

Influência da Salinidade na Produção de Biomassa e de Lipídios Durante o Cultivo das Microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum*

Influence of Salinity on Biomass and Lipid Production During the Cultivation of Microalgae *Tetraselmis gracilis* and *Phaeodactylum tricornutum*

Jéssica Reis Felizardo, graduanda, UNISUL

jessicareisfelizardo@gmail.com

Vinícius José Coelho, graduando, UNISUL

vjc.coelho@gmail.com

Ângelo P. Matos, doutor, UNISUL

angelosotam@gmail.com

Elisa Helena Siegel Moecke, doutora, UNISUL

Elisa.moecke@unisul.br

Resumo

As microalgas são organismos fotossintetizantes que apresentam diversas aplicações econômicas, como utilização na alimentação humana, animal e na produção de biocombustíveis devido a sua biomassa rica em subprodutos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a produtividade das espécies *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* frente as salinidades de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰, aplicadas nos meios de cultivo. Os cultivos foram realizados em meio F/2 Guillard modificado utilizando água do mar filtrada com salinidade natural de 17 ‰. A densidade celular dos cultivos foi monitorada através da contagem de células, a biomassa e o teor de lipídios foram obtidos na fase estacionária dos cultivos. Os cultivos com maior produtividade de biomassa foram os que apresentaram menor teor de lipídios da biomassa seca. Desta forma, visando a produção de lipídios a salinidade ideal para espécie *Tetraselmis gracilis* é de 17 ‰ com teor de lipídios de 27,88% e para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* seria aplicável 26 ‰ pois apresentou 12,26%.

Palavras-chave: Microalgas marinhas; Lipídios; Biomassa

Abstract

*Microalgae are photosynthetic organisms that have several economic applications, such as the use in human and animal food and in the production of biofuels due to their biomass rich in by-products. The present study aimed to evaluate the species *Tetraselmis gracilis* and *Phaeodactylum tricornutum* front as salinities of 17‰, 26‰ and 35‰ use in the culture media. Cultures were carried out in modified F/2 Guillard medium using filtered seawater with natural salinity of 17 ‰. The cell density of the cultures was monitored by counting cells, the biomass and the lipid content were obtained in the stationary phase of the cultures. The cultures with the highest biomass productivity were those with the lowest lipid content in dry biomass. Thus, aiming at the production of lipids, the ideal salinity for the species *Tetraselmis gracilis* is 17 ‰ with a lipid content of 27,88% and for the species *Phaeodactylum tricornutum* it would be applicable 26 ‰ because it presented 12,26%.*

Keywords: Marine microalgae; Lipids; Biomass

1. Introdução

As microalgas pertencem ao grupo de microrganismos fotossintéticos unicelulares apresentam alta versatilidade, incluindo espécies de diferentes nichos ecológicos que com uma variedade de caminhos para sintetizar um amplo espectro de compostos bioativos (PERIN, 2020). São produtores primários e representam uma grande quantidade de biomassa aquática (ALSTERBERG et al., 2013). Apresentam grande importância na produção e no equilíbrio do oxigênio dissolvido em ambientes aquáticos.

A classificação taxonômica é muito extensa devido à grande diversidade de espécies. Esta se baseia nas características da microalga, como a estrutura da parede celular, o tamanho, mobilidade e quanto a existência e tipos de pigmentos (MADIGAN *et al.*, 2004), a coloração se dá devido aos pigmentos acessórios e fotossintéticos (OLAIZOLA, 2003).

O cultivo de microalgas é vantajoso devido a produção de biomassa rica em subprodutos de valor agregado. A biomassa produzida possui diversas aplicações, como o uso para alimentação humana e animal, possui grande quantidade de proteínas e carboidratos (CHISTI, 2013), pode ser utilizada como fertilizante, além da produção de pigmentos e lipídeos, sendo assim uma fonte para a produção de biocombustíveis (ANDRADE e FILHO, 2014).

