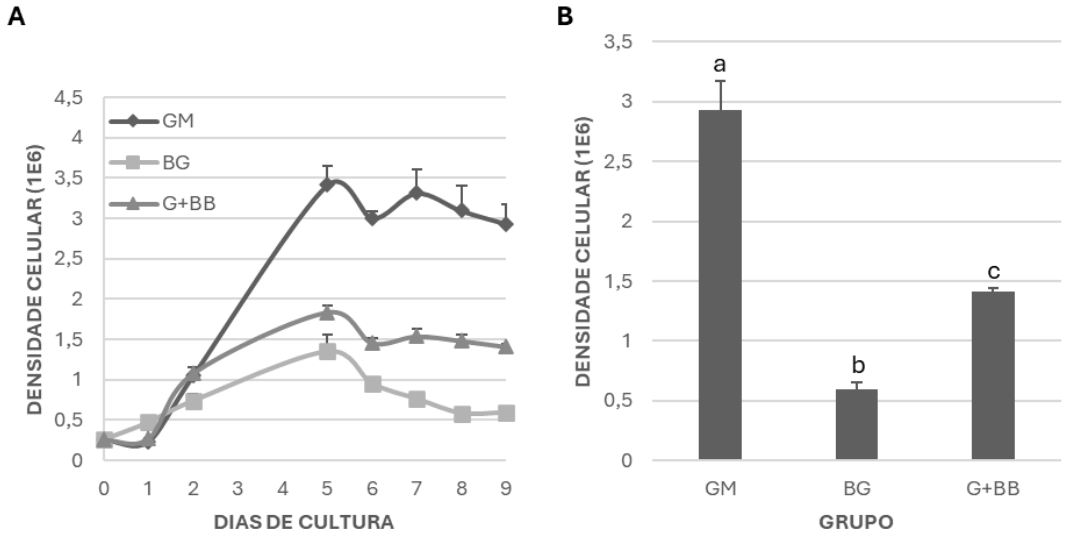

Figura 34 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9º dia), das suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças relatadas anteriormente entre os meios são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 35**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 34B**), onde podemos verificar que existem diferenças

significativas entre todas elas, sendo a diferença de valor do BG e do G+BB para o GM cerca de 1/6 e 1/2, respetivamente.



Figura 35 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Tetraselmis chuii* em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB.

3.2.1.5. *Chlorella vulgaris*

Na **Figura 36A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos testados, revelando o padrão anteriormente registado para as outras espécies: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 5º dia, 94,00±4,68 x10^6 células/mL, decrescendo este para 78,88±8,42 x10^6 células/mL no final do ensaio; com BG atingiu-se um pico ao 5º dia de 44,54±2,26 x10^6 células/mL, decrescendo posteriormente para cerca de metade (19,42±2,71 x10^6 células/mL) no final do ensaio; com G+BB atingiu-se um máximo ao 5º dia, tal como nos restantes grupos, numa densidade intermédia às anteriores, de 64,33±3,77 x10^6 células/mL, e ao fim de 9 dias de cultura esta terminou com um valor mais ou menos estável de 50,04±2,59 x10^6 células/mL.

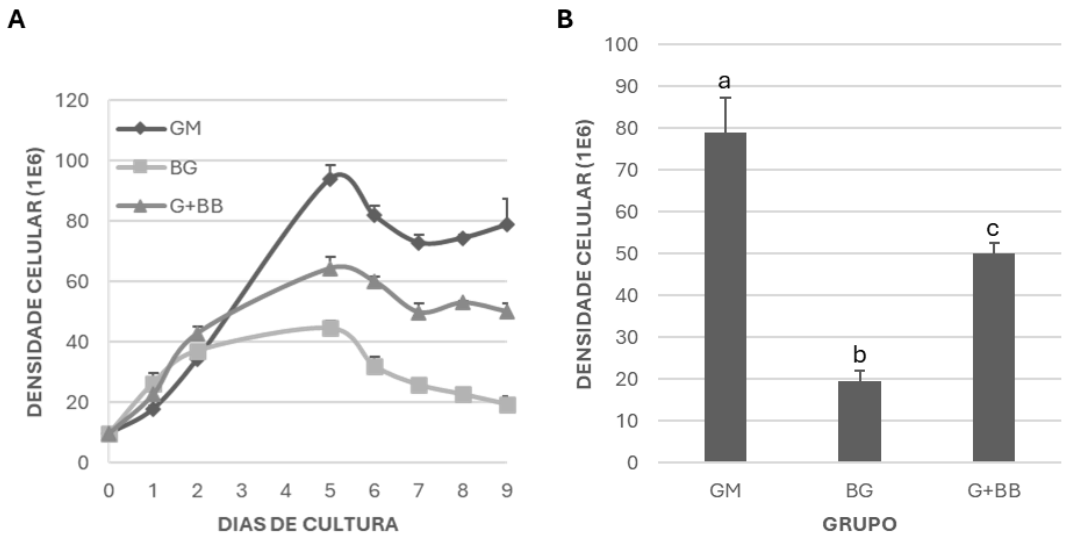

Figura 36 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Chlorella vulgaris* nos meios GM, BG e G+BB, ao longo de 9 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (9° dia), das suspensões de *Chlorella vulgaris* nos meios GM, BG e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças relatadas anteriormente entre os meios são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 37**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 36B**), onde podemos verificar diferenças significativas entre todas elas, sendo o valor com BG e com G+BB cerca de 1/4 e 2/3 do de GM, respetivamente. Embora com esta espécie se tenha observado um decréscimo um pouco mais acentuado com meio G+BB comparativamente ao que se tinha registado para as espécies anteriores, foi também aquele que susteve maiores densidades celulares no final do ensaio, mais próximas das sustentadas por GM, tal como se tinha observado com *Tisochrysis lutea* (**Figura 28**).

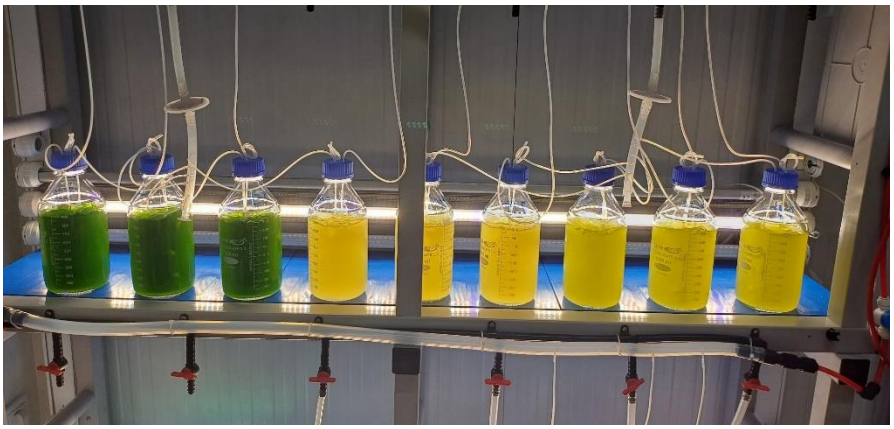

Figura 37 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Chlorella vulgaris* em meio GM, BG e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BG e depois G+BB.

Globalmente, estes resultados da segunda fase evidenciaram que, independentemente da espécie, o meio BG, constituído apenas pelo fertilizante Bio Grow, não demonstrou resultados satisfatórios, sustentando valores de densidade celular cerca de 1/4 a 1/10 dos obtidos com GM, dependendo da espécie, enquanto que o grupo **G+BB**, constituído por BG e BB (1:1), deu consistentemente resultados mais satisfatórios, geralmente intermédios entre BG e GM. Isto suscitou avaliar-se a performance do biofertilizante Bio Bloom (**BB**) isoladamente.

3.2.2. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* com os meios GM, Bio Bloom (BB) e G+BB

Este ensaio realizou-se com a espécie *Phaeodactylum tricornutum* mantendo o procedimento dos ensaios anteriores. Na **Figura 39A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas com os 3 meios nutritivos agora testados – GM, BB e G+BB -, sendo imediatamente notável uma mudança de panorama relativamente aos ensaios anteriores onde se observava uma enorme diferença entre GM e os grupos experimentais. Importa aqui referir que as suspensões desta espécie crescidas em BG, GM e G+BB do último ensaio foram reaproveitadas para a execução deste ensaio, em que, a partir de renovações com o meio BB, o antigo grupo BG passou ao atual grupo BB, sendo que a cada renovação diária a concentração de BB no meio foi aumentando. É devido a esta transição entre ensaios que não se observou uma fase lag nas curvas de crescimento (**Figura 39A**). Pela análise desta figura pode verificar-se que GM obteve o valor máximo de 51,43±3,83 x10^6 células/mL, no dia 3, decrescendo até ao 5º dia, mantendo-se depois estável até ao final com uma densidade de cerca de 32 x10^6 células/mL; enquanto BB converge com G+BB ao 5º dia, mantendo-se estáveis até ao final do ensaio com valores próximos entre si, terminando com densidades de 17,61±1,44 x10^6 células/mL e 18,36±2,00 x10^6 células/mL, respetivamente. Ainda assim, é possível observar qua o grupo G+BB sustentou densidades mais elevadas que o grupo BB até ao 4º dia.

