

## Produção de biomassa de microalgas a partir de cultivo mixotrófico em acetato

Microalge biomass production from mixotrophic cultures in acetate

Reinaldo Gaspar Bastos<sup>1\*</sup>, Monica de Albuquerque Bonini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Araras, SP, Brazil. Autor para correspondência: reinaldo@cca.ufscar.br

---

### RESUMO

As microalgas vêm sendo utilizadas nas mais diversas áreas da Biotecnologia, tanto na obtenção de bioprodutos, como no setor de serviços e nos estudos de tratamento de águas residuárias. Uma vez que o design dos reatores atualmente utilizados limita a disponibilidade de luz para os cultivos, a produção convencional fotossintetizante de microalgas é limitada, de modo que estudos vêm sendo propostos no sentido da obtenção alternativa de biomassa via cultivos mixotróficos e/ou heterotróficos a partir de uma fonte de carbono orgânico externa. Porém, estes cultivos estão limitados somente a algumas espécies de microalgas e, apesar da redução dos gastos energéticos, há o custo de adição do substrato orgânico, essencial para manutenção do metabolismo microalgal nessas condições. Além disso, a literatura ainda é pouco conclusiva no que diz respeito à faixa de concentração ideal das fontes de carbono orgânico que permitam desenvolvimento satisfatório das microalgas, com o menor efeito inibitório. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de uma cianobactéria e uma clorofícea em meio contendo acetato de potássio como substrato orgânico. As maiores velocidades específicas de crescimento e menores inibições foram obtidas, para ambas as microalgas, nas menores concentrações suplementares de acetato. Os resultados sugerem que a produção mixotrófica de biomassa é viável desde que utilizadas baixas concentrações de acetato de potássio.

**Palavras-chave:** crescimento microalgal, *Aphanothece microscopica*, *Chlorella vulgaris*, substrato orgânico.

---

### ABSTRACT

Microalgae have been used in the most diverse areas of Biotechnology, both in the production of bioproducts and in the service sector in wastewater treatment studies. As conventional photosynthesizing production is limited by the availability of light, studies have been proposed to obtain alternative microalgae biomass via mixotrophic and/or heterotrophic cultures from an external organic carbon source. However, these growth are limited to only a few microalgae species and, despite the reduction of energy costs, there is the cost of adding the organic substrate, essential for the maintenance of microalgal metabolism under these conditions. Moreover, the literature is still inconclusive regarding the range of ideal concentrations of organic carbon sources that allow satisfactory development of microalgae, with the lowest inhibitory effect. Thus, the objective of this study was to evaluate the growth of a cyanobacteria and a chlorophycea in medium containing potassium acetate as an organic substrate. The higher specific growth rates and lower inhibitions were obtained for both microalgae at the lowest supplemental concentrations of acetate. The results suggest that the mixotrophic production of biomass is viable since low concentrations of potassium acetate are used.

**Keywords:** microalgae growth, *Aphanothece microscopica*, *Chlorella vulgaris*, organic substrate.

---



## INTRODUÇÃO

Microalga é um termo genérico que envolve tanto organismos eucarióticos, como as algas verdes, quanto procarióticos fotossintetizantes, conhecidos como cianobactérias (Mata et al., 2010). Em escala comercial, a produção de microalgas iniciou-se no Japão na década de 60 com espécies do gênero *Chlorella* sp. visando a utilização como suplemento alimentar. A partir daí, o cultivo destes micro-organismos passou a ser gradativo no mundo inteiro, destinando-se às mais variadas aplicações, como produção de proteínas unicelulares, lipídios, clorofila, carotenoides, enzimas, agentes antioxidantes e antibióticos, além da utilização da biomassa como suplemento alimentar para humanos e animais, fertilização de solos e tratamento de águas residuárias (Richmond, 2004; Tomaselli, 2004; Queiroz et al., 2011).

Microalgas são consideradas uma das fontes mais promissoras para obtenção de biodiesel a partir da sua fração lipídica. Ao contrário da maioria das fontes de biocombustíveis, microalgas não competem com culturas alimentícias tradicionais, pois podem ser cultivadas em terras não aráveis, em água doce e salgada ou ainda a partir de nutrientes disponíveis em águas residuárias. Além disso, seu cultivo dispensa o uso de herbicidas e pesticidas e, após a extração do óleo, a biomassa pode ser utilizada como fertilizante ou ração animal. Por fim, as microalgas apresentam elevadas velocidades de crescimento, podendo dobrar sua biomassa em 24 horas, além de acumular elevados teores de lipídios, que podem superar 60% da massa seca em determinadas espécies como *Nannochloropsis* sp., *Neochloris* sp., *Botryococcus* sp., *Dunaliella* sp. e *Chlorella* sp. (Chisti, 2007; Mata et al., 2010).

