

**Universidade Federal de São Carlos**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

**Departamento de Botânica – Laboratório de Biotecnologia de Algas**

**Leonardo Murilo Aoyagi**

*Manipulação das condições ambientais em culturas de *Kirchneriella contorta*: efeitos na fotossíntese e no rendimento de biomoléculas de valor agregado*

SÃO CARLOS – SP

2021

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Departamento de Botânica – Laboratório de Biotecnologia de Algas**

**Leonardo Murilo Aoyagi**

*Manipulação das condições ambientais em culturas de **Kirchneriella contorta**: efeitos na fotossíntese e no rendimento de biomoléculas de valor agregado*

Trabalho de conclusão de curso submetido como requisito para  
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia

Orientadora: Ana Teresa Lombardi

SÃO CARLOS – SP

2021

## Resumo

Microalgas são fonte natural de produtos valiosos e possuem potencial de serem aplicadas em diversos setores produtivos. Dentre a vasta gama de biomoléculas que sintetizam, os carboidratos, proteínas e lipídeos, incluindo os carotenoides, têm importância na saúde humana. Aliada à potencialidade das microalgas como produtoras de biomoléculas, tem-se que sua produção pode ocorrer em áreas que não competem com a produção de alimento e ainda, como seres fotossintéticos que são, fixam o CO<sub>2</sub>, um gás do efeito estufa. Dada à plasticidade fisiológica das microalgas, técnicas de manipulação de sua composição bioquímica têm sido propostas para o aumento de biomoléculas. Neste estudo investigou-se a fisiologia da microalga *Kirchneriella contorta* sob diferentes concentrações de cobre e em duas cores de luz (diodos emissores de luz – LED), vermelha e azul. Em uma primeira etapa, sob luz branca definimos uma amplitude de concentração de cobre que não ocasionasse alteração da taxa de crescimento e em segunda etapa, culturas cultivadas nessas concentrações foram expostas às luzes branca (controle), azul e vermelha. Foram determinadas as densidade populacional e taxas de crescimento, parâmetros fotossintéticos (PhytoPAM) e concentração das biomoléculas clorofila a, carotenoides, proteínas e carboidratos. Os resultados mostraram que o aparato fotossintético foi sensível às mudanças na qualidade da luz e à presença do cobre. A partir de  $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu<sup>2+</sup> houve um aumento da dissipação não fotoquímica NPQ, que levou à superação do estresse, mantendo os rendimentos fotossintéticos similar ao controle. As biomoléculas clorofilas *a* e *b*, carboidratos e proteínas apresentaram maiores produtividades em concentrações intermediárias de cobre nas primeiras 48 h de cultivo sob luz branca. Sob luz azul e na concentração de  $3,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu<sup>2+</sup> livre houve aumento de 50% na produtividade de carotenoides e carboidratos e de 30% de proteínas. As taxas de crescimento mantiveram-se sempre similares ao controle, independente da qualidade da luz ou concentração de cobre. Mostramos que, se fornecido em quantidade correta, o cobre pode estimular a produtividade de biomoléculas, e que essa produtividade pode ser magnificada por sinergismo mediante combinação com LED azul. Essa dupla mostrou-se ótima ferramenta para a manipulação bioquímica e crescimento de *Kirchneriella contorta*. Este estudo é uma contribuição à biotecnologia de microalgas e ao entendimento da fisiologia e efeitos do cobre e luz azul e vermelha na microalga, *K. contorta* uma Chlorophyta de água doce.

Palavras-chave: microalga, cobre, LEDs, biomoléculas.

### **Lista de Ilustrações**

<b>Figura 1 – Fluxograma do projeto .....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 2 – Esquema experimental e posterior divisão para os LEDs .....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3 - Espectro de emissão dos LEDs usados no experimento .....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4 – Curva de crescimento em diferentes concentrações de cobre .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 5 – Parâmetros de crescimento em 48 horas .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 6 – Parâmetros de crescimento em 96 horas .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7 – Parâmetros de fluorescência em 48 horas .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 8 – Parâmetros de fluorescência em 96 horas .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 9 – Produtividade específica de pigmentos em 48 horas .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 10 – Produtividade específica de pigmentos em 96 horas .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 11 – Produtividade específica de biomoléculas em 48 horas .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 12 – Produtividade específica de biomoléculas em 96 horas .....</b>	<b>30</b>

### **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1 - Concentrações de cobre e taxa de crescimento .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 2 – Concentrações de cobre 24 h antes da inoculação e cobre livre .....</b>	<b>18</b>

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Objetivo Geral.....</b>	<b>8</b>
<i>2.1 Objetivos específicos .....</i>	<i>8</i>
<b>3. Material e métodos .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>15</b>
<i>4.1 Varredura das concentrações de cobre em microplaca.....</i>	<i>15</i>
<i>4.2 Manipulação bioquímica e fisiológica da <i>Kirchneriella contorta</i> .....</i>	<i>19</i>
<i>4.2.a Efeito do cobre e choque de cores de luz nos parâmetros de crescimento.....</i>	<i>19</i>
<i>4.2.b Efeito do cobre e choque de luz colorida nos parâmetros fotossintéticos .....</i>	<i>23</i>
<i>4.2.c Efeito do cobre e choque de luz na composição bioquímica .....</i>	<i>26</i>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>33</b>