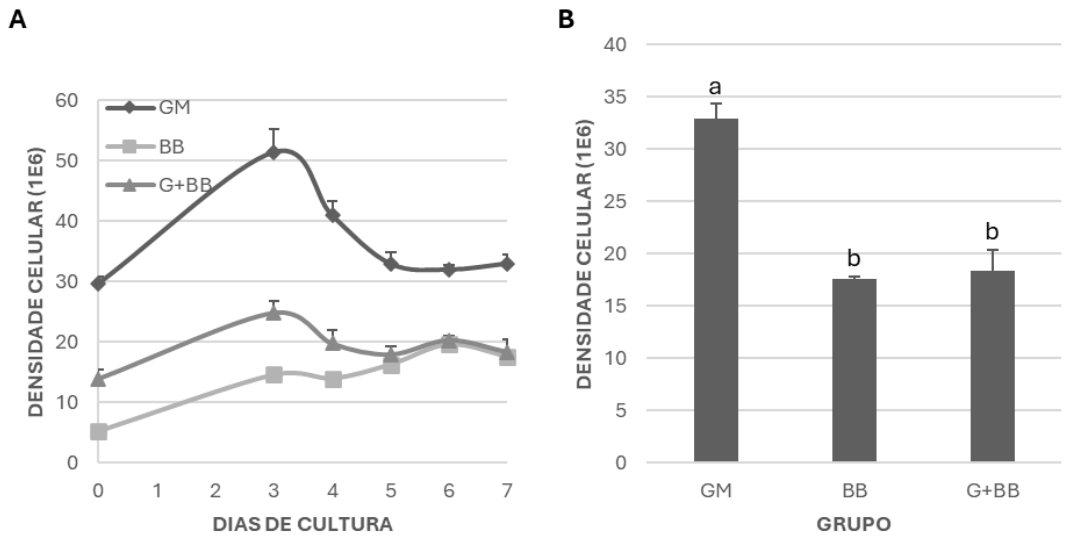

Figura 38 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, BB e G+BB, ao longo de 7 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (7° dia), das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, BB e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferentes dinâmicas mencionadas anteriormente são possíveis de constatar pela observação das culturas (**Figura 40**), e pela análise estatística realizada no final do ensaio (**Figura 39B**), onde podemos verificar que não existem diferenças significativas entre BB e G+BB, contudo, as densidades celulares sustentadas por estes meios é agora apenas metade das obtidas com GM.



Figura 39 – Nono e último dia de cultura das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* em meio GM, BB e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de BB e depois G+BB.

Os resultados deste ensaio permitem retirar algumas conclusões. Se o uso do biofertilizante Bio Grow (BG) isoladamente - o mais limitado em nutrientes - era o que resultava em crescimentos mais baixos para todas as espécies estudadas, agora, em combinação com o Bio Bloom (G+BB), também não

se verificaram diferenças assinaláveis relativamente a BB, o que também reforçou a hipótese de que o maior crescimento celular observado com G+BB nos ensaios anteriores com as várias espécies, se deveu à presença do Bio Bloom (BB). Contudo, é igualmente possível perceber que Bio Bloom (BB) também apresenta limitações ao crescimento, não se destacando do grupo G+BB, e ficando aquém da performance de GM. Mais ainda, o facto dos grupos G+BB e BB terem resultados semelhantes sedimenta a hipótese de que deverá existir uma deficiência (ou ausência) em algum nutriente vital para o desenvolvimento das microalgas, na medida que ao dobrar a concentração de biofertilizante BB (relativamente à combinação G+BB) não se traduziu num aumento de massa, reforçando a ideia expressa na teoria LLM de que um constituinte possivelmente em falta nestes meios nutritivos biológicos testados, não permite alcançar maiores níveis de crescimento celular.

Conjuntamente com os resultados obtidos na primeira fase de ensaios, os agora obtidos nesta segunda fase, mostram de forma clara a superioridade do meio G+BB relativamente aos restantes meios experimentais testados (Org, O+B, Org+Vit, Org (P), O+B (P) e BG). Embora não tenha igualado a performance do meio GM, a formulação G+BB superou os resultados previsíveis pela combinação de BG e BB (já que nesta combinação, BB está em metade da dose), sendo também muito superiores aos grupos experimentais na primeira fase (Org e O+B). Estes resultados são promissores e poderão servir como ponto de partida para futuros trabalhos com o intuito de otimizar esta combinação ou pensar em outras. No entanto, para consolidar os resultados obtidos com o meio G+BB e confrontar com outros meios conhecidos foi delineada uma última fase de ensaios testando, ainda, um meio de cultura sintético bastante documentado na literatura de cultivo de microalgas: o meio f/2 ou de Guillard (Guillard & Ryther, 1962).

3.3. Terceira fase – ensaios com os meios de cultura Bio Grow+Bio Bloom e meio de Guillard f/2 (f/2)

Conforme referido anteriormente, de entre os meios testados, o **meio G+BB** demonstrou ser a opção mais promissora para o cultivo biológico das várias espécies utilizadas, uma descoberta que moldou a última fase de ensaios do trabalho. A fim de melhor compreender a aplicabilidade deste meio, e onde se encontra, em termos de performance, no quadro geral do cultivo de microalgas, planeou-se uma série de ensaios com o intuito de comparar diretamente o meio G+BB com o **meio f/2**, muito utilizado nesta área de estudo e também com ampla utilização na indústria, de forma a obter mais uma referência contra a qual o desempenho do meio G+BB poderá ser avaliado, bem como o meio GM. Em contraste com fases anteriores, neste conjunto de ensaios não foi incluída a espécie *Chlorella vulgaris* devido às limitações do meio f/2 para cultivo de espécies de água doce.

3.3.1. *Tisochrysis lutea*

Na **Figura 40A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos agora testados, onde surge um padrão semelhante ao da segunda fase, com as curvas dos 3 grupos muito distintas entre si: com GM obteve-se o valor máximo de densidade no 6º dia, 33,23±1,72 x10^6 células/mL, estabilizando-se apesar de ao fim de 10 dias de cultura terminar com 29,43±1,95 x10^6 células/mL; com f/2 atingiu-se o valor de estabilização ao 6º dia, sendo uma densidade intermédia comparativamente às anteriores, de aproximadamente 18 x10^6 células/mL, mantendo-se mais ou menos estável até ao final dos 10 dias de cultura, onde obteve-se uma densidade de 17,90±0,47 x10^6 células/mL; com G+BB atingiu-se o máximo de densidade ao 3º-5º dias de aproximadamente 10,5 x10^6 células/mL, mantendo-se estável até ao final do ensaio onde se obteve uma densidade de 9,48±0,56 x10^6 células/mL.

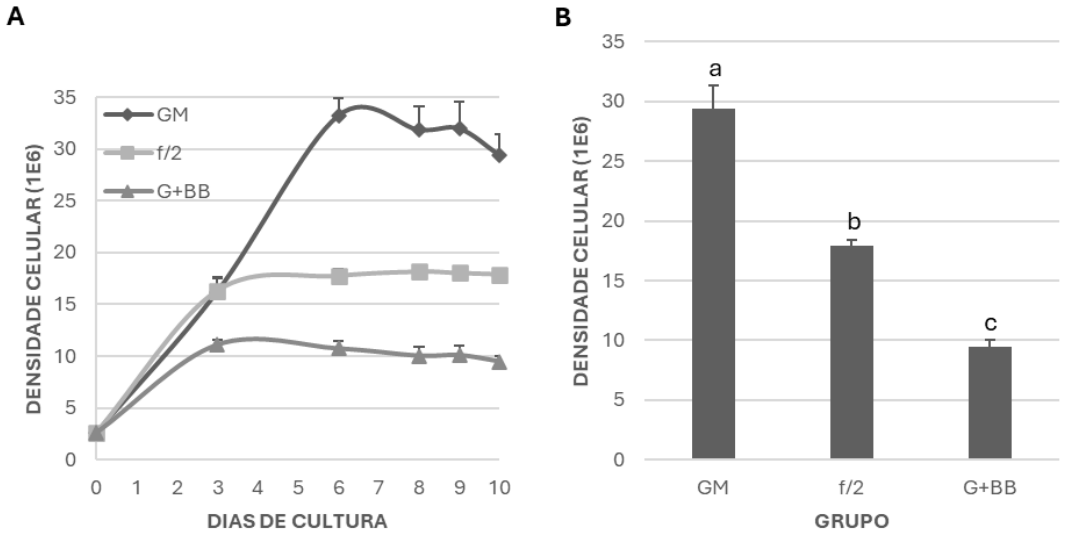

Figura 40 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10º dia), das suspensões de *Tisochrysis lutea* nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças mencionadas anteriormente entre os meios são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 41**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 40B**), onde se pode verificar diferenças estatisticamente significativas entre todos eles, sendo o grupo G+BB aquele que apresentou menor densidade celular. sendo a diferença de valor do G+BB e do f/2 para o GM cerca de 1/3 e 1/2, respetivamente.

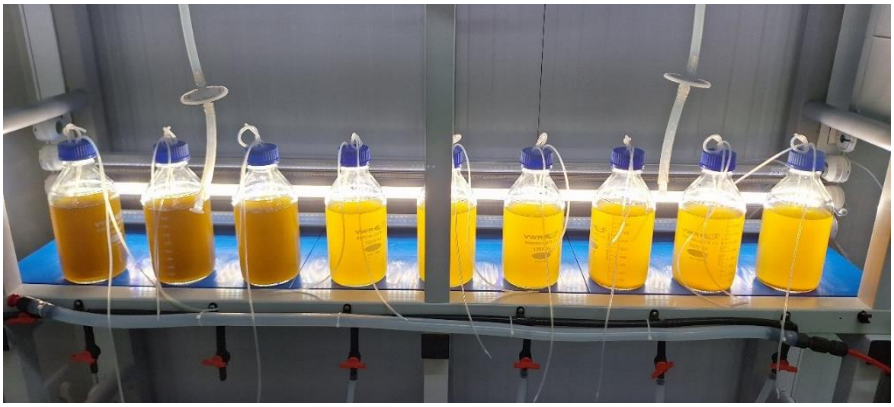

Figura 41 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de *Tisochrysis lutea* em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB.