O crescente desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis tem como enfoque causas socioeconômicas e ambientais que visam diminuir o presente conflito no setor alimentício (FERRERO, 2011) tendo em vista que a principal matéria prima utilizada na produção de biodiesel é o óleo de soja (BRASIL, 2014). São diversas as matérias primas utilizadas para a produção do biodiesel, incluindo óleos vegetais, gorduras animais e até óleos provenientes de fritura (AHMAD, 2011). Várias espécies de microalgas possuem grande quantidade de lipídios em sua composição sendo possível o aproveitamento da biomassa para a produção de biodiesel (FERRERO, 2011).

A produção de biodiesel através dos cultivos de microalga, embora seja uma prática nova, apresenta diversas vantagens nas quais destacam-se a existência de espécies com elevada concentração de lipídios (ANDRADE e FILHO, 2014) os cultivos não afetam a produção das agriculturas tradicionais (DEFANTI *et al.* 2010), as microalgas são organismos capazes de se adaptar e tolerar os mais variados ambientes (MATA *et al.* 2010; RICHMOND, 1990), os cultivos podem ser realizados em sistemas fechados sendo possível o controle de temperatura e luminosidade (FERRERO, 2011). Muitas espécies de microalgas crescem de forma mais acelerada quando comparadas com plantas terrestres proporcionando maior produtividade de biomassa (RICHMOND, 1990).

O desenvolvimento dos cultivos de microalga ocorre através da interação do organismo com as condições físicas, químicas e biológicas do meio (DERNER *et al.* 2006; RAVEN, 1988). As condições biológicas referem-se ao próprio metabolismo da espécie cultivada, além da possível interação de outros organismos com a microalga, quanto as condições físico-químicas destacam-se a luminosidade, salinidade, temperatura e concentração de nutrientes no meio (GUILLARD, 1975).

As condições ideais de cultivo variam muito devido a diversidade de espécies, de acordo com Borowitzka (1999), as microalgas podem ser cultivadas em variados sistemas de

produção sendo possível variar desde pequenos volumes até bilhões de litros. Os cultivos podem ser produzidos sob condições naturais de temperatura e luminosidade sendo denominado de sistema aberto, bem como podem ser realizados em sistemas fechados no qual é possível o controle das variáveis externas provocando elevada produtividade (TREDICI *et al.*, 2008).

Em busca da maior produtividade da microalga diferentes meios de cultivo têm sido desenvolvidos. Tanto em condições laboratoriais quanto sistemas abertos de grande produção as condições físico-químicas são de extrema importância para o metabolismo da microalga (LOURENÇO *et al.* 1996). Os meios de cultura convencionais, por exemplo, f/2 (GUILLARD e RYTHER, 1962) podem limitar a produção devido ao alto custo de nutrientes aplicados nos cultivos. Segundo Sipaúba-Tavares (1995), um dos maiores problemas na produção dos cultivos é o custo com os reagentes químicos necessários para o preparo dos meios de cultura. Tendo em vista as condições econômicas e as necessidades nutricionais das microalgas se fazem necessária pesquisas que tornem os cultivos mais eficientes (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

O gênero *Tetraselmis* são microalgas algas verdes unicelulares marinhas pertencente ao filo Clhlophyta, amplamente encontradas em águas costeiras e ambientes de transição entre rio e mar (GUIRY M.D e GUIRY GM, 2017). Segundo Norris *et al.* (1980), as algas apresentam tamanho entre 10 e 20 μm , possuem forma elipsoide e ovoide, suas células são individuais e móveis. De acordo com Butcher (1959) esta microalga foi encontrada pela primeira vez em valas e poças em pântanos com salinidades que variavam de 12‰ à 25‰. Por décadas as microalgas do gênero *Tetraselmis* tem sido utilizada para alimentação na aquicultura devido à presença em quantidades significativas de ácidos graxos poli-insaturados e por possuírem a capacidade de se adaptar em diferentes meios de cultivo e condições ambientais (SELVAKUMAR e UMADEVI, 2014).