Embora sejam organismos naturalmente fotossintetizantes, algumas linhagens de microalgas são capazes de se desenvolver na ausência de luz a partir do consumo de moléculas orgânicas simples, tais como açúcares, acetato e ácidos orgânicos (Fay, 1992; Perez-Garcia et al., 2011a). Nestes tipos de cultivo, denominados mixotróficos ou heterotróficos, dependendo da disponibilidade de luz, substitui-se a fixação do CO<sub>2</sub> atmosférico que ocorre nas culturas autotróficas por uma fonte de carbono orgânico dissolvida no meio de cultura (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004; Perez-Garcia et al.,

2011a). Esta produção não convencional de microalgas tem sido proposta como uma alternativa para a obtenção de elevadas concentrações de biomassa, muitas vezes superior àquelas obtidas em cultivos fotoautotróficos (Li et al., 2014; Smith et al., 2015; Silva et al., 2016), uma vez que elimina deficiências dos sistemas de cultivo fotoautotróficos e possibilita reduzir os custos de produção da biomassa e utilizar qualquer reator de mistura para os cultivos (O'Grady e Morgan, 2011; Perez-Garcia et al., 2011a). Entretanto, estes cultivos estão limitados somente a algumas espécies de microalgas e, apesar da redução dos gastos energéticos, há o custo de adição do substrato orgânico, essencial para manutenção do metabolismo microalgal nessas condições (Cerón-García et al., 2000).

Glicose, acetato e glicerol são as fontes de carbono mais frequentemente utilizadas em sistemas de cultivo mixotróficos e heterotróficos, havendo também a possibilidade de se utilizar águas residuárias (Bastos et al., 2004; Jacob-Lopes et al., 2006; de-Bashan e Bashan, 2010; Bastos et al., 2011; Perez-Garcia et al., 2011a). Porém, sabe-se que elevadas concentrações de substrato são capazes de inibir o crescimento microalgal (Cerón-García et al., 2000; Perez-Garcia et al., 2011a, 2011b). No entanto, a literatura ainda é pouco conclusiva no que diz respeito à faixa de concentração ideal das fontes de carbono que permita desenvolvimento satisfatório das microalgas, sem efeito inibitório. Dentre as fontes de carbono mais comumente utilizadas para cultivos mixotróficos de microalgas, o acetato é um substrato de baixo custo e prontamente disponível, uma vez que é derivado de diversas aplicações industriais.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo mixotrófico da clorofícea *Chlorella vulgaris* e da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nāgeli* em meio de cultivo suplementado com acetato de potássio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os inóculos das microalgas foram mantidos e propagados no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar), em estufa a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro, com intensidade de fluxo luminoso de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). A cianobactéria *Aphanothece microscopica Nāgeli* foi mantida em meio padrão Braun Grunow Medium - BGN (Ripka et al., 1979),

enquanto para a clorofícea *Chlorella vulgaris* utilizou-se o meio Water Culture – WC (Guillard e Lorenzen, 1972).

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultura (BGN ou WC, para *A. microscopica* e *C. vulgaris*, respectivamente), 10% v/v de inóculo ( $10^5$  cél mL<sup>-1</sup>) e acetato de potássio. Foram avaliadas cinco concentrações de acetato de potássio (0,5; 1,25; 2,5; 5 e 10 g L<sup>-1</sup>). Os frascos foram mantidos em estufa a 25 °C, aeração forçada de 1 VVM (volume de ar por volume de líquido por minuto) e fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro).

A concentração celular das microalgas foi monitorada através de contagem direta das células em microscópio utilizando Câmara de Neubauer, com as velocidades específicas de crescimento máximas ( $\mu_{\max}$ ) determinadas a partir da inclinação do ajuste linear das curvas semi-logarítmicas concentração celular vs. tempo.