## 1. Introdução

As microalgas exercem papel de fundamental importância nos ambientes aquáticos, pois são as principais produtoras primárias (Malapascua et al. 2014) e, portanto, mudanças na composição bioquímica, diversidade ou ainda no número populacional delas podem impactar os níveis tróficos superiores (Beauvais-flück, Slaveykova e Cosio 2019). Além de sua importância ambiental, as microalgas são promissoras em diversas áreas da biotecnologia, tanto na indústria alimentícia, como na de cosméticos. Na indústria alimentícia relaciona-se aos alimentos funcionais graças à sua capacidade de sintetizar compostos bioativos (Camacho, Macedo e Malcata 2019; Galasso et al. 2019). Na indústria de cosméticos, sua importância relaciona-se aos compostos antioxidantes que elas produzem, com propriedades anti-inflamatórias, inibição de células tumorais, entre outras (Gong e Miao 2019). Entretanto, a produção de biomoléculas por microalgas enfrenta o problema de baixo rendimento, fator que torna o produto de alto custo e pode, muitas vezes inviabilizar uma produção comercial.

O cobre é um micronutriente essencial aos organismos fotossintéticos e, sendo as microalgas fotossintetizantes, elas são grandemente afetadas pelo cobre. Esse metal é requerido em concentrações adequadas em vários processos metabólicos, sendo encontrado em proteínas carreadoras de elétrons na fotossíntese e na respiração, assim como em mecanismos de reparo de estresse oxidativo (Raven et al. 1999; Georgopoulos et al. 2001; Lombardi e Maldonado 2011). Outros efeitos do cobre em microalgas, como redução da taxa de divisão celular e aumento de seu volume, foram também relatados (Silva et al. 2018). Predominantemente, em quantidades excessivas, o cobre gera um efeito negativo generalizado na microalga, podendo levar a cultura à morte (Sandmann e Boger 1980; Lombardi e Maldonado 2011; Silva et al. 2018). Tripathi e Gaur (2006) mostraram que o cobre pode ser prejudicial para o rendimento de biomoléculas, como ocorrido com *Scenedesmus sp* exposta a 10  $\mu$ M de cobre, que também teve sua taxa de crescimento reduzida.

Sabe-se que diversas situações de estresse ambiental são capazes de induzir modificações bioquímicas nas microalgas, incluindo estresse oxidativo (Pinto et al. 2003; Bossuyt e Janssen 2004; Lunka e Bayless 2013). Nesse quesito destaca-se o estresse por cobre ou outro metal, podendo levar ao aumento da produtividade de lipídios, carboidratos e/ou proteínas (Pistocchi et al. 1997; Chia et al. 2013; Silva et al. 2018; Baracho et al. 2019). Mas estressar microalgas resulta, na maioria das vezes, em concomitante redução da taxa de

crescimento (Chia et al. 2013; 2017). Portanto, sob estresse, biomoléculas são acumuladas em detrimento da geração de biomassa.

Percebemos que induzir um estresse algal para obter aumento de biomoléculas sem alterar a taxa de crescimento, ou mesmo causando-lhe um estímulo pode ser tarefa complexa e exigir estratégia adequada. O efeito hormese, descreve um fenômeno no qual compostos tóxicos em baixa dose podem ocasionar estímulo mas em alta dose, toxicidade/letalidade. Baracho et al. (2019) mostrou que *Chlorolobium braunii* exposta ao cobre em concentrações próximas às ambientais, ou seja, da ordem de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> aumentou a produtividade de algumas biomoléculas sem no entanto apresentar efeito negativo na taxa de crescimento. Silva et al. (2018) obteve resultado similar investigando os efeitos do cobre em *Scenedesmus quadricauda*.

A exposição de microalgas à mais de um fator de estresse também pode ser considerada. Apesar de existir pouca informação na literatura, exposição de microalgas à combinação de estresses pode ser promissor. Efeitos sinérgicos podem ser observados, como em Chia et al. (2013; 2017). Investigando a produção de biomoléculas em sistemas de cultivo semi-contínuos, Chia et al (2013; 2017) expôs a microalga *Chlorella vulgaris* que havia sido aclimatada em distintas concentrações dos nutrientes nitrogênio e fósforo, à diferentes concentrações de cádmio. Os autores mostraram grande magnificação no acúmulo de lipídios, aumentando em cerca de 30x os triacilgliceróis.

Diodos emissores de luz (LEDs) têm sido usados para o cultivo e produção de microalgas (Blanken et al. 2013; Olle e Virisile 2013) e podem ser aplicados para induzir modificações na composição bioquímica de sua biomassa (Zhao et al. 2013), uma vez que cores diferentes podem ser usadas. Diferentemente de um estresse químico pela limitação de nutrientes que precisa ter as células aclimatadas (Voltolina et al. 1998), no estresse físico não há a necessidade de aclimação prévia, sendo isso um facilitador do processo de manipulação. Segundo Keeling (2013), as microalgas têm preferência para crescer sob a luz vermelha (660 nm) ou azul (420-470 nm), sendo que em geral a vermelha resulta em altas taxas de crescimento e células menores pois aceleram o ciclo celular (Blanken et al. 2013), enquanto a luz azul influencia a expressão gênica e vias metabólicas (Ruyters 1984). Assim, LEDs coloridos como indutores da biossíntese de compostos em microalgas podem ser uma ferramenta promissora na manipulação bioquímica e de fácil interação com estresse químico como o cobre.