A *Phaeodactylum tricornutum* é uma espécie de diatomácea pleomórfica encontrada principalmente em áreas costeiras com grandes oscilações de salinidade, pode apresentar três morfotipos que são estimulados pelos fatores ambientais no qual estão expostas (MARTINO, 2007). Segundo Cui *et al.* (2019), alguns fatores podem afetar crescimento e a composição lipídica da microalga, pode-se citar a salinidade do meio, pH, fotoperíodo e temperatura. De acordo com Krabs e Buchel (2011), a espécie é capaz de se desenvolver em ambientes hipo e hipersalinos, com salinidade do meio entre 5 ‰ à 70 ‰, além de apresentar crescimento acelerado em temperaturas entre 12 °C à 24°C. A sua aplicação na aquicultura e em produtos alimentícios é crescente devido à presença de gorduras poli-insaturadas, ômega 3 e carotenoides (RYCKEBOSCH *et al.*, 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produtividade das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* frente a diferentes concentrações de sal nos meios de cultivo utilizados para essas espécies. Serão analisados o crescimento celular, a produção de biomassa e o teor de lipídios para as salinidades de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰. Este estudo visa obter melhores rendimentos de biomassa e de lipídios para que possa ser utilizado na produção de biocombustíveis.

2. Material e métodos

2.1. Microalgas e preparo dos meios de cultivo

A cepa das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* foram cedidas pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP com origem no banco de microrganismos Aidar & Kutner. A fase experimental foi realizada no Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL.

Os experimentos foram desenvolvidos em laboratório com temperatura média de 30 ± 5 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h no escuro, a luminosidade foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de 9W. Os cultivos foram realizados em frascos de coleta de água de um litro com aeração constante através de compressores. A razão volumétrica do meio de cultivo:inoculo utilizada foi de 1:10. Nos cultivos das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* foram testadas três diferentes concentrações de sal, aplicadas no meio de cultivo proposto pela literatura para essas espécies. Por se tratar de espécies marinhas se utilizou o meio F/2 Guillard modificado (GUILLARD, 1975) com salinidade de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰. A tabela 1 apresenta os nutrientes que compõe o meio estudo para o cultivo das microalgas.

Meio	Reagente	Solução estoque (g/L)	Quantidade para cultivo/L
Nitrato de sódio	NaNO ₃	75	1 mL
Hipofosfito de sódio	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	1 mL
Silicato de sódio	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30	1 mL
Solução traço de metal	*	*	1 mL
Solução de vitaminas	**	**	0,5 mL

Tabela 1 - Meio de cultivo utilizado para a cultura das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum*. Fonte: Guillard, 1975.

*Os reagentes para a solução traço de metal estão disponíveis na Tabela 2

** Os reagentes para a solução de vitaminas estão disponíveis na Tabela 3.

Reagente	Solução estoque primário (g/L)	Quantidade/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	--	3,15 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	--	4,36 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8	1 mL
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	6,3	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,0	1 mL

CoCl ₂ .6H ₂ O	10,0	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	180,0	1 mL

Tabela 2 - Solução traço de metais. Fonte: Guillard, 1975.

Reagente	Solução estoque primário (g/L)	Quantidade/L
Tiamina HCl (Vit. B ₁)	--	0,2 g
Biotina (Vit. H)	1,0	1 mL
Cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1,0	1 mL

Tabela 3 - Solução de vitaminas. Fonte: Guillard, 1975.

As espécies foram cultivadas em meio de Guillard F/2 modificado (GUILLARD, 1975) preparado com água do mar filtrada com salinidade natural de 17 ‰, que por sua vez foi coletada em um ponto na baía sul no bairro Ponta de Baixo em São José, SC. A água do mar e o material utilizado para o preparo do cultivo foram previamente esterilizados em autoclave (a 121°C e 1,1 atm) durante 15 minutos para garantir que não houvesse contaminação. O cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis* teve duração de 11 dias e o cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* duração de 7 dias, quando o crescimento atingiu o estágio estacionário.