O efeito da concentração de acetato de potássio foi avaliado pelos Modelos de Monod (Equação 1) e Haldane (Equação 2), onde S é a concentração de acetato de potássio,  $k_s$  a constante de saturação de Monod e  $k_I$  a constante de inibição pelo substrato. Assim, a concentração ótima de substrato foi calculada considerando os efeitos de inibição conforme Equação 3 (Shi et al., 1999).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{k_s + S} \quad (1)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_I}} \quad (2)$$

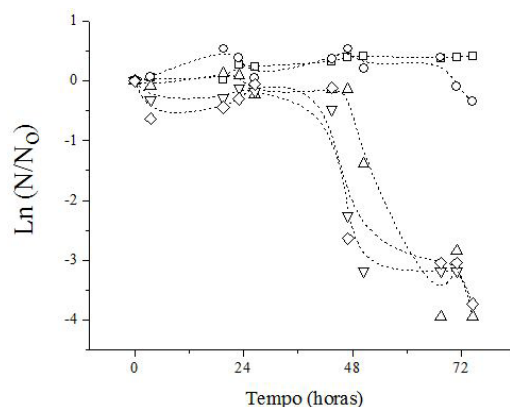
$$S_{mi} = \sqrt{k_s k_I} \quad (3)$$

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados analisados com auxílio dos softwares OriginPro 8.5 e Statistica 7.0.

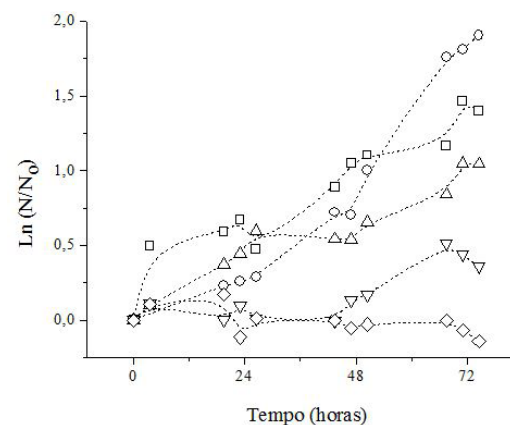
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As Figuras 1 e 2 apresentam os perfis das concentrações celulares das microalgas *Aphanotece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meios BGN e WC, respectivamente, suplementados com diferentes concentrações de acetato de potássio.

Para *Aphanotece microscopica* Nägeli a maior concentração final de células foi obtida quando se utilizou a menor concentração de acetato de potássio (0,5 g L<sup>-1</sup>). Para todas as outras concentrações de substrato verificou-se



**Figura 1.** Concentrações celulares iniciais ( $N_0$ ) e nos respectivos tempos ( $N$ ) para *Aphanotece microscopica* Nägeli em cultivo mixotrófico a partir do meio BG11 com diferentes concentrações de acetato de potássio: 0,5 g L<sup>-1</sup> (□); 1,25 g L<sup>-1</sup> (○); 2,5 g L<sup>-1</sup> (Δ); 5 g L<sup>-1</sup> (∇) e 10 g L<sup>-1</sup> (◇).



**Figura 2.** Concentrações celulares iniciais ( $N_0$ ) e nos respectivos tempos ( $N$ ) para *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico a partir do meio BG11 com diferentes concentrações de acetato de potássio: 0,5 g L<sup>-1</sup> (□); 1,25 g L<sup>-1</sup> (○); 2,5 g L<sup>-1</sup> (Δ); 5 g L<sup>-1</sup> (∇) e 10 g L<sup>-1</sup> (◇).

decréscimo de crescimento ao final do cultivo (valores negativos da diferença logarítmica das concentrações), sendo que nas duas maiores, 5 e 10 g L<sup>-1</sup>, a concentração celular caiu para valores inferiores a  $10^6$  cél mL<sup>-1</sup> após 47 horas.

Para *Chlorella vulgaris* a maior concentração de células foi verificada quando o meio foi suplementado com 1,25 g L<sup>-1</sup> de acetato de potássio, ficando os valores finais bem acima dos verificados para as demais concentrações do substrato. Na maior concentração avaliada (10 g L<sup>-1</sup>) observou-se decréscimo de crescimento logo após 20 horas de cultivo. Para todas as concentrações de acetato foram verificadas pronunciadas fases de

adaptação. O acetato, carregado pela coenzima A, é geralmente oxidado metabolicamente pelos ciclos do glioxilato e do ácido tricarbóxico, sendo que os principais intermediários de ambas as vias são os mesmos metabólitos. O metabolismo via ciclo do glioxilato exige a síntese de determinadas enzimas, como a isocitrato liase (EC 4.1.3.1.) e malato sintase (EC 2.3.3.9), o que pode explicar a fase de adaptação verificada para ambas as microalgas (Perez-Garcia et al., 2011a).