3.3.2. *Phaeodactylum tricornutum*

Na **Figura 42A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos testados, sendo novamente evidente a diferença de crescimento celular entre eles: com GM obteve-se o valor máximo de densidade ao 6º dia, 38,00±2,84 x10^6 células/mL, decrescendo posteriormente até 27,97±1,27 x10^6 células/mL no final do ensaio; com f/2 também se observou um pico ao 6º dia, com uma densidade de 27,21±2,33 x10^6 células/mL, e um decréscimo ligeiro até 21,60±0,43 x10^6 células/mL ao fim de 10 dias de cultura; e, por fim, com o G+BB obteve-se um valor máximo de cerca de 14 x10^6 células/mL também ao 6º dia, mantendo-se mais ou menos estável até ao final do ensaio.

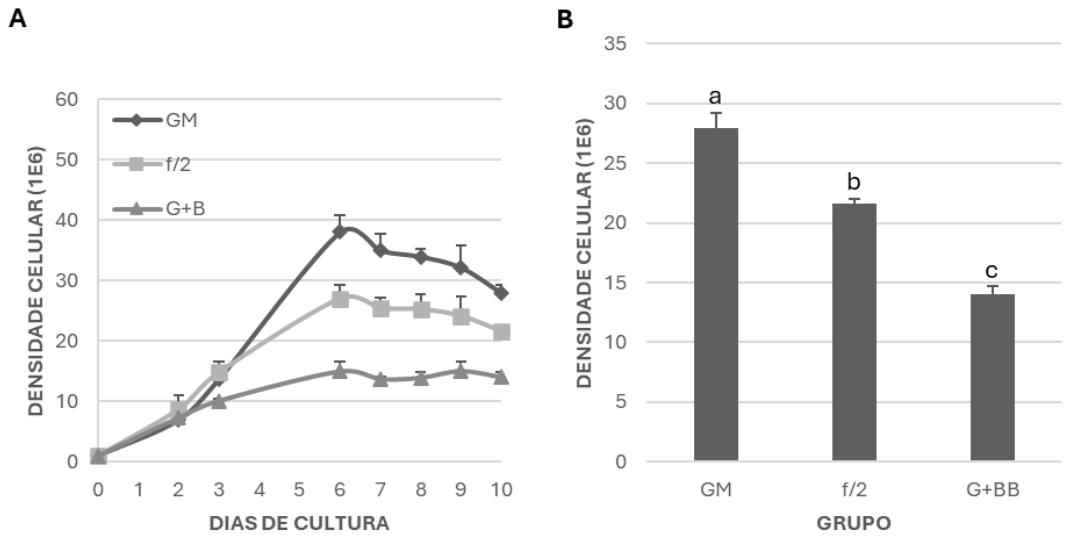

Figura 42 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10º dia), das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

Estas diferenças entre os meios no final do ensaio são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 43**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 42B**), onde podemos verificar diferenças estatisticamente significativas entre todos eles.

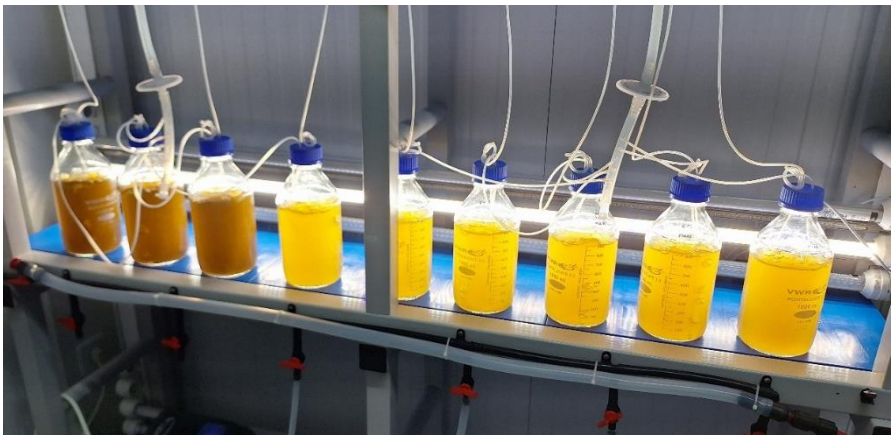

Figura 43 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de *Phaeodactylum tricornutum* em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB.

3.3.3. *Chaetoceros calcitrans*

Na **Figura 44A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos agora testados, sendo evidente o padrão que tem sido obtido relativamente ao crescimento celular, nomeadamente, na relação entre eles e no pico de densidade registado ao 6º dia: com GM obteve-se o valor máximo de densidade de 9,98±0,22 x10^6 células/mL, decrescendo até 5,80±0,42 x10^6 células/mL no final do ensaio; seguido de f/2 onde se observou um pico ao 6º dia de 5,68±0,23 x10^6 células/mL, tendo decrescido até ao dia final do ensaio com uma densidade de 4,91±0,08 x10^6 células/mL; e, por fim, o grupo G+BB, com um decréscimo acentuado de 4,58±0,76 x10^6 células/mL no 6º dia até 2,03±0,10 x10^6 células/mL ao fim dos 10 dias de cultura.

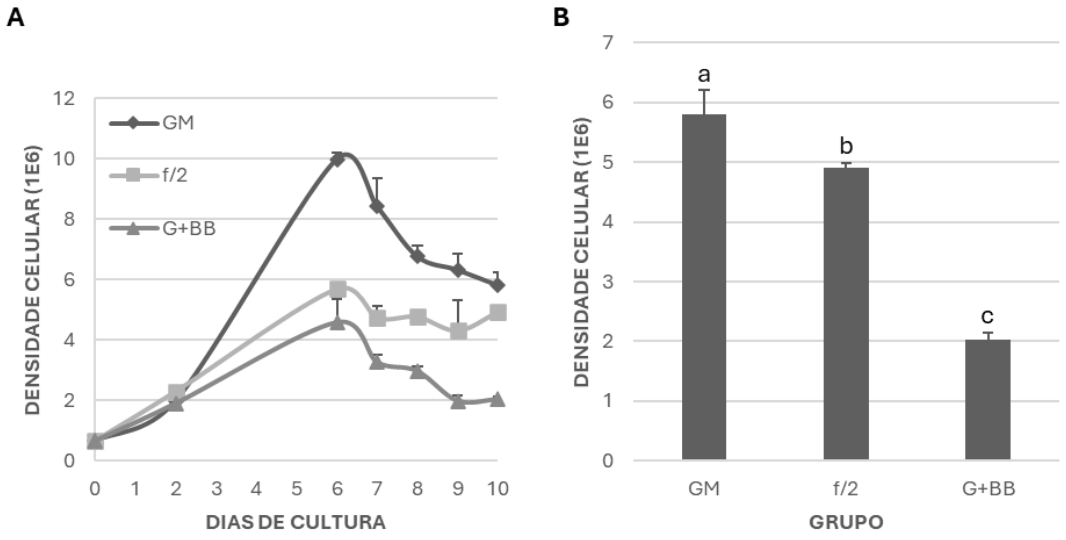

Figura 44 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Chaetoceros calcitrans* nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10º dia), das suspensões de *Chaetoceros calcitrans* nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças entre os meios no final do ensaio são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 45**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 44B**), onde podemos verificar mais uma vez que as são todas estatisticamente diferentes entre si.



Figura 45 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de *Chaetoceros calcitrans* em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB.

3.3.4. *Tetraselmis chuii*

Finalmente, na **Figura 46A** encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas para esta espécie com os 3 meios nutritivos testados, com as curvas dos 3 grupos muito distintas entre si, em semelhança aos restantes ensaios desta terceira fase: com GM obteve-se o máximo de densidade ao 6º dia, a partir do qual o valor se estabilizou com aproximadamente 3,00 x10^6 células/mL, no entanto, no último dia registou-se uma queda na densidade para 2,48±0,05 x10^6 células/mL; com de f/2 obteve-se valores mais ou menos estáveis após o 6º dia, terminando com uma densidade celular estável de 1,70±0,17 x10^6 células/mL no final do ensaio; e, por fim, o grupo G+BB com os valores mais baixos, manteve uma densidade de cerca de 1 x10^6 células/mL do 3º dia até final do ensaio.