Mas como induzir um efeito hormese com o cobre (estresse químico) simultaneamente a um estresse físico (LEDs de cores diferentes) objetivando o acúmulo de biomoléculas sem redução da taxa de crescimento e, conseqüentemente obter aumento líquido de produtividade

da biomolécula em microalgas? Uma resposta pode ser o emprego de concentração do metal tão baixa que rotas metabólicas possam ser levemente modificadas, mas processos importantes como a divisão celular, não.

Nesta pesquisa testamos essa hipótese utilizando uma combinação de situações: estresse químico (cobre) e exposição à LEDs nas cores azul e vermelha em intensidade PAR similar à do cultivo em luz branca. Nosso objetivo foi induzir modificação bioquímica intracelular em *Kirchneriella contorta*, microalga Chlorophyta de água doce. Cuidadosamente planejada e previamente definida, a concentração de cobre não ocasionou alteração na taxa de crescimento, mas possivelmente um estresse oxidativo de baixa magnitude, comparável a um efeito hormese. Em sinergia com LED azul, a produção de biomoléculas aumentou quase 30% na presença de  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre.

## 2. Objetivo Geral

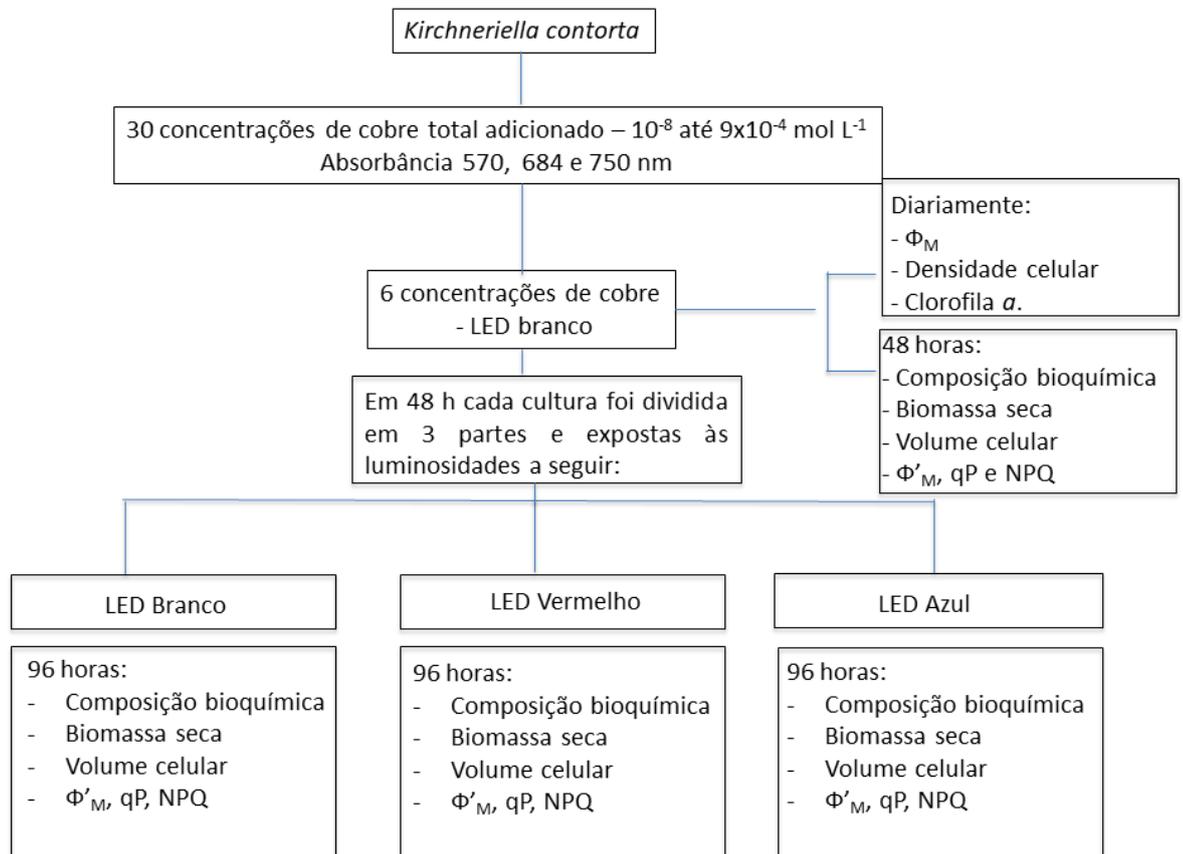
O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do cobre, em diferentes concentrações ambientais, isolado e em combinação com exposição à diferentes cores de LED (azul e vermelho), na microalga *Kirchneriella contorta* investigando fatores fotossintéticos, de crescimento celular e produção de biomoléculas.

### 2.1 Objetivos específicos

- Analisar as respostas da microalga *Kirchneriella contorta* em relação ao crescimento, concentração de clorofila *a* e *b* e densidade populacional em diferentes concentrações de íons de cobre e sob duas qualidades de luz (LED vermelho e LED azul);
- Determinar os efeitos do cobre e da exposição aos LED vermelho e azul nos parâmetros fotossintéticos;
- Buscar concentrações de cobre que não interfiram significativamente na taxa de crescimento, mas que aumentem a produtividade específica de pigmentos, proteínas, carboidratos e carotenoides em *Kirchneriella contorta*.
- Expor a microalga à concentração ótima de cobre às diferentes cores de LED e analisar a produtividade específica de pigmentos, proteínas, carboidratos e carotenoides em *Kirchneriella contorta*.