Para a estimativa da velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para *Aphanothece microscopica Nágeli* considerou-se um período de 43,5 horas de cultivo, limite em que o crescimento foi positivo para todas as concentrações de substrato avaliadas (Figura 1). Já para *Chlorella vulgaris*,  $\mu_{\text{máx}}$  foi calculado para todas as concentrações de acetato exceto a maior, uma vez que, após 20 horas de cultivo, houve diminuição do crescimento celular (Figura 2), tornando o número de pontos amostrais insuficientes para a construção de uma curva linearizada. Nestas condições, as Tabelas 1 e 2 apresentam os valores das velocidades específicas de crescimento máximas e tempos de geração para ambas as microalgas durante o cultivo em meio suplementado com acetato de potássio.

**Tabela 1.** Velocidades específicas de crescimento máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e tempos de geração ( $t_g$ ) da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nágeli* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de acetato de potássio.

Concentração de acetato de potássio (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_g$ (h)
0,5	0,0072	0,97	96,3
1,25	0,0070	0,72	99,0
2,5	0,0069	0,72	100,5
5	0,0051	0,73	135,9
10	0,0129	0,96	53,7

**Tabela 2.** Velocidades específicas de crescimento máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e tempos de geração ( $t_g$ ) da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de acetato de potássio.

Concentração de acetato de potássio (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_g$ (h)
0,5	0,017	0,94	40,8
1,25	0,028	0,95	24,8
2,5	0,013	0,95	53,3
5	0,007	0,98	99,0
10	*	---	*

\*Não foi possível sua estimativa.

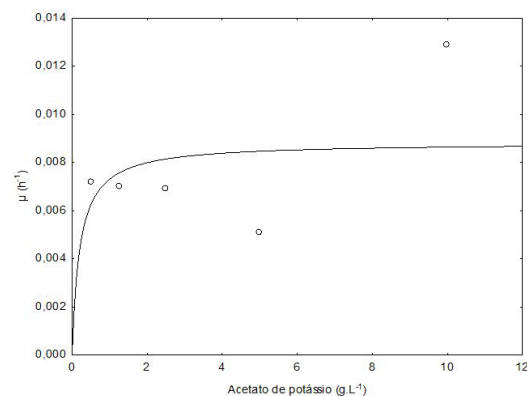
Em geral, *Chlorella vulgaris* apresentou valores de  $\mu_{\text{máx}}$  superiores aos verificados para *Aphanothece microscopica Nágeli*, demonstrando uma maior adaptabilidade ao substrato. Para ambas as microalgas o comportamento das curvas de crescimento indica que o acetato de potássio exerceu efeito inibitório no crescimento, sendo que *Aphanothece microscopica Nágeli* mostrou-se mais sensível do que *Chlorella vulgaris*. De fato, quando o meio foi suplementado com concentrações maiores de acetato de potássio, a cianobactéria apresentou poucas células viáveis ao fim de 80 horas de cultivo (Figura 3).

As Figuras 4 e 5 apresentam os ajustes das velocidades específicas de crescimento para *Aphanothece microscopica Nágeli* e *Chlorella vulgaris* pelo modelo de Haldane.

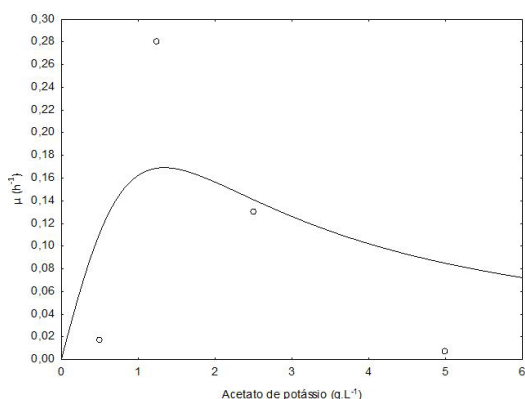
Pela Figura 4 obtém-se como concentração ótima de acetato de potássio 6,91 g L<sup>-1</sup> para o cultivo da *Aphanothece microscopica Nágeli*. Entretanto esta concentração não foi considerada como ideal para o cultivo da cianobactéria, uma vez que a curva não foi construída utilizando os dados do período total de cultivo, os quais mostram que houve efeito inibitório do acetato. As velocidades



**Figura 3.** Aspecto ao final dos cultivos de *Aphanothece microscopica Nágeli* em condições mixotróficas com concentrações crescentes de acetato de potássio.