2.2. Densidade celular dos cultivos

A densidade celular dos cultivos foi monitorada pela contagem de células utilizando a Câmara Neubauer em microscópio óptico. As amostras foram retiradas com intervalo máximo de um dia de cultivo e foram fixadas com formaldeído 4%. A contagem foi realizada aplicando-se uma alíquota de 0,05 mL de amostra, sendo esse volume o suficiente para cobrir a câmara, a visualização ocorreu em aumento de 400x.

O melhor quadrante para se realizar a contagem foi determinado pelo tamanho das microalgas e por sua concentração celular, assim se optou pela leitura no maior quadrante (A) da câmara. Para obter a concentração de células foram realizadas diversas contagens em quatro quadrantes de mesmo tamanho e posteriormente calculou-se a média. Sendo o número de células e o número de quadrantes valores conhecidos, foi possível determinar a concentração celular em células por mililitro de cultivo (cél.mL⁻¹) através da equação (1).

Com dados experimentais foram elaboradas as curvas de crescimento das espécies para as diferentes salinidades do meio. Os gráficos foram gerados no Excel, aplicando no eixo da ordenada o número de células em cel.mL⁻¹ e no eixo da abscissa o tempo de cultivo em dia.

$$C = \frac{\text{Total de células}}{n^{\circ}} \times 10000 \quad (1)$$

Sendo:

C – concentração de células; n°- número de quadrantes

2.3. Biomassa algal

A separação das microalgas do meio de cultura ocorreu após o encerramento do cultivo, a espécie *Tetraselmis gracilis* foi encerrada no 11º dia e a *Phaeodactylum tricornutum* no 7º dia. O processo se deu por centrifugação a 3000 rpm, com temperatura de 20°C durante 15 minutos. O volume dos cultivos da espécie *Tetraselmis gracilis* foram centrifugados duas vezes devido a presença de coloração no primeiro sobrenadante.

Em seguida, as amostras foram lavadas com Formiato de Amônio para retirada do sal. A biomassa resultante foi seca em estufa à 60 °C durante 24 h. A concentração de biomassa das microalgas foi estimada gravimetricamente pela diferença de peso do cadinho pelo peso seco de biomassa.

2.4. Extração de Lipídios

A determinação de lipídios presentes na biomassa seca ocorreu através do método Bligh e Dyer (1959) modificado, utilizando extração a frio com uma mistura de Clorofórmio e Metanol (2:1: v/v).

3. Resultados e discussão

A curva de crescimento das microalgas foi expressa em concentração de células em função do tempo. Segundo Lourenço (2006), o aumento da biomassa durante o período de crescimento do cultivo sendo nesse estudo expresso em número de células, é equivalente à biomassa presente no cultivo indicando crescimento exponencial. A figura 1 e figura 2 apresentam a densidade celular dos cultivos das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* respectivamente para os meios com salinidade de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰.

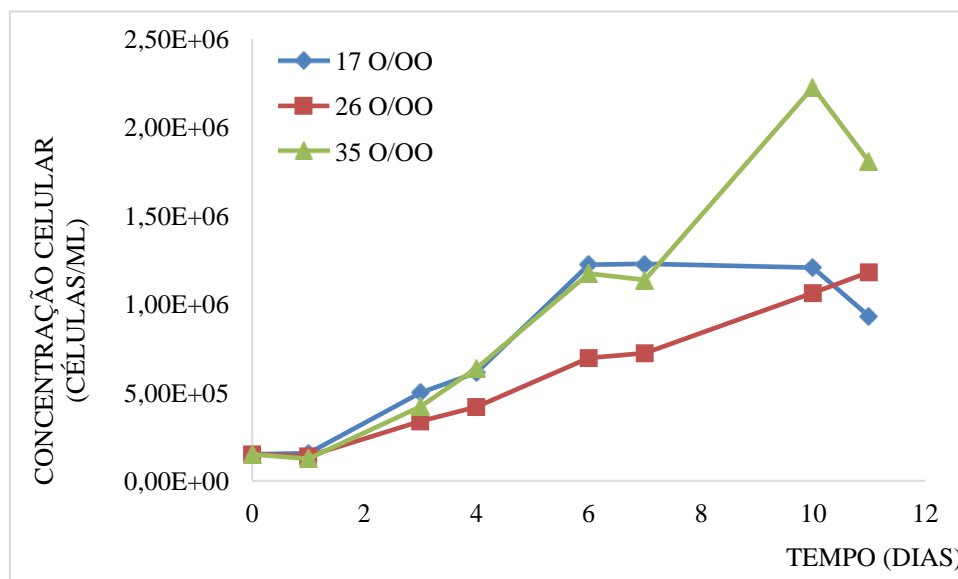


Figura 1 - Concentração de células da microalga *Tetraselmis gracilis* em função do tempo de cultivo para três diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