### 3. Material e métodos

Um fluxograma da organização experimental deste projeto é apresentado na figura 1. Nele, mostramos as duas etapas metodológicas e as análises que foram realizadas.



**Figura 1.** Fluxograma do desenvolvimento e etapas laboratoriais deste projeto.

#### a) Condições de cultivo

A microalga *Kirchneriella contorta* foi cultivada em meio WC com pH ajustado para 7.0 (Guillard & Lorenzen 1972), autoclavado (20 min, 121 °C, 1 bar; AV Phoenix Lufenco, Brasil) e mantida sob condições controladas de temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e intensidade luminosa (radiação fotossinteticamente ativa, PAR) de  $\sim 200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e com fotoperíodo 12:12 h (claro:escuro) para todas as cores de LED (branco – controle, azul e vermelho).

#### b) Varredura de concentrações de cobre em microplacas e seus efeitos no crescimento

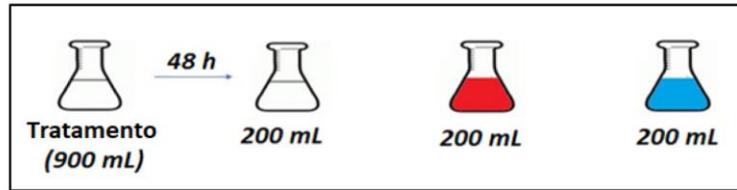
Realizamos estudo prévio (teste de varredura do cobre) com duração de 120 h para definição da amplitude de concentrações de cobre a ser usada nos ensaios de manipulação bioquímica. O teste de varredura foi feito com 30 concentrações de cobre nominais e a microalga exposta ao metal foi cultivada em microplacas com 96 poços. Essa etapa foi importante para a prospecção das concentrações de cobre, pois permitiu o acompanhamento do crescimento em 30 concentrações de cobre em apenas uma etapa (120 h). Durante o processo alguns cuidados foram necessários. Para que não houvesse contaminação da cultura uma cobertura com parafilme (Parafilm®, Bemis, U.S.A.) foi adicionada, protegendo a cultura da exposição ao ambiente, mas permitindo troca gasosa. Além disso, a intensidade luminosa incidente foi controlado, pois em estudos prévios percebeu-se que altas intensidades resultavam em elevada evaporação, podendo interferir na concentração da cultura.

O controle constou do meio de cultura W.C. com a concentração de cobre  $4 \times 10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ . Para esse teste, 30 cultivos de 100 mL (inóculo  $10^4$  células  $mL^{-1}$ ) foram feitos em frascos de cultura de tecido de poliestireno. Esses cultivos foram expostos a concentrações nominais de cobre entre  $3 \times 10^{-8}$  a  $9 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$  e deles, uma alíquota de 300  $\mu L$  foi transferida para poços de uma microplaca (em triplicata). Essa microplaca foi incubada sob condições controladas de luz e temperatura. O cultivo nos poços da microplaca teve duração de 120 horas e durante esse período foi monitorado diariamente o crescimento celular por meio da absorbância 684 nm, 570 nm e 750 nm. Para essas determinações utilizamos um espectrofotômetro leitor de placas (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, U.S.A.).

O cobre foi adicionado 24 h antes do início dos experimentos e o cobre livre ( $Cu^{2+}$ ) determinado imediatamente antes de inocular as células. Uma solução padrão de cobre (AAS/ICP, 1000 mg  $L^{-1}$ , 38996 Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada para a confecção de padrões, que diluídos foram usados nas culturas.

As concentrações efetivas EC10, EC20 e EC50 foram calculadas a partir dos dados obtidos e com o auxílio do program Graph Pad Prism 6. Para a composição bioquímica (2ª etapa), definimos as concentrações de cobre que pouco afetaram as taxas de crescimento, permitindo conciliar o fator de estresse para a manipulação bioquímica e culturas que produzam uma quantidade de biomassa próxima ao controle, buscando-se assim um ganho no rendimento de biomoléculas.

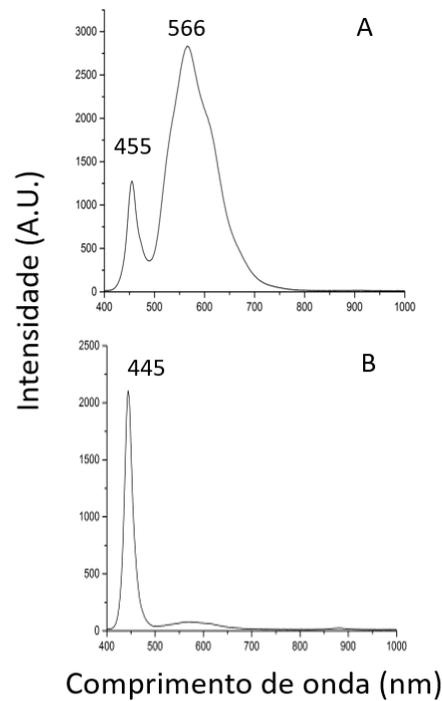
*c) Manipulação bioquímica usando-se estresse químico (cobre) e físico (LEDs azul e vermelho) e seus efeitos no crescimento, fotossíntese e composição bioquímica*



**Figura 2:** Esquema experimental representando as concentrações de cobre livre e posterior divisão em LEDs coloridos (48 horas).