**Figura 4.** Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nágeli* pelo Modelo de Haldane.



**Figura 5.** Ajuste da velocidade específica de crescimento microalga *Chlorella vulgaris* pelo Modelo de Haldane.

específicas de crescimento para *Aphanothece* não se ajustaram adequadamente ao Modelo de Haldane, haja visto o decréscimo da concentração celular mesmo para baixas concentrações de acetato. O elevado valor de  $\mu$  para  $10 \text{ g L}^{-1}$  deve-se à estimativa deste parâmetro cinético num menor intervalo de tempo onde houve crescimento para esta concentração, não devendo ser considerado como condição ideal. Por outro lado, a Figura 5 apresenta o ajuste dos dados para *Chlorella vulgaris* seguindo o Modelo de Haldane, indicando  $1,34 \text{ g L}^{-1}$  como concentração ótima de acetato de potássio, com efeito inibitório nas concentrações superiores,

A concentração ótima de acetato para o cultivo das microalgas foi definida considerando a concentração final de células durante o período total de cultivo, o comportamento das curvas de crescimento e as velocidades específicas de crescimento calculadas. Nestas condições, foram adotadas as concentrações de  $0,5$  e  $1,25 \text{ g L}^{-1}$  de acetato de potássio para o cultivo de *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, as quais refletiram em velocidades específicas de crescimento máximas de  $0,0072$  e  $0,028 \text{ h}^{-1}$ , com tempos de geração de  $96,3$  e  $24,8 \text{ h}$ , respectivamente.

Segundo Perez-Garcia et al. (2011a), acetato nem sempre promove o crescimento, podendo, em elevadas concentrações, ser tóxico para muitos micro-organismos. Tal fato se deve ao aumento de pH que ocorre em meios suplementados com acetato, seja de sódio ou potássio, uma vez que os íons remanescentes ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ) combinam-se com íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) ou outros ânions presentes no meio formando bases. Assim, manter as concentrações

de acetato em baixos níveis é interessante para cultivos em batelada-alimentada, uma vez que, conforme o substrato é consumido, mais acetato é adicionado ao reator, evitando o aumento de pH (Wood et al., 1999; Perez-Garcia et al., 2011a).

O efeito inibitório do acetato no crescimento de microalgas tem sido relatado por diversos autores. Azma et al. (2011), ao avaliar três concentrações de acetato de sódio no crescimento de *Tetraselmis suecica*, verificaram maior concentração de biomassa quando utilizou-se a menor concentração de acetato,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , sendo praticamente o dobro da observada na maior concentração,  $2 \text{ g L}^{-1}$ . Também Ortega et al. (2004), trabalhando com *Chlorella* sp., verificaram diminuição do crescimento celular com o aumento da concentração de acetato de  $0,082$  para  $0,41$  e  $0,82 \text{ g L}^{-1}$ , atribuindo o efeito inibitório do acetato à inibição de algum processo fisiológico ou limitação de algum nutriente essencial pela interferência da concentração do substrato. Yan et al. (2012), avaliando diferentes concentrações de acetato ( $0,5$  a  $5 \text{ g L}^{-1}$ ) e de glicose ( $0$  a  $10 \text{ g L}^{-1}$ ) no cultivo mixotrófico da cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC 7942, observaram maior crescimento celular nas concentrações intermediárias de ambos os substratos,  $2 \text{ g L}^{-1}$  e  $4 \text{ g L}^{-1}$  de acetato e glicose, respectivamente, refletindo em velocidades específicas de crescimento semelhantes ( $0,025$  e  $0,022 \text{ h}^{-1}$  para acetato e glicose, respectivamente). Logo, os autores sugerem que a cianobactéria é capaz de crescer mixotroficamente, desde que os substratos orgânicos estejam presentes em baixas concentrações. Por fim, Qiao et al. (2012), avaliando os efeitos do acetato no crescimento e nos processos fotossintético e respiratório de *Chlorella sorokiniana*, observaram que, quanto maior a concentração do substrato, maior a fase lag de crescimento da microalga, induzindo efeitos imediatos nos processos metabólicos do micro-organismo e inibindo completamente seu crescimento quando em concentrações superiores a  $243,8 \text{ mM}$  ( $\sim 2,5 \text{ g L}^{-1}$ ).

## CONCLUSÕES

Nas condições experimentais foi possível concluir que *Chlorella vulgaris* apresentou valores superiores de velocidade de crescimento em acetato quando comparada com *Aphanothece microscopica Nægeli*, que se mostrou

mais sensível à inibição pelo substrato. Os resultados indicam que é viável a produção de biomassa microalgal a partir desta fonte de carbono orgânico, desde que sua concentração seja controlada.