Até o segundo dia de cultivo pode-se observar a fase de adaptação das células ao meio de cultivo, sendo o aumento no crescimento celular muito sutil e semelhante para os diferentes meios. A partir do terceiro dia de cultivo é possível observar o aumento na concentração celular, porém o meio com salinidade de 35 ‰ apresentou melhor produtividade seguido do meio com salinidade de 17 ‰ até o 10º dia de cultivo quando se iniciou a diminuição no crescimento celular. No cultivo com salinidade de 26 ‰ a concentração celular se manteve estável a partir do 6º até 10º dia, sendo que no 11º dia foi observado uma diminuição no crescimento celular, mostrando menor produtividade de biomassa.

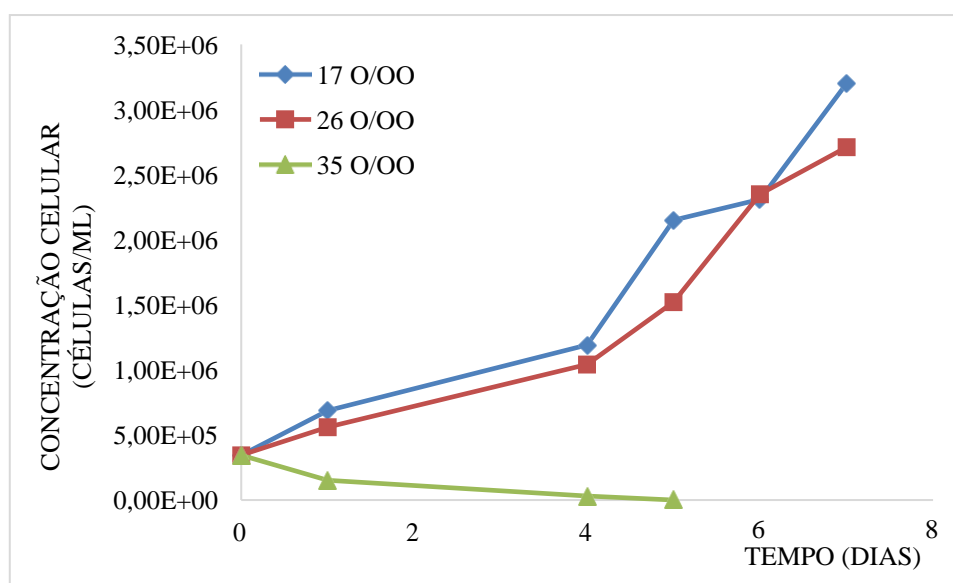


Figura 2 - Concentração de células da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em função do tempo de cultivo para três diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

Para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* (figura 2) observa-se que a fase de adaptação teve duração de aproximadamente um dia, ocorrendo a partir deste momento a fase de aceleração de crescimento no qual as células já se encontram adaptadas às diferentes condições de cultivos e começam a se reproduzir. Os cultivos com salinidade de 17 ‰ e 26 ‰ apresentaram crescimento semelhante até o 4º dia de cultivo, sendo a partir deste momento diferenciados na aceleração de crescimento. O cultivo com salinidade de 17 ‰ apresentou melhor produtividade comparado com os outros meios. O meio com salinidade de 35 ‰ é o que mais se difere, apresentando desde o primeiro dia de cultivo declínio celular, a diminuição gradativa na concentração de células até a morte do cultivo observada no 5º dia. Durante o cultivo se observou a diminuição na pigmentação do meio com salinidade de 35‰ no qual segundo Krabs e Buchel (2011), isso ocorre sob condições hipo e hipersalinas com o decréscimo celular.