O experimento de manipulação bioquímica foi realizado em frascos de cultura de tecido de poliestireno com capacidade de 1000 mL e volume de 900 mL de cultura, mantidos verticalmente e borbulhados com ar filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ; Chromafil Xtra PUDF 20/25, Alemanha). A adição do cobre seguiu o mesmo padrão descrito para o teste de varredura de concentrações (Material e Métodos, item b).

O inóculo inicial foi de  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  a partir de uma cultura em crescimento exponencial e rendimento quântico máximo  $\sim 0.70$ . O experimento teve duração de 96 h. Diariamente, determinações relativas ao crescimento populacional (contagem de células) e fotossíntese (rendimento quântico máximo) foram realizadas. Em 48 h de cultivo (fase exponencial de crescimento), foram feitas determinações bioquímicas na biomassa (carboidratos, proteínas, carotenoides e concentração de clorofila *a* e *b*). Imediatamente após amostragem em 48 h, cada uma das três réplicas dos tratamentos com cobre deram origem a 3 culturas que seriam expostas a cada cor de LED (branco, azul e vermelho), como mostrado na figura 2. Desse modo, três réplicas de cada tratamento nas 3 cores de LED foram obtidas. Após 48 h de exposição às LEDs coloridas, as culturas foram amostradas para as mesmas determinações bioquímicas, correspondendo, portanto, à 96 h de tempo experimental total. Para aferirmos os comprimentos de onda dos LEDs comerciais que foram usados, os espectros de emissão (figura 3) de cada cor foram registrados com um radiômetro Ocean Optics modelo UBS 2000 equipado com fibra óptica BIF-600-UV-VIS e software de coleta OIBase32 (Dunedin, FL).



**Figura 3.** Espectro de emissão dos LEDs usados no experimento. LED branco (A) e azul (B).

#### d) Determinação dos íons cobre livre ( $\text{Cu}^{2+}$ )

A determinação de cobre livre 24 h após sua adição no meio WC foi feita de acordo com o procedimento descrito em Lombardi et al. (2007), em rotina no laboratório onde foi desenvolvido este projeto. Essa metodologia é baseada em um eletrodo seletivo de íons cobre (ISE-Cu) com calibração feita através do uso de tampões metálicos. Utiliza-se um eletrodo seletivo de cobre (ISE-Cu) como eletrodo de trabalho (Thermo Scientific Orion 9429BN) e um eletrodo de referência de junção dupla (Thermo Scientific Orion 900200, fluxo seguro D/J) sob temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C. O tampão metálico (cobre) foi composto por borato de sódio (Sigma- Aldrich, Alemanha), nitrato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha), padrão de cobre (38996 Sigma-Aldrich, EUA) e ácido nitrilotriacético (Sigma-Aldrich, Alemanha). Em geral, os tampões metálicos são capazes de estender os limites de detecção do sistema ISE-Cu para  $10^{-13}$  -  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>. A curva de calibração para o sistema ISE-Cu é sempre realizada em pH 5 e foi feita a partir da diluição serial de um padrão comercial mono-elementar AAS/ICP de cobre (1000 mg L<sup>-1</sup>) (38996 Sigma-Aldrich, EUA).

As concentrações de cobre livre determinadas para o teste feito nas microplacas são mostradas na Tabela 1. Na Tabela 2 mostramos os valores usados para o experimento de manipulação bioquímica.

*e) Parâmetros de crescimento*

Diariamente foram coletados 4 mL de amostra para monitoramento da cultura e determinação do padrão de crescimento. As células foram contadas em um citômetro de fluxo MUSE (Millipore, USA) e em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) a fim de acompanhar visualmente a cultura e verificar eventual alteração de volume celular, além de qualquer contaminação. A taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) foi determinada, a partir dos resultados do MUSE, por meio de uma regressão linear, utilizando-se o logaritmo natural da densidade celular ( $\text{célula mL}^{-1}$ ) *versus* o tempo experimental (dias), sendo que a inclinação da reta formada representa a taxa de crescimento específica na fase exponencial da cultura. A determinação dos valores de EC10, EC20 e EC50 teve como base o número de células por mL e também a taxa de crescimento dos cultivos.

*f) Parâmetros fotossintéticos*

Utilizando-se um fluorímetro com pulsos de luz de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz, Alemanha) o rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) foi monitorado diariamente. Para isso, as amostras foram aclimatadas no escuro por 20 minutos, obtendo-se oxidação completa do fotossistema II (PSII). Esse parâmetro resulta da diferença entre a fluorescência máxima e mínima dividida pela fluorescência máxima, como mostrado na equação (1), após a alga ser aclimatada no escuro. Os detalhes da metodologia podem ser encontrados em Lombardi e Maldonado (2011).

$$\Phi_M = (F_M - F_0) / F_M \quad (1)$$

Em 48 h e 96 h foram determinados os valores de rendimento quântico efetivo ( $\Phi'_M$ ), a dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ) por meio de pulsos de luz em amostra exposta à luz de intensidade similar ao cultivo ( $200 \mu\text{mol fotóns m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a cada 20 s por 10 min corridos. A partir desses pulsos foram obtidos os valores de fluorescência em estado estável ( $F'_s$ ), o qual possibilitou determinar o valor de fluorescência em células adaptadas à luz ( $F'_M$ ) e por fim o rendimento quântico efetivo ( $\Phi'_M$ ), *quenchings* fotoquímicos (qP) e o NPQ foram estimados por meio das equações representadas abaixo (Juneau, Berdey, and Popovic 2002).

$$\Phi'_M = (F'_M - F'_S) / F'_M \quad (2)$$

$$qP = (F'_M - F'_S) / (F'_M - F'_0) \quad (3)$$

$$NPQ = [F_M - F'_M] / F'_M \quad (4)$$

#### *g) Determinações bioquímicas*

Ao fim das 48 h e 96 h de cultivo foram determinados carboidratos intracelulares totais. Para isso, amostras da cultura para carboidratos (30 mL) foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, EUA) por 20 min e em 4400 rpm. Os *pellets* formados foram armazenados em -22 °C para posterior análise. A determinação de carboidratos totais seguiu metodologia descrita em Albalasmeh et al (2013). A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Slocombe (2013) modificado. As concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides foram determinadas de acordo com Wellburn (1994).