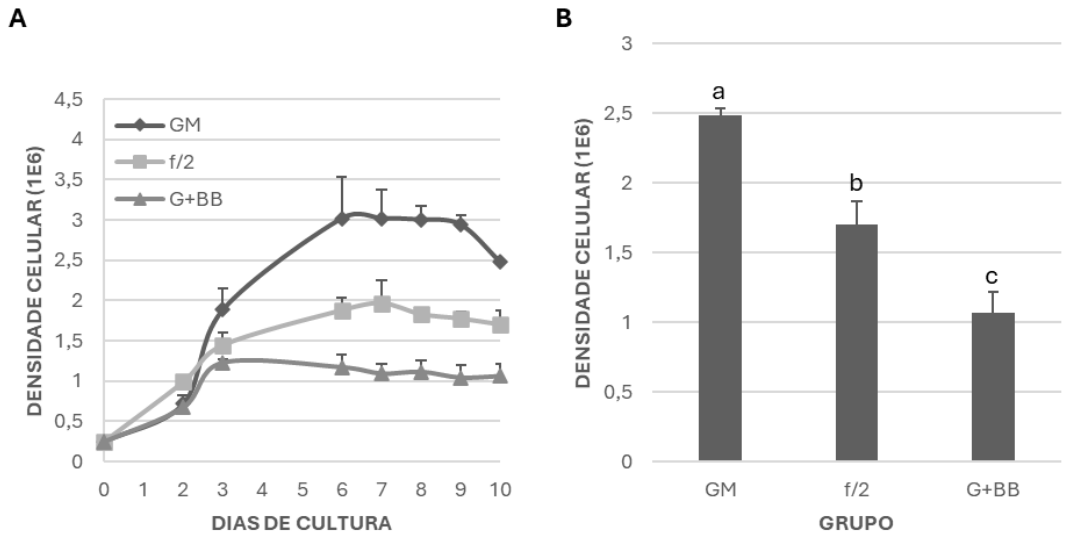

Figura 46 – A: Curvas de crescimento de suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, f/2 e G+BB, ao longo de 10 dias. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro e +1 desvio-padrão (DP); **B:** Densidades celulares atingidas no final do ensaio (10° dia), das suspensões de *Tetraselmis chuii* nos meios GM, f/2 e G+BB. Os valores representam médias de 3 réplicas e a barra de erro +1 desvio-padrão (DP). As letras sobre as colunas representam o resultado da análise estatística (1-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey), em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p> 0,05).

As diferenças os meios no final do ensaio são possíveis de constatar quer por observação direta das culturas (**Figura 47**), quer comparando estatisticamente as densidades das suspensões no final do ensaio (**Figura 46B**), onde podemos verificar que são todas estatisticamente diferentes entre si.



Figura 47 – Décimo e último dia de cultura das suspensões de *Tetraselmis chuii* em meio GM, f/2 e G+BB. Da esquerda para a direita podem ver-se os frascos triplicados de GM, seguido de f/2 e depois G+BB.

Como mencionado anteriormente, esta última fase do trabalho teve como objetivo comparar o desempenho do meio G+BB, formulado com biofertilizantes, com o meio f/2, um meio padrão amplamente utilizado no cultivo de microalgas. Os resultados obtidos demonstraram que, embora o meio

GM continue a ser a opção com melhores performances para o cultivo das microalgas estudadas, o meio f/2 apresentou sempre um desempenho superior ao meio G+BB em todas estas espécies. Em geral, como o meio G+BB apresentou um crescimento significativamente inferior ao meio f/2, levanta-se a hipótese de que a composição em nutrientes de G+BB não seja adequada ou, pelo menos, equilibrada, possivelmente devido à deficiência em micronutrientes essenciais. Esta hipótese é apoiada por diversos estudos que evidenciam a importância de uma formulação de meio nutricional equilibrada para o crescimento ótimo das microalgas.

Seguindo esta nota, e focando a atenção para a importância dos micronutrientes no crescimento de microalgas, a partir da literatura destaca-se que a presença de micronutrientes específicos pode ter um impacto significativo não só no crescimento como também na composição bioquímica das microalgas (Song *et al.*, 2012). Elementos como ferro, manganês, molibdénio e níquel são essenciais para várias vias metabólicas nas microalgas, promovendo desde o crescimento até a síntese de compostos valiosos. Por exemplo, o selénio, quando adicionado ao meio de cultura, pode levar à produção de compostos bioativos como a selenometionina que é importante para a saúde humana e tem sido investigado o seu efeito na fortificação de espécies como *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* (Zdziebłowska *et al.*, 2024). Outros estudos mostram que otimizar as concentrações de micronutrientes dos meios de cultivo pode melhorar significativamente a produtividade de microalgas. Em particular, *Botryococcus braunii* apresentou um aumento de 34,5% na biomassa e de 27,4% no conteúdo de hidratos de carbono sob condições otimizadas de micronutrientes, como ferro e molibdénio (Song *et al.*, 2012). Além disso, a interação entre microalgas e bactérias tem sido relatada como importante na disponibilização de micronutrientes por estas últimas. Microalgas auxotróficas podem depender de metabolitos extracelulares produzidos por bactérias para ativar vias metabólicas dependentes de micronutrientes, o que pode aumentar o crescimento e a síntese de nutrientes nas culturas em laboratório (Makaranga e Jutur, 2022).

A ausência ou concentração insuficiente de micronutrientes no meio G+BB, possivelmente devido a uma deficiência na sua composição, pode ter limitado o desenvolvimento das microalgas e resultado em menor produtividade, em contraste com o melhor desempenho dos meios sintéticos, como os meios f/2 e GM. O meio f/2 é amplamente utilizado devido à sua composição equilibrada de macro e micronutrientes, o que contribui para o crescimento otimizado de microalgas. Estudos mostram que ajustando os níveis de nutrientes com nitrato de sódio (para ajustar N), fosfato de potássio e sulfato de ferro (II), foi possível duplicar a biomassa e o conteúdo lipídico em culturas de microalgas (Suastes-Rivas *et al.*, 2020). No entanto, é importante realçar que o meio G+BB, composto por ingredientes 100%

biológicos, foi concebido com o objetivo de explorar alternativas biológicas para a produção de microalgas, e representa um avanço significativo em direção ao desenvolvimento de meios de cultura mais sustentáveis.

Isto abre espaço para a discussão sobre o uso de fontes de nutrientes derivadas de resíduos, como cinzas de biomassa, urina nitrificada e compostos de digestão anaeróbica. Tais fontes de nutrientes foram exploradas como alternativas sustentáveis e de baixo custo para substituir meios comerciais, por exemplo, a urina nitrificada, rica em nitrato, quando suplementada com fósforo, magnésio e ferro, mostrou-se comparável ao meio Zarrouk modificado em termos de produção de biomassa com a espécie *Limnospira indica* (Paepe *et al.*, 2023). Outro ponto que merece consideração é a exploração de fontes alternativas de nutrientes, como resíduos agrícolas e industriais. Estudos demonstraram que extratos de cinzas de folhas de bananeira e cinzas de biomassa de óleo de palma podem fornecer nutrientes adequados para o cultivo de microalgas, mostrando resultados de crescimento semelhantes aos meios tradicionais (Khatun *et al.*, 2020; Tessari *et al.*, 2022), o que sugere que a otimização destes meios biológicos pode se revelar como uma alternativa viável a meios sintéticos. A sustentabilidade é também um fator crucial na escolha de meios de cultura, especialmente nas produções industriais de larga escala. A reutilização de meios de cultura tem mostrado ser uma abordagem eficaz para redução de custos e otimização de recursos, estratégias para a reutilização de meios incluem a filtração e esterilização de resíduos urbanos, o que pode manter ou até aumentar a produção de biomassa (Souza *et al.*, 2023).

Apesar de o meio G+BB não ter superado o meio f/2 em termos de desempenho, é possível que ajustes na sua composição de micronutrientes, com base em otimizações semelhantes às descritas na literatura, possam resultar numa melhoria da sua eficácia. Em particular, a suplementação com micronutrientes, como ferro, manganês, zinco, cobre, molibdénio, entre outros, os quais são importantes para a síntese de compostos bioativos e para o crescimento celular, poderá aumentar o rendimento do meio G+BB. Deste modo, e atingindo os nossos principais objetivos, seria possível obter um meio de cultura totalmente biológico com desempenho comparável ao meio f/2, o que seria um contributo inestimável para se aplicarem processos e soluções ambientalmente mais sustentáveis, responsáveis e igualmente eficazes.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Após a realização dos vários ensaios com diferentes formulações de biofertilizantes existentes no mercado, não foi possível identificar uma combinação que igualasse o meio de cultura Gold Medium (GM), comercializado rotineiramente pela empresa AQUALGAE. No entanto, o meio GM supera igualmente outros meios clássicos como o f/2 e o Walne. Com o estudo realizado para tentar identificar fatores limitantes nos meios de cultura – vitaminas biotina (B7), tiamina (B1), cobalamina (B12) no biofertilizante Orgatrex (Org) e a quantidade de fósforo no biofertilizante Org e na formulação Orgatrex+Bionova (O+B) – também não foi possível associar as supostas carências daquelas formulações a um défice nesses nutrientes. No entanto, globalmente, os resultados demonstraram que o biofertilizante Bio Bloom (BB) deu origem a resultados satisfatórios que permitem cultivar microalgas de forma sustentada, e com potencial para prosseguir com mais estudos. O grupo experimental Bio Grow+Bio Bloom (G+BB) conseguiu aproximar-se dos resultados obtidos com o meio f/2 (Guillard & Ryther, 1962), um meio sintético comercial tradicionalmente usado para cultivo de microalgas, o que demonstra a possibilidade real de usar biofertilizantes 100% biológicos na produção de microalgas. Embora esta última ainda exija otimizações, esta representa uma alternativa promissora para o desenvolvimento de meios 100% biológicos. Com uma formulação de meio biológico optimizada, seria possível avançar para ensaios em maior escala, passando para testes à escala piloto e, posteriormente, para biorreatores de escala industrial.