A biomassa produzida foi determinada após o 11º dia de cultivo para a espécie *Tetraselmis gracilis* e no 7º para a espécie *Phaeodactylum tricornutum*, consecutivamente determinou-se o teor de lipídios na biomassa seca sendo os resultados apresentados na tabela 4 e tabela 5 respectivamente.

Salinidade	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)
17 ‰	0,35	27,88
26 ‰	0,34	15,36
35 ‰	0,62	8,72

Tabela 4 – Biomassa e teor de lipídios da espécie *Tetraselmis gracilis* para diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

A quantidade de biomassa para as diferentes salinidades está de acordo com a concentração celular mostrado na figura 1. Sendo a maior produtividade obtida para a salinidade de 35 ‰ (0,62 g/L), seguida pelo meio com salinidade de 17 ‰ e por último 26 ‰. O cultivo com a maior produção de biomassa foi o que apresentou o menor teor de lipídios sendo 8,72 % para o meio com salinidade de 35 ‰, o maior teor de lipídios foi observado no cultivo com salinidade de 17 ‰ sendo 27,88%.

O teor de lipídios obtido é superior ao encontrado no estudo feito por Soares (2010) no qual foi de 6,13%. O método para a extração de lipídios e o meio de cultivo utilizado foram os mesmos, porém, há diferença no fotoperíodo, lâmpadas utilizadas, temperatura e tempo de cultivo aplicados.

Salinidade	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)
17 ‰	0,54	12,05
26 ‰	0,48	12,26
35 ‰	-	-

Tabela 5 - Biomassa e teor de lipídios da espécie *Phaeodactylum tricornutum* para diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

A quantidade de biomassa obtida para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* está de acordo com a concentração celular apresentada na figura 2, sendo o meio com salinidade de 17 ‰ o mais produtivo com 0,54 g/L, seguido pelo meio de salinidade 26‰ com 0,48 g/L. Para a salinidade de 35‰ não foram realizados os ensaios para a obtenção de biomassa e teor de lipídios devido a morte celular do cultivo. O teor de lipídios para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* apresentou desempenho semelhante aos valores encontrados para a espécie *Tetraselmis gracilis*, no qual o cultivo com maior produtividade (17 ‰) de biomassa apresentou menor teor de lipídios na biomassa seca de 12,05%. O cultivo com salinidade de 26 ‰ apresentou maior teor de lipídios na biomassa seca no qual se obteve 12,26%.

O teor de lipídios obtido para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* é inferior ao encontrado no estudo feito por Rodolfi *et al.* (2008) no qual se obteve 18,7 %. O método utilizado para a extração de lipídios foi diferente, no qual de acordo com estudos é possível obter diferentes resultados para uma mesma amostra utilizando métodos de extração distintos. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo, porém há diferença na temperatura aplicada (25°C), na salinidade (30 ‰), além de iluminação constante.

Os resultados obtidos nesse estudo para as espécies *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* se diferem de outros já feitos, desta forma é possível verificar como as variáveis influenciam no comportamento e na produtividade do cultivo, devendo sempre buscar as condições que tornem a produção mais eficiente.

4. Conclusões

O desenvolvimento dos cultivos e a composição química das microalgas variam muito de acordo com o meio de cultura e as variáveis aplicadas. Quando submetidas à diferentes condições de cultivo as microalgas apresentam resultados distintos na produção de biomassa e teor de lipídios.

A espécie *Tetraselmis gracilis* apresentou maior quantidade de biomassa no meio com salinidade de 35 ‰ sendo quase o dobro produzido nos outros cultivos, porém o teor de lipídios presente na biomassa ficou abaixo dos outros meios. O mesmo ocorreu para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* no qual o meio que apresentou maior produtividade de biomassa apontou menor teor de lipídios.