#### *h) Análise estatística*

As análises estatísticas dos resultados da seleção da amplitude de concentração de cobre (30 concentrações) foram baseadas em comportamento dos pontos amostrais com ajustes do gráfico de absorvância *vs* concentração de cobre.

O software Minitab (versão 17 para Windows) foi usado para comparação das concentrações de carboidratos, proteínas, carotenoides e de clorofila *a* e *b* (variáveis discretas) através de ANOVA One Way em 48 h, pois a única variável era o cobre, Two Way em 96 h, com variáveis sendo cobre e luz, e Teste de Tukey. As representações gráficas foram feitas utilizando-se o programa IgorPro 6.0.5 (WaveMetrics, EUA).

## **4. Resultados e discussão**

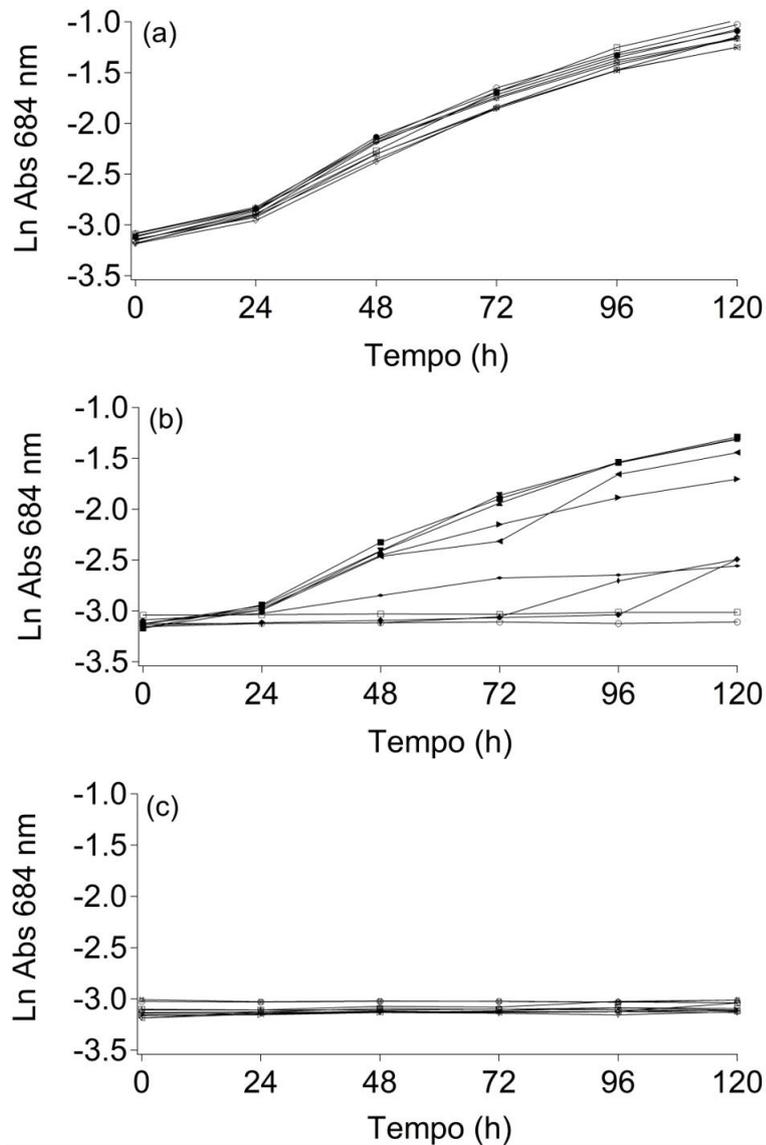
### ***4.1 Varredura das concentrações de cobre em microplaca***

As taxas de crescimento (tabela 1) e as curvas de crescimento (figura 4) para as 30 concentrações de cobre testadas nas microplacas são apresentadas para a absorvância em 684 nm. As absorvâncias de 570 nm e 750 nm não foram apresentadas, porém seguiram o mesmo comportamento das curvas de 684 nm. A partir desses resultados observamos que o cobre teve papel importante no crescimento da microalga. Sabe-se que o cobre é um micronutriente essencial para as microalgas, participando de funções essenciais do metabolismo, como no transporte de elétrons da fotossíntese e como cofator enzimático em reações biológicas (Fabisiak et al. 1999; Raven et

al. 1999; Reynolds 2006). Obteve-se que com o aumento da concentração de cobre houve redução do crescimento de *K. contorta*, chegando à ausência de crescimento nas concentrações mais elevadas (figura 4c). Essa resposta se deve ao efeito inibitório do cobre em altas concentrações. Esse comportamento está de acordo com os trabalhos encontrados na literatura, como Bossuyt e Janssen (2004), Levy, Stauber e Jolley (2007), Debelius et al. (2009), Lombardi e Maldonado (2011), de Abreu et al. (2014), Baracho et al. (2019).