Como perspetiva futura de novos estudos e testes, seria importante fazer uma análise da composição química das formulações mais promissoras para tentar identificar possíveis fatores limitantes e, assim, poder, através da adição de suplementos, ajustar-se e/ou corrigir-se as deficiências do meio G+BB, em particular. De modo a abrir o leque de potenciais suplementos de origem biológica que pudessem ser adicionados para complementar/corrigir biofertilizantes, uma investigação focada na identificação de novas fontes, nomeadamente, de desperdícios orgânicos, seria também uma linha a prosseguir. Mais ainda, e porque diferentes espécies de microalgas têm requisitos nutricionais distintos, seria relevante aprofundar estudos direcionados para cada espécie, não apenas na produção de biomassa, mas também na produção de compostos de interesse, tais como pigmentos, lípidos, antioxidantes e vitaminas, que, como referidos durante este trabalho, são de muito valor para outras indústrias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aigner, S., Glaser, K., Arc, E., Holzinger, A., Schletter, M., Karsten, U., & Kranner, I. (2020). Adaptation to Aquatic and Terrestrial Environments in *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*). *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585836

Akgül, F. (2019). Effects of nitrogen concentration on growth, biomass, and biochemical composition of *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *50*(1), 98–105. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697884

Almutairi, A. W. (2020). Improvement of Chemical Composition of *Tisochrysis lutea* Grown Mixotrophically under Nitrogen Depletion towards Biodiesel Production. *Molecules*, 25(20), 4609. https://doi.org/10.3390/molecules25204609

Asenjo, J. A., & Merchuk, J. C. (1994). Design of a Bioreactor System: Overview. Em Asenjo, J. A., & Merchuk, J. C. (Eds) *Bioreactor System Design* (pp. 1–12). CRC Press.

Ayatollahi, S. Z., Esmaeilzadeh, F., & Mowla, D. (2020). Integrated CO2 capture, nutrients removal and biodiesel production using Chlorella vulgaris. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(2), 104763. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104763

Bai, D. M., Saravana, S. K. (2022). Evaluation and quantitative analysis of bioactive compounds from chaetocerous calcitrans against human pathogens. *International journal of advanced research, 10*(06):309-321. doi: 10.21474/ijar01/14890

Barboza-Rodríguez, R., Rodríguez-Jasso, R. M., Rosero-Chasoy, G., Aguado, M. L. R., & Ruiz, H. A. (2024). Photobioreactor configurations in cultivating microalgae biomass for biorefinery. *Bioresource Technology, 394*, 130208. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130208

Bastos, C. R. V., Maia, I. B., Pereira, H., Navalho, J., & Varela, J. C. S. (2022). Optimisation of Biomass Production and Nutritional Value of Two Marine Diatoms (*Bacillariophyceae*), *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros calcitrans*. *Biology*, *11*(4), 594. https://doi.org/10.3390/biology11040594

Becker, E. W. (2004). Microalgae for Aquaculture: The Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture. Em Richmond, A. (Ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (p. 380-391). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch21

Bernaerts, T. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances, 37*(8), 107419. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419

Bischoff, H. W. & Bold, H. C. (1963). Phycological Studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Univ. Texas Publ., 6318*: 195.

Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., & Watanabe, F. (2020). Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health. *Nutrients*, *12*(9), 2524. https://doi.org/10.3390/nu12092524

Bold, H. C. (1949). The morphology of Chlamydomonas *chlamydogama sp*. nov. Bull. *Torrey Bot. Club., 76*: 101-108.

Bossa, R., Di Colandrea, M., Salbitani, G., & Carfagna, S. (2024). Phosphorous utilization in microalgae: physiological aspects and applied implications. *Plants*, *13*(15), 2127. https://doi.org/10.3390/plants13152127

Buhani, N., Istikomah, N., Suharso, N., Sumadi, N., Sutarto, N., Alghamdi, H. M., & Elwakeel, K. Z. (2023). Cationic Surfactant-Modified *Tetraselmis sp.* for the Removal of Organic Dyes from Aqueous Solution. *Molecules*, *28*(23), 7839. https://doi.org/10.3390/molecules28237839

Cañavate, J. P., Armada, I., & Hachero-Cruzado, I. (2017). Common and Species-Specific effects of phosphate on marine microalgae fatty acids shape their function in phytoplankton trophic ecology. *Microbial Ecology*, 74(3), 623–639. https://doi.org/10.1007/s00248-017-0983-1

Carrier, G., Berthelier, J., Maupetit, A., Nicolau, E., Marbouty, M., Schreiber, N., Charrier, A., Carcopino, C., Leroi, L., & Saint-Jean, B. (2023). Genetic and phenotypic intra-species diversity of alga *Tisochrysis lutea* reveals original genetic structure and domestication potential. *European Journal of Phycology*, *59*(1), 94–111. https://doi.org/10.1080/09670262.2023.2249073

Castro, I. M. P., Rosa, A., Borges, A., Cunha, F., & Passos, F. (2024). The effects of microalgae use as a biofertilizer on soil and plant before and after its anaerobic (co-)digestion with food waste. *The Science of the Total Environment*, *934*, 173301. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173301

Catarina, A., & Xavier, F. (2012). Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. InTech. doi: 10.5772/30576

Chung, C., Hwang, S. L., & Chang, J. (2003). Identification of a High-Affinity Phosphate Transporter Gene in a *Prasinophyte* Alga, *Tetraselmis chui*, and Its Expression under Nutrient Limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(2), 754–759. https://doi.org/10.1128/aem.69.2.754-759.2003

Cole, J., & Prairie, Y. (2014). Dissolved CO2 in freshwater systems☆. In Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, 2014. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.09399-4

Colusse, G. A., Mendes, C. R. B., Duarte, M. E. R., De Carvalho, J. C., & Noseda, M. D. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports, 27*, e00508. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00508

Cooper, M. B., Kazamia, E., Helliwell, K. E., Kudahl, U. J., Sayer, A., Wheeler, G. L., & Smith, A. G. (2018). Cross-exchange of B-vitamins underpins a mutualistic interaction between *Ostreococcus tauri* and *Dinoroseobacter shibae*. *The ISME Journal, 13*(2), 334–345. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0274-y

Coronado-Reyes, J. A., & González-Hernández, J. C. (2023). Vitamins from microalgae. Em E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz, M. M. Maroneze e L. Q. Zepka. (Eds.), *Handbook of Food and Feed from MicroalgaeProduction, Application, Regulation, and Sustainability* (pp. 111–115). https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99196-4.00026-7

Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Santos, T. D., Mitchell, B. G., & Morais, M. G. (2019). Open pond systems for microalgal culture. Em Pandey, A., Chang, J., Soccol, C. R., Lee, D., Chisti, Y. (eds) *Biofuels from Algae* (pp. 199–223). https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00009-3

Croft, M., Lawrence, A., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature, 438*, 90–93. https://doi.org/10.1038/nature04056

Daintith, J. (2008). A Dictionary of Chemistry (6 ed.). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acref/9780199204632.001.0001

Dammak, M., Hadrich, B., Miladi, R., Barkallah, M., Hentati, F., Hachicha, R., Laroche, C., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2017). Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis sp*. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12944-016-0378-1

Danesh, A. F., Mooij, P., Ebrahimi, S., Kleerebezem, R., & Van Loosdrecht, M. (2018). Effective role of medium supplementation in microalgal lipid accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(5), 1152–1160. https://doi.org/10.1002/bit.26548

Day, J. G., Fenwick, C. (1993). Cryopreservation of members of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture. *Aquaculture,* 118:151-160. doi: 10.1016/0044-8486(93)90288-A

Day, J.G., & Tsavalos, A.J. (1996). An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis*. *J Appl Phycol 8*, 73–77. https://doi.org/10.1007/BF02186225

De Jesus Raposo, M. F., & De Morais, A. M. M. B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences, 125*, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.018

De Oliveira, A. P. F., & Bragotto, A. P. A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, *6*, 100157. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100157

De Oliveira-Júnior, R. G., Grougnet, R., Bodet, P., Bonnet, A., Nicolau, E., Jebali, A., Rumin, J., & Picot, L. (2020). Updated pigment composition of *Tisochrysis lutea* and purification of fucoxanthin using centrifugal partition chromatography coupled to flash chromatography for the chemosensitization of melanoma cells. *Algal Research*, *51*, 102035. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102035

De Paepe, J., Gragera, D. G., Jimenez, C. A., Rabaey, K., Vlaeminck, S. E., & Gòdia, F. (2023). Continuous cultivation of microalgae yields high nutrient recovery from nitrified urine with limited supplementation. *Journal of Environmental Management, 345*, 118500. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118500

Diaz-Troya, S., & Huertas, M. J. (2024). Green microbes: Potential solutions for key sustainable development goals. *Microbial Biotechnology, 17*(8). https://doi.org/10.1111/1751-7915.14546

Dolman, A. M., & Wiedner, C. (2014). Predicting phytoplankton biomass and estimating critical N:P ratios with piecewise models that conform to Liebig's law of the minimum. *Freshwater Biology*, *60*(4), 686–697. https://doi.org/10.1111/fwb.12518

El-Kassas, H. Y. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum Sp.* grown under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research, 39*(4), 233–239. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.007

Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*. *42*(3-4), 207-215. https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90101-7

Ferreira, E. S., Da Silva Binotti, F. F., Costa, E., Vendruscolo, E. P., Binotti, E. D. C., Salles, J. S., & Salles, J. S. (2023). Vitamin B3 with action on biological oxide/reduction reactions and growth biostimulant in *Chlorella vulgaris* cultivation. *Algal Research*, *76*, 103306. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103306

Fierli, D., Barone, M. E., Donnell, A. M., Conlon, T., & Touzet, N. (2023). Combined application of exogenous phytohormones and blue light illumination to the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research, 71*, 103052. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103052

Føyn, B. (1934). Lebenszyklus, Cytologie und Sexualiät der Chlorophycee Cladophora suhriana Kützing. Arch. Protistenk. 83: 1-56 – adapted for CCAP.