Desta forma, visando a produção de lipídios, o meio de cultivo ideal para a espécie *Tetraselmis gracilis* e para *Phaeodactylum tricornutum* é a aplicação do meio F/2 Guillard modificado (GUILLARD, 1975) diluído em água do mar com salinidade natural de 17 ‰ e salinidade de 26 ‰ respectivamente, no qual o teor de lipídios foi de 27,88% na biomassa seca para *T. gracilis* e 12,26% para *P. tricornutum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Flávia Marisa Prado Saldanha-Corrêa, da Universidade de São Paulo, por fornecer estirpes de algas marinhas, e a Unisul pela concessão de Bolsa pelo Programa Unisul de Iniciação Científica (PUIC).

Referências

- AHMAD, A. L. Y., DEREK, C. J. C et al.; Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Nibong Tebal, Malásia; v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.
- ALSTERBERG C, EKLÖF JS, GAMFELDT L, HAVENHAND JN, SUNDBÄCK K. Consumers mediate the effects of experimental ocean acidification and warming on primary producers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, p. 8603–8608, 2013.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313-321, 1999.
- BUTCHER, R.W. **An introductory account of the smaller algae of British coastal waters**. Part I: Introduction and Chlorophyceae. Fisheries Investigations, London, series IV 1: 1-74, p. 67, 1959.
- CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**. v. 167, p. 201–214. 2013.
- CUI, Y., THOMAS-HALL, S. R., e SCHENK, P. M. *Phaeodactylum tricornutum* microalgae as a rich source of omega-3 rich oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. **Food Chemistry**. v. 297, n. 1, p. 1-9, 2019.
- DERNER, R. B.; S. OHSE, M. VILLELA; S. M.D. CARVALHO; R. FETT. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967.
- DIVA SOUZA ANDRADE (Ed.). **Microalgas de águas continentais**. Londrina: Midiograf, 2014.
- FERRERO, I. **Produção de biodiesel a partir de microalgas como alternativa aos cultivos clássicos**. Monografia – Licenciatura em Biotecnologia, Universidade Nacional Del Litoral, Santa fé, 2011.
- GUILLARD, R.R.L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum, 1975. p.29-60.
- KRABS, G., e BUCHEL, C. Temperature and salinity tolerances of geographically separated *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin stains: Maximum quantum yield of primary photochemistry pigmentation proline content and growth. **Botanica Marina**, v. 54, n. 3, p. 231-241, 2011.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações**. Ed. RiMa. São Carlos, 2006.
- GUIRY, M.D; Guiry G. M. **Tetraselmis gracilis**. AlgaeBase, 2017. Disponível: <<https://www.algaebase.org>>. Acesso em: 22 jan. 2020.
- LOURENÇO, S. O., MARQUEZ, U. M. L., MANCINI-FILHO, J., BARBARINO, E., & AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**, São Paulo, v. 148, n. 2-3, p. 153–168, 1997.

- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed. São Paulo; p. 608, 2004.
- MATA, T. M.; A. A. MARTINS; N. S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14:, p. 217-232, 2010.
- NORRIS, RE, HARI t. Floyd LG. **Revision of the genus *Tetraselmis*** (class Prasinophyceae). 1980.
- ODOLFI, L., ZITTELLI, G. C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G. TREDICI, M. R. RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Firenzi, Itália; v. 102, n. 1, 2008.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20. P. 459-466, 2003.
- PERIN G., MOROSINOTTO T. Optimization of Microalgae Photosynthetic Metabolism to Close the Gap with Potential Productivity. **Grand Challenges in Algae Biotechnology**, p. 223-248, 2020.
- RAVEN, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.: BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.331-356
- RICHMOND, A. (Ed). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC, 1990. 528p.
- RODOLFI, L., CHINI ZITTELLI, G., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G., e TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.
- SELVAKUMAR, P., UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180–185. 2014.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., ROCHA, 2001. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos**. São Carlos: Editora RiMa. 106 p.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep. 72 p., 1995.
- SOARES, Lucas Ferrari Granado. **Microalgas na Produção de Biodiesel: Extração e Composição Lipídica**. 2010. 1 CD-ROM. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010.
- TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: **Blackwell Science**, 2004. p.178-214.