**Tabela 1.** Concentrações de cobre adicionado e taxas de crescimento para *Kirchneriella contorta* obtidas após exposição ao metal.

Tratamento	Cobre Adicionado	Taxa crescimento
1- controle	$4.0 \times 10^{-8}$	0.606
2	$6.0 \times 10^{-8}$	0.559
3	$9.0 \times 10^{-8}$	0.514
4	$1.2 \times 10^{-7}$	0.493
5	$1.5 \times 10^{-7}$	0.542
6	$3.0 \times 10^{-7}$	0.518
7	$6.0 \times 10^{-7}$	0.598
8	$9.0 \times 10^{-7}$	0.519
9	$1.2 \times 10^{-6}$	0.543
10	$1.5 \times 10^{-6}$	0.583
11	$3.0 \times 10^{-6}$	0.470
12	$4.5 \times 10^{-6}$	0.542
13	$6.0 \times 10^{-6}$	0.512
14	$7.5 \times 10^{-6}$	0.511
15	$9.0 \times 10^{-6}$	0.411
16	$1.0 \times 10^{-5}$	0.193
17	$1.2 \times 10^{-5}$	0.282
18	$1.3 \times 10^{-5}$	0.294
19	$1.5 \times 10^{-5}$	-
20	$3.0 \times 10^{-5}$	-
21	$4.5 \times 10^{-5}$	-
22	$6.0 \times 10^{-5}$	-
23	$9.0 \times 10^{-5}$	-
24	$1.0 \times 10^{-4}$	-
25	$1.2 \times 10^{-4}$	-
26	$1.5 \times 10^{-4}$	-
27	$3.0 \times 10^{-4}$	-
28	$4.5 \times 10^{-4}$	-
29	$6.0 \times 10^{-4}$	-
30	$9.0 \times 10^{-4}$	-



**Figura 4.** Curva de crescimento (Ln absorvância em 684 nm) em função do tempo experimental para *Kirchneriella contorta*. As concentrações de cobre nominal são em (a) entre  $3 \times 10^{-8}$  e  $1,5 \times 10^{-6}$ , (b) entre  $3 \times 10^{-6}$  e  $3 \times 10^{-5}$  e em (c) entre  $4,5 \times 10^{-5}$  e  $9 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.

A influência do cobre no crescimento de microalgas ocorre devido à sua participação em processos metabólicos vitais para esses organismos (Lombardi e Maldonado 2011). As microalgas realizam fotossíntese para sintetizar metabólitos necessários para o seu crescimento e reprodução (Malapascua et al. 2014). O cobre tem papel importante no processo fotossintético, participando, por exemplo, da estrutura de enzimas do fotossistema (Horváth et

al. 1998). Porém, em excesso o cobre pode interferir nas rotas metabólicas das microalgas e gerar espécies reativas de oxigênio (Tripathi e Gaur 2006). Isso pode levar à degradação de membranas das microalgas interferindo assim na divisão celular (Sekiguchi et al. 2005). Em nosso estudo essa etapa da prospecção do cobre suportável à célula é importante, pois a concentração ideal ou deletéria para as microalgas depende da espécie utilizada. O trabalho realizado por Levy et al. (2008) com a microalga *Phaeodactylum tricorutum* mostrou que o EC50 para essa espécie foi de  $1,2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre. Já os resultados de Sabatini et al. (2009) mostraram que a concentração de  $2,1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> era fatal para a *Chlorella kessleri*. Assim, estudos que entendam o efeito de diferentes concentrações de cobre em espécies não estudadas de microalgas são de grande relevância fisiológica e ambiental. Na tabela 1 mostramos as concentrações de cobre que foram testadas na microalga *K. contorta*.

A partir do programa Graph Pad Prism 6 os valores de EC 10, EC 20 e EC 50 foram calculados para a espécie *K. contorta*. Os valores obtidos foram EC10  $4,66 \times 10^{-6}$ , EC20  $5,78 \times 10^{-6}$  e EC50  $8,38 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. As concentrações selecionadas para o experimento de manipulação bioquímica são mostradas na Tabela 2 (controle  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$  e  $6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). As seis concentrações de cobre selecionadas foram abaixo do valor de EC20, a fim de manter-se as culturas saudáveis para a etapa seguinte.

**Tabela 2.** Cobre adicionado ao meio WC 24 horas antes da inoculação das células (cobre nominal) e concentrações de íons de cobre livre (mol L<sup>-1</sup>) determinados por ISE-Cu. \*Tratamento controle.