Fu, L., Li, Q., Yan, G., Zhou, D., & Crittenden, J. C. (2019). Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s13068-019-1458-z

Galas, L., Burel, C., Schapman, D., Ropitaux, M., Bernard, S., Bénard, M., & Bardor, M. (2021). Comparative Structural and Functional Analyses of the Fusiform, Oval, and Triradiate Morphotypes of *Phaeodactylum tricornutum* Pt3 Strain. *Frontiers in Plant Science, 12*. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.638181

Gao, P., Guo, L., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., & She, Z. (2022). Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *Journal of Environmental Management, 302*, 114095. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114095

Genin, S.N., Aitchison, J.S., Allen, D.G. (2016). Photobioreactor-Based Energy Sources. Em Pacheco Torgal, F., Buratti, C., Kalaiselvam, S., Granqvist, CG., Ivanov, V. (eds) *Nano and Biotech Based Materials for Energy Building Efficiency*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27505-5_16

Ghosh, A., Sangtani, R., Samadhiya, K., & Kiran, B. (2021). Maximizing intrinsic value of microalgae using multi-parameter study: conjoint effect of organic carbon, nitrate, and phosphate supplementation. *Clean Technologies and Environmental Policy*. https://doi.org/10.1007/s10098-021-02192-y

Gonçalves, J., Freitas, J., Fernandes, I., & Silva, P. (2023). Microalgae as Biofertilizers: A sustainable way to improve soil fertility and plant growth. *Sustainability*, *15*(16), 12413. https://doi.org/10.3390/su151612413

Goshtasbi, H., Okolodkov, Y. B., Movafeghi, A., Awale, S., Safary, A., Barar, J., & Omidi, Y. (2023). Harnessing microalgae as sustainable cellular factories for biopharmaceutical production. *Algal Research*, *74*, 103237. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103237

Gröger, M. (2010). Das Gesetz vom Minimum. Liebig oder Sprengel? *Chemie in Unserer Zeit*, *44*(5), 340–343. https://doi.org/10.1002/ciuz.201000533

Grzebyk, D., Pasqualini, V., Garrido, M., Quilichini, Y., Pereto, C., & Cecchi, P. (2022). Insight into the morphology and genetic diversity of the *Chaetoceros tenuissimus* (*Bacillariophyta*) species complex. *European Journal of Phycology*, *57*(4), 507–525. https://doi.org/10.1080/09670262.2022.2029949

Guillard, R. R. L. & Ryther, J.H. (1962) Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, *8*, 229-239. https://doi.org/10.1139/m62-029

Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (eds) Culture of Marine Invertebrate Animals. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Häder, D. (2022). Photosynthesis in plants and algae. *Anticancer Research*, 42(10), 5035–5041. https://doi.org/10.21873/anticanres.16012

Hämmerling, J. (1931). Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea. Biol. Zentralbl. 51: 633-47.

Hamouda, R. A., Latif, A. a. E., Elkaw, E. M., Alotaibi, A. S., Alenzi, A. M., & Hamza, H. A. (2022). Assessment of Antioxidant and Anticancer Activities of Microgreen Alga *Chlorella vulgaris* and Its Blend with Different Vitamins. *Molecules*, *27*(5), 1602. https://doi.org/10.3390/molecules27051602

Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A. (2004). *Hatchery culture of bivalves: A practical manual* (FAO Fisheries Technical Paper, 471). Rome FAO.

Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2010). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology/World Journal of Microbiology & Biotechnology, 27*(8), 1737–1746. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0632-z

Hou, C., Zhao, J., Huang, B., Zhou, X., & Zhang, Y. (2024). Microalgae-based technologies for carbon neutralization and pollutant remediation: A comprehensive and systematic review. Resources Conservation and Recycling, 202, 107323. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2023.107323

Hyung, J., Kim, E., Moon, S., Kang, N. S., & Park, J. (2021). *Tetraselmis jejuensis sp*. nov. (*Chlorodendrophyceae*), a Euryhaline Microalga Found in Supralittoral Tide Pools at Jeju Island, Korea. *Plants*, *10*(7), 1289. https://doi.org/10.3390/plants10071289

Kadic, E., & Heindel, T. J. (2014). An introduction to bioreactor hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer. John Wiley & Sons.

Khanzada, Z. T. (2020). Phosphorus removal from landfill leachate by microalgae. *Biotechnology Reports*, *25*, e00419. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00419

Khatoon, H. (2023). Growth and lipid production of marine microalgae *Tetraselmis chuii* cultured in different phosphorus concentrations. *Journal of Aquaculture & Livestock Production*, *4*(4) 1–6. https://doi.org/10.47363/jalp/2023(4)128

Khatun, S., Hossain, M., Akter, T., Banu, & Kawser, A. (2020). Replacement of sodium bicarbonate and micronutrients in kosaric medium with banana leaf ash extract for culture of spirulina platensis. *Annals of Bangladesh Agriculture, 23*(1), 37–47. https://doi.org/10.3329/aba.v23i1.51472

L., He., Yongcan, Chen., Shu, Chen., Xuefei, Wu., Jing, Wen, Liu. (2022). Effects of *Chlorella vulgaris* on phosphorus release from ferric phosphate sediment by consecutive cultivations. *Royal Society Open Science, 9*(3) doi: 10.1098/rsos.211391

Laamanen, C., Desjardins, S., Senhorinho, G., & Scott, J. (2021). Harvesting microalgae for health beneficial dietary supplements. *Algal Research*, *54*, 102189. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102189

Lauritano, C., De Luca, D., Amoroso, M., Benfatto, S., Maestri, S., Racioppi, C., Esposito, F., & Ianora, A. (2019). New molecular insights on the response of the green alga *Tetraselmis suecica* to nitrogen starvation. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-39860-5

Lee, R. E. (2018). Phycology (5th ed.). Cambridge: Cambridge University Press.

Lee, Y.-K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H.D.T., Timlin, J.A. and Hu, Q. (2013). Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques. Em *Handbook of Microalgal Culture* (eds A. Richmond and Q. Hu). https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch3

Liu, H., Liu, T., Guo, H., Wang, Y., Ji, R., Kang, L., Wang, Y., Guo, X., Li, J., Jiang, L., & Fang, Z. (2024). A review of the strategy to promote microalgae value in CO2 conversion-lipid enrichment-biodiesel production. *Journal of Cleaner Production, 436*, 140538. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140538

Luo, W., Pröschold, T., Bock, C. Krienitz, L. (2010). Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta, Trebouxiophyceae*). *Plant Biology, 12*(3):545-553. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00221.x

Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., Kuntz, M., Putaux, J., Jouneau, P., Rébeillé, F., Falconet, D., Coute, Y., Jouhet, J., Tardif, M.,

Salvaing, J., & Marechal, E. (2019). The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research, 38*, 101415. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101415

Ma, F., Li, Y., Han, X., Li, K., Zhao, M., Guo, L., Li, S., Wang, K., Qin, K., Duan, J., Liu, Y., & Xu, Y. (2024). Microalgae-based biofertilizer improves fruit yield and controls greenhouse gas emissions in a hawthorn orchard. *PLoS ONE*, *19*(8), e0307774. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0307774

Ma, M., Jiang, L., Xie, Z., Liu, M., Chen, H., Yu, Z., & Pei, H. (2024). Phosphorus-supplemented seawater–wastewater cyclic system for microalgal cultivation: Production of high-lipid and high-protein algae. *Bioresource Technology*, *398*, 130512. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130512

Makaranga, A., & Jutur, P. P. (2022). Algae-Bacteria Interactomics unveils their role in growth and production of High-Value biorenewables. Em *Clean Energy Production Technologies* (pp. 165–176). https://doi.org/10.1007/978-981-19-0680-0_8

Makkasau, A., & Sahabuddin, E. S. (2023). Addition of Cd2+ Metal Ions to Conway Culture Medium on Phytoplankton Growth of *Chaetoceros calcitrans*. *International Journal on Advanced Science Engineering and Information Technology*, *13*(6), 2052–2059. https://doi.org/10.18517/ijaseit.13.6.19038

Maznah, W. O. W., & Zulaihat, H. A. (2024). Potential of marine microalgae for the production of food and feed industry. Em *De Gruyter eBooks* (pp. 249–278). https://doi.org/10.1515/9783111353951-011

McDuffie, N. G. (1991). Bioreactor Design Fundamentals. Butterworth-Heinemann.