## REFERÊNCIAS

- AZMA, M., MOHAMED, M.S., MOHAMAD, R., RAHIM, R.A. & ARIFF, A.B., 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 53, no. 2, pp. 187-195.
- BASTOS, R.G., PAIVA, P.R., RIGO, M., VEIGA, G. & QUEIROZ, M.I., 2011. Growth of cyanobacteria *Aphanothece sp.* on exogenous sugars. *Bioscience Journal*, vol. 27, no. 1, pp. 156-161.
- BASTOS, R.G., QUEIROZ, M.I., ALMEIDA, T.L., BENERI, R.L., ALMEIDA, R.V. & PADILHA, M., 2004. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, vol. 9, no. 2, pp. 112-116.
- CERÓN-GARCÍA, M.C., FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., MOLINA-GRIMA, E. & GARCÍA CAMACHO, F., 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, vol. 12, no. 1, pp. 239-248.
- CHISTI, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, vol. 25, no. 3, pp. 294-306. PMID:17350212.
- CHOJNACKA, K. & MARQUEZ-ROCHA, F.J., 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 21-34.
- DE-BASHAN, L.E. & BASHAN, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 6, pp. 1611-1627. PMID:19931451.
- FAY, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 56, no. 2, pp. 340-373. PMID:1620069.
- GUILLARD, R.R.L. & LORENZEN, C.J., 1972. Yellow Green algae with chlorophyllid-c. *Journal of Phycology*, vol. 8, no. 1, pp. 10-14. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>.
- JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L.Q., QUEIROZ, M.I. & NETTO, F.M., 2006. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 26, no. 2, pp. 482-488.
- LI, T., ZHENG, Y., YU, L. & CHEN, S., 2014. Mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, vol. 66, no. 1, pp. 204-213.
- MATA, T.M., MARTINS, A.A. & CAETANO, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and others applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 1, pp. 217-232.
- O'GRADY, J. & MORGAN, J.A., 2011. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 34, no. 1, pp. 121-125. PMID:20976474.
- ORTEGA, J., MORONTA, R. & MORALES, E., 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp.* *Ciencia*, vol. 12, no. 1, pp. 25-31.
- PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F.M.E., DE-BASHAN, L.E. & BASHAN, Y., 2011a. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, vol. 45, no. 1, pp. 11-36. PMID:20970155.
- PEREZ-GARCIA, O., DE-BASHAN, Y. & PUENTE, M.E., 2011b. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, vol. 47, no. 1, pp. 190-199. PMID:27021724.
- QIAO, H., WANG, G., LIU, K. & GU, W., 2012. Short-term effects of acetate and microaerobic conditions on photosynthesis and respirations in *Chlorella sorokiniana* GXNN 01 (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, vol. 48, no. 4, pp. 992-1001. PMID:27009009.
- QUEIROZ, M.I., HORNES, M.O., SILVA-MANETTI, A.G. & JACOB-LOPES, E., 2011. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3438-3443

- RICHMOND, A., 2004. *Handbook of microalgal culture*. Oxford: Blackwell Publishing. 577 p.
- RIPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. & STANIER, R.Y., 1979. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, vol. 111, no. 1, pp. 1-61. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.
- SHI, X.M., LIU, H.J.J., ZHANG, X.W. & CHEN, F., 1999. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations. *Process Biochemistry*, vol. 34, no. 4, pp. 341-347.
- SILVA, H.R., PRETE, C.E.C., ZAMBRANO, F., MELLO, V.H., FISCHER, C.A. & ANDRADE, D.S., 2016. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. *AMB Express*, vol. 6, no. 1, pp. 10. PMID:26847340.
- SMITH, R.T., BANGERT, K., WILKINSON, S.J. & GILMOUR, D.G., 2015. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass and Bioenergy*, vol. 82, pp. 73-86.
- TOMASELLI, L., 2004. The microalgal cell. In: A. RICHMOND, ed. *Handbook of microalgal culture*. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 3-19.
- WOOD, B.J.B., GRIMSON, H.K., GERMAN, J.B. & TURNER, M., 1999. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Journal of Biotechnology*, vol. 70, no. 1-3, pp. 175-183. PMID:10483105.
- YAN, R., ZHU, D., ZHANG, Z., ZENG, Q. & CHU, J., 2012. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC 7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, no. 4, pp. 657-668.