Mendes, A. R., Spínola, M. P., Lordelo, M., & Prates, J. A. M. (2024). Impact of *Chlorella vulgaris* Intake Levels on Performance Parameters and Blood Health Markers in Broiler Chickens. *Veterinary Sciences*, *11*(7), 290. https://doi.org/10.3390/vetsci11070290

Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology, 17*(5–6), 477–489. https://doi.org/10.1007/bf01574779

Moradi, M., Behrouj, H., Alipoor, B., Kheiripour, N., Ghasemi, H., & Ghasemi, H. (2021). *Chlorella vulgaris* is an effective supplement in counteracting non-alcoholic fatty liver disease-related complications through modulation of dyslipidemia, insulin resistance, and inflammatory pathways. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(10). https://doi.org/10.1111/jfbc.13914

Naik, B., Mishra, R., Kumar, V., Mishra, S., Gupta, U., Rustagi, S., Gupta, A. K., Preet, M. S., Bhatt, S. C., & Rizwanuddin, S. (2024). Micro-algae: Revolutionizing food production for a

healthy and sustainable future. *Journal of Agriculture and Food Research, 15*, 100939. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100939

Nayma, Z., Azahar, S. a. B., Khatoon, H., Rahman, M. R., Sultana, R., & Mukta, F. A. (2022). Effects of different culture media on the growth and proximate composition of *Dunaliella sp*. at different growth phase. *BJVAS, 10*(1). https://doi.org/10.60015/bjvas.v10i1.159

Nef, C., Henry, C., Nicolau, É., Bérard, J., Hervé, F., Caruana, A., Kaas, R., Mairet, F., & Garnier, M. (2020). Cobalamin Scarcity Modifies Carbon Allocation and Impairs DMSP Production Through Methionine Metabolism in the Haptophyte Microalgae *Tisochrysis lutea*. *Frontiers in Marine Science, 7*. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.569560

Nef, C., Jung, S., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D., & Garnier, M. (2019). How haptophytes microalgae mitigate vitamin B12 limitation. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-44797-w

Ng, Z. Y., Ajeng, A. A., Cheah, W. Y., Ng, E., Abdullah, R., & Ling, T. C. (2023). Towards circular economy: Potential of microalgae – bacterial-based biofertilizer on plants. *Journal of Environmental Management*, *349*, 119445. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119445

Ogbonna, K. E., Ogbonna, J. C., Njoku, O. U., Yamada, K., & Suzuki, I. (2024). Effect of organic carbon sources on growth, lipid production and fatty acid profile in mixotrophic culture of *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing. *The Microbe, 3*, 100064. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100064

Orlova, T. Y., Markina, Z. V., Karpenko, A. A., Kharlamenko, V. I., & Zinov, A. A. (2023). Biochemical and Ultrastructural Changes in the Microalgae *Tisochrysis lutea* (Bendif et Probert) (*Haptophyta*) at different stages of growth in enhancement culture. *Биология Моря*, *49*(3), 166–174. https://doi.org/10.31857/s0134347523030099

Osorio-Reyes, J. G., Valenzuela-Amaro, H. M., Pizaña-Aranda, J. J. P., Ramírez-Gamboa, D., Meléndez-Sánchez, E. R., López-Arellanes, M. E., Castañeda-Antonio, M. D., Coronado-Apodaca, K. G., Araújo, R. G., Sosa-Hernández, J. E., Melchor-Martínez, E. M., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldivar, R., & Martínez-Ruiz, M. (2023). Microalgae-Based biotechnology as alternative biofertilizers for soil enhancement and carbon footprint reduction: Advantages and implications. *Marine Drugs*, *21*(2), 93. https://doi.org/10.3390/md21020093

Ozcan, D. O., & Ovez, B. (2022). *Phaeodactylum tricornutum* as a potential feedstock for an integrated biorefinery process under varying cultivation conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 45*, 102508. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102508

Pandey, S., Narayanan, I., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Pugazhendhi, A. (2023). A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production. *Journal of Environmental Chemical Engineering, 11*(3), 109984. https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984

Pandey, S., Narayanan, I., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Pugazhendhi, A. (2023). A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *11*(3), 109984. https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984

Perdana, B. A., Chaidir, Z., Kusnanda, A. J., Dharma, A., Zakaria, I. J., Syafrizayanti, N., Bayu, A., & Putra, M. Y. (2021). Omega-3 fatty acids of microalgae as a food supplement: A review of exogenous factors for production enhancement. *Algal Research*, *60*, 102542. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102542

Pereira, H., Silva, J., Santos, T., Gangadhar, K. N., Raposo, A., Nunes, C., Coimbra, M. A., Gouveia, L., Barreira, L., & Varela, J. (2019). Nutritional Potential and Toxicological Evaluation of Tetraselmis sp. CTP4 Microalgal Biomass Produced in Industrial Photobioreactors. *Molecules*, *24*(17), 3192. https://doi.org/10.3390/molecules24173192

Peter, A. P., Chew, K. W., Koyande, A. K., Munawaroh, H. S. H., Bhatnagar, A., Tao, Y., Sun, C., Sun, F., Ma, Z., & Show, P. L. (2022). Integrated microalgae culture with food processing waste for wastewater remediation and enhanced biomass productivity. *Chinese Chemical Letters, 34*(2), 107721. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2022.08.001

Policastro, G., Ebrahimi, S., Weissbrodt, D. G., Fabbricino, M., & Van Loosdrecht, M. C. (2023). Selecting for a high lipid accumulating microalgae culture by dual growth limitation in a continuous bioreactor. *The Science of the Total Environment*, *912*, 169213. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169213

R., Anith, Jose., D., Devina, Merin., T., S., Arulananth., Nagaraju, Shaik. (2022). Characterization Analysis of Silver Nanoparticles Synthesized from *Chaetoceros calcitrans*. *Journal of Nanomaterials, 2022*, 1-15. https://doi: 10.1155/2022/4056551

R., Slinksiene., Egle, Sendzikiene., Austėja, Mikolaitienė., Violeta, Makareviciene., R., Paleckiene., Dovilė, Ragauskaitė. (2022). Use of microalgae biomass for production of granular nitrogen biofertilizers. *Green Chemistry Letters and Reviews, 15*(2):416-426. doi: 10.1080/17518253.2022.2071593

Rai, U., Deshar, G., Rai, B., Bhattarai, K., Dhakal, R., & Rai, S. (2014). Isolation and Culture Condition Optimization of *Chlorella vulgaris*. *Nepal Journal of Science and Technology, 14*(2), 43–48. https://doi.org/10.3126/njst.v14i2.10414

Rippka, R., Stanier, R. Y., Deruelles, J., Herdman, M., & Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology, 111*(1), 1–61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1

Ruangsomboon, S., Sornchai, P., & Prachom, N. (2017). Enhanced hydrocarbon production and improved biodiesel qualities of *Botryococcus braunii* KMITL 5 by vitamins thiamine, biotin and cobalamin supplementation. *Algal Research*, *29*, 159–169. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.028

Sangela, V., Kumar, M., Choudhary, S., Gour, V. S., Meena, M., Vinayak, V., & Harish, N. (2022). Effect of nitrogen, phosphorus and sodium bicarbonate on lipid production and fatty acid profile in *Coelastrella terrestris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *45*, 102518. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102518

Santillan, C. (1982). Mass production of *Spirulina*. Em Mislin, H., Bachofen, R. (eds) *New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems*. EXS 43: Experientia Supplementum, vol 43. Birkhäuser, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6305-6_9

Santos, F.M., & Pires, J.C.M. (2020). Microalgae Cultivation in Wastewater to Recycle Nutrients as Biofertilizer. Em Gothandam, K., Ranjan, S., Dasgupta, N., Lichtfouse, E. (eds) Environmental Biotechnology Vol. 1. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*, vol 44. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38192-9_3

Santos-Ballardo, D. U., Del Carmen Rendón-Unceta, M., Rossi, S., Vázquez-Gómez, R., Hernández-Verdugo, S., & Valdez-Ortiz, A. (2016). Effects of outdoor cultures on the growth and lipid production of *Phaeodactylum tricornutum* using closed photobioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32*(8). https://doi.org/10.1007/s11274-016-2089-1

Sas, A. A. A., Arshad, A., Das, S. K., Pau, S. S. N., & Cob, Z. C. (2023). Optimum temperature and salinity conditions for growth, lipid contents, and fatty acids composition of centric diatoms *Chaetoceros calcitrans* and *Thalassiosira weissflogii*. *Pertanika Journal of Science & Technology*, *31*(2), 689–707. https://doi.org/10.47836/pjst.31.2.04

Saurabh, Jyoti, Sarma., Ratul, Kumar, Das., Satinder, Kaur, Brar., Yann, Le, Bihan., Gerardo, Buelna., Mausam, P., Verma., Carlos, Ricardo, Soccol. (2014). Application of

magnesium sulfate and its nanoparticles for enhanced lipid production by mixotrophic cultivation of algae using biodiesel waste. *Energy, 78*, 16-22. doi: 10.1016/J.ENERGY.2014.04.112

Sayer, A. P., Llavero-Pasquina, M., Geisler, K., Holzer, A., Bunbury, F., Mendoza-Ochoa, G. I., Lawrence, A. D., Warren, M. J., Mehrshahi, P., Smith, A. G. (2024). Conserved cobalamin acquisition protein 1 is essential for vitamin B12 uptake in both *Chlamydomonas* and *Phaeodactylum*. *Plant Physiology, 194*(2), 698–714. https://doi.org/10.1093/plphys/kiad564

Schreiber, E. (1927). Die Reinkultur von marinen Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers. Wiss. Meeresuntersuch., N.F. 10: 1-34.

Sebastien, N. Y., & Klein, V. L. M. (2006). Efeito do meio Erd Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*. *Acta Scientiarum Biological Sciences, 28*(2). https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v28i2.1037

Sedjati, S., Supriyantini, E., Ridlo, A., Yudiati, E., & Prasetyo, L. D. (2019). Pengaruh Cahaya Terhadap Produksi Fukosantin *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968 (*Bacillariophyceae*: *Chaetocerotaceae*). *Jurnal Kelautan Tropis*, *22*(2), 173. https://doi.org/10.14710/jkt.v22i2.5633

Seemashree, M., Chauhan, V., & Sarada, R. (2021). Phytohormone supplementation mediated enhanced biomass production, lipid accumulation, and modulation of fatty acid profile in *Porphyridium purpureum* and *Dunaliella salina* cultures. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *39*, 102253. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102253

Selvan, K. T., Goon, J. A., Makpol, S., & Tan, J. K. (2023). Effects of microalgae on metabolic syndrome. *Antioxidants*, *12*(2), 449. https://doi.org/10.3390/antiox12020449

Shei, M. R. P., Barreto, O. J. S., Bonfante, T. M., & Bastos, G. C. C. (2008). Cultivo da microalga marinha *Chaetoceros calcitrans* (*Bacillariophyceae*) utilizando diferentes tipos de água marinha artificial. *Boletim Do Instituto De Pesca, 34*(4):563-569.

Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). Bioprocess engineering: Basic Concepts (2nd ed.). Pearson College Div.

Singh, P. K., & Tiwari, A. (2023). Potential application of microalgae in aquaculture. Em *Microalgal Biotechnology* (pp. 205–224). https://doi.org/10.1201/9781003332251-7

Siteng, Yu., Ze, Yu., Qingjie, Hou., Haiyan, Pei. (2022). Seawater with Added Monosodium Glutamate Residue (MSGR) Is a Promising Medium for the Cultivation of Two Commercial Marine Microalgae. *Water, 14*(6):975-975. doi: 10.3390/w14060975

Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Selyakh, I., Semenova, L., Ismagulova, T., Lukyanov, A., Mamedov, I., Vinogradova, E., Karpova, O., Konyukhov, I., Vasilieva, S., Mojzes, P., Dijkema, C., Vecherskaya, M., Zvyagin, I., Nedbal, L., & Gorelova, O. (2019). Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Research*, *43*, 101651. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651

Solovchenko, A., Plouviez, M., & Khozin-Goldberg, I. (2024). Getting grip on phosphorus: Potential of microalgae as a vehicle for sustainable usage of this macronutrient. *Plants, 13*(13), 1834. https://doi.org/10.3390/plants13131834

Song, L., Qin, J. G., Su, S., Xu, J., Clarke, S., & Shan, Y. (2012). Micronutrient Requirements for Growth and Hydrocarbon Production in the Oil Producing Green Alga *Botryococcus braunii* (*Chlorophyta*). *PLoS ONE*, *7*(7), e41459. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041459

Song, L., Qin, J. G., Su, S., Xu, J., Clarke, S., & Shan, Y. (2012). Micronutrient Requirements for Growth and Hydrocarbon Production in the Oil Producing Green Alga *Botryococcus braunii* (*Chlorophyta*). *PLoS ONE*, *7*(7), e41459. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041459

Song, Z., Lye, G. J., & Parker, B. M. (2020). Morphological and biochemical changes in *Phaeodactylum tricornutum* triggered by culture media: Implications for industrial exploitation. *Algal Research, 47*, 101822. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101822

Sorokina, K. N., Samoylova, Y. V., & Parmon, V. N. (2020). Comparative analysis of microalgae metabolism on BBM and municipal wastewater during salt induced lipid accumulation. *Bioresource Technology Reports*, *11*, 100548. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100548

Souza, I. S., Andrade, B. B., & Da Cunha Lima, S. T. (2023). The potential of microalgae cultivation in multiple stages. *Industrial Biotechnology, 19*(5), 294–299. https://doi.org/10.1089/ind.2023.0016

Stanier, R. Y., Deruelles, J., Rippka, R., Herdman, M., Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Microbiology, 111:1–61.

Stiawan, E. (2022). Evaluation of The Biochemical Contents in Guillard f/2 and Walne Growth Medium to Fulfill the Animal-Free Aspects of Microalgal Bioprocessing. *Indonesian Journal of Chemical Studies*, *1*(2), 49–53. https://doi.org/10.55749/ijcs.v1i2.16

Stiawan, E. (2022). Evaluation of The Biochemical Contents in Guillard f/2 and Walne Growth Medium to Fulfill the Animal-Free Aspects of Microalgal Bioprocessing. *Indonesian Journal of Chemical Studies, 1*(2), 49–53. https://doi.org/10.55749/ijcs.v1i2.16

Suastes-Rivas, J. K., Hernández-Altamirano, R., Mena-Cervantes, V. Y., & Chairez, I. (2020). Simultaneous optimization of biomass and metabolite production by a Microalgae-Yeast co-culture under inorganic micronutrients. *BioEnergy Research, 13*(3), 974–985. https://doi.org/10.1007/s12155-020-10116-9

Tandon, P., Jin, Q., & Huang, L. (2017). A promising approach to enhance microalgae productivity by exogenous supply of vitamins. *Microbial Cell Factories*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12934-017-0834-2

Tang, J., & Riley, W. J. (2021). Finding Liebig's law of the minimum. *Ecological Applications*, *31*(8). https://doi.org/10.1002/eap.2458

Tessari, L. F. A., Soccol, C. R., Rodrigues, C., González, E. G., De Andrade Tanobe, V. O., De Souza Kirnev, P. C., & De Carvalho, J. C. (2022). Development of a culture medium for microalgae production based on minimal processing of oil palm biomass ash. *Fermentation, 8*(2), 55. https://doi.org/10.3390/fermentation8020055

Tompkins, J. (1995). Culture Collection of Algae and Protozoa, & Natural Environment Research Council (Great Britain). Catalogue of strains, 1995 (6th ed). Culture Collection of Algae and Protozoa.

Turnip, G., Herawati, E. Y., Andayani, S. (2020). Effect Of Carbon Dioxide Concentration On Biomass And Abundance Of *Chaetoceros Calcitrans* Microalgae Cells. *International Journal of Scientific & Technology Research, 9*(2):397-399.

Uliesther, N., Nurafifah, I., Rohmawati, I., Putri, R. a. E., Erfianti, T., & Suyono, E. A. (2023). Different carbon source alternative medium improves Euglena sp. growth and paramylon production. *Biogenesis Jurnal Ilmiah Biologi, 11*(1), 102–113. https://doi.org/10.24252/bio.v11i1.35221

Vijayaram, S., Ringø, E., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Ahani, S., & Chou, C. (2024). Use of Algae in Aquaculture: A review. *Fishes, 9*(2), 63. https://doi.org/10.3390/fishes9020063

Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria and Mytilus*. Fishery Investigations Series II*, *Volume 26*, Number 5.London: Ministry of Agriculture. Fisheries and Food.

Wang, L., Jia, X., Xu, L., Yu, J., Ren, S., Yang, Y., Wang, K., López-Arredondo, D., Herrera-Estrella, L., Lambers, H., & Yi, K. (2023). Engineering microalgae for water phosphorus recovery to close the phosphorus cycle. *Plant Biotechnology Journal*, *21*(7), 1373–1382. https://doi.org/10.1111/pbi.14040

Warsi, O. M., & Dykhuizen, D. E. (2017). Evolutionary implications of Liebig's law of the minimum: Selection under low concentrations of two nonsubstitutable nutrients. *Ecology and Evolution*, *7*(14), 5296–5309. https://doi.org/10.1002/ece3.3096

Williamson, E., Ross, I. L., Wall, B. T., & Hankamer, B. (2023). Microalgae: potential novel protein for sustainable human nutrition. *Trends in Plant Science*, *29*(3), 370–382. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.08.006

Wong, Y. K., Ho, K. C., Tsang, Y. F., Wang, L., & Yung, K. K. L. (2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Column Photobioreactor for Biomass Production and Lipid Accumulation. *Water Environment Research, 88*(1), 40–46. https://doi.org/10.2175/106143015x14362865227553

Yadav, K., Nikalje, G., Pramanik, D., Suprasanna, P., & Rai, M. (2023). Screening of the most effective media for bioprospecting three indigenous freshwater microalgae species. *International Journal of Plant Biology, 14*(3), 558–570. https://doi.org/10.3390/ijpb14030044

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2012). Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular Biology Reports, 40*(4), 2837–2849. https://doi.org/10.1007/s11033-012-2299-z

You, L., Jouhet, J., Maréchal, E., Amato, A., Hao, X., Zhang, D., Banaś, A., & Gong, Y. (2022). Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase from the unicellular diatom *Phaeodactylum tricornutum* (PtLPCAT1) is involved in triacylglycerol and galactoglycerolipid synthesis and enhances eicosapentaenoic acid accumulation in recombinant oleaginous yeast. *Plant Biotechnology Journal, 21*(2), 238–240. https://doi.org/10.1111/pbi.13952

Yun, Ji, Park., Jai-Eok, Park., To, Quyen, Truong., Song, Yi, Koo., Jae-Hyeong, Choi., Sang, Min, Kim. (2022). Effect of *Chlorella vulgaris* on the Growth and Phytochemical Contents of "Red Russian" Kale (Brassica napus var. Pabularia). *Agronomy, 12*(9):2138-2138. doi: 10.3390/agronomy12092138

Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., & Daneshvar, E. (2019). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *46*(2), 153–158. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003

Zdziebłowska, S., Zajda, J., & Ruzik, L. (2024). Microalgae enriched in selenium as a good source of micronutrients. *Food Bioscience, 59*, 103908. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103908

Zhang, L., Pei, H., Yang, Z., Wang, X., Chen, S., Li, Y., & Xie, Z. (2019). Microalgae nourished by mariculture wastewater aids aquaculture self-reliance with desirable biochemical composition. *Bioresource Technology*, *278*, 205–213. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.066

Zhang, Z., Xu, M., Fan, Y., Zhang, L., & Wang, H. (2023). Using microalgae to reduce the use of conventional fertilizers in hydroponics and soil-based cultivation. *The Science of the Total Environment*, *912*, 169424. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169424