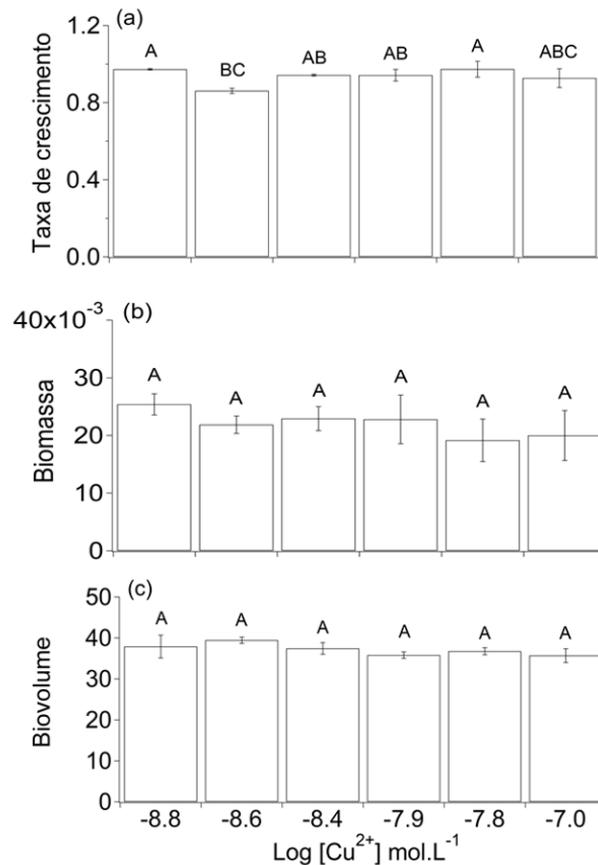
Nominal	Livre	log [Cu <sup>2+</sup> ] mol.L <sup>-1</sup>
* $4 \times 10^{-8}$	* $1,6 \times 10^{-9}$	*-8.8
$3 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-9}$	-8.6
$1 \times 10^{-7}$	$3,8 \times 10^{-9}$	-8.4
$1 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-8}$	-7.9
$3 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-8}$	-7.8
$6 \times 10^{-6}$	$9,6 \times 10^{-8}$	-7.0

#### 4.2 Manipulação bioquímica e fisiológica da *Kirchneriella contorta*

Nessa etapa foi realizada a manipulação bioquímica com o metal e diferentes cores de LEDs. Abaixo estão apresentados os resultados obtidos para as 6 concentrações trabalhadas.

#### 4.2.a Efeito do cobre e choque de cores de luz nos parâmetros de crescimento

A taxa de crescimento, biomassa seca e biovolume nas primeiras 48 h para *K. contorta* (luz branca) estão representadas na figura 5. Como esperado e de acordo com o tratamento preliminar, os parâmetros de crescimento em 48 h não apresentaram diferenças estatísticas entre as concentrações de cobre.



**Figura 5.** Parâmetros de crescimento obtidos em 48 h para culturas de *K. contorta*. (a) Taxa de crescimento em função do tempo experimental ( $d^{-1}$ ); (b) biomassa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ); (c) biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células em função da concentração de  $\text{log Cu}^{2+}$  livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Estatística: letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA  $p > 0,05$ ).

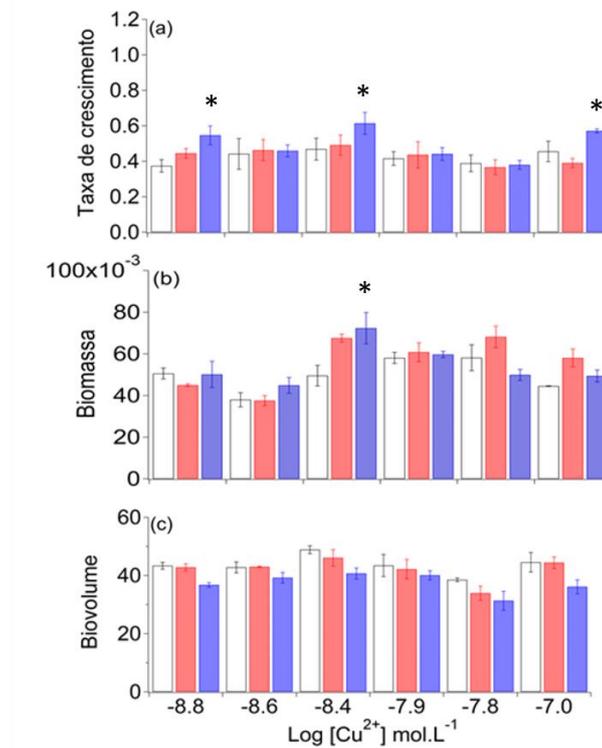
Provavelmente para *K. contorta* as concentrações trabalhadas estão dentro das toleradas fisiologicamente. Neste estudo, as concentrações de cobre livre estão dentro da ordem de  $10^{-9}$

e  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Essas concentrações são passíveis de serem encontradas nos ambientes aquáticos naturais (Davies e Bennett 1985) e provavelmente por isso, a microalga foi capaz de responder bem a essas variações.

O crescimento em exposição a diferentes qualidades de luz é alvo de diversos estudos (Yan et al. 2013; Hultberg et al. 2014; Atta et al. 2013; Rebolledo-Oyarce et al. 2019), tendo apresentado respostas diferentes entre as espécies (Teo et al. 2014). A figura 6 mostra as taxas de crescimento, biomassa seca e biovolume ao final da exposição dos LEDs nas cores azul e vermelho (96 h). Analisando o efeito das luzes dentro de cada concentração de cobre observa-se que a luz azul promoveu aumento da taxa de crescimento no controle e na maior concentração de Cu<sup>2+</sup> ( $9,7 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e da biomassa na concentração de Cu<sup>2+</sup> de  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Além disso, nas duas maiores concentrações de cobre livre, a luz vermelha resultou em maior biomassa final quando comparada com a luz branca e azul. Durante as 48 horas de exposição aos LEDs coloridos, a maior taxa de crescimento ( $\sim 0,6$  d<sup>-1</sup>) e de biomassa ( $\sim 70$  mg L<sup>-1</sup>) foi obtida na concentração de Cu<sup>2+</sup> de  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> em exposição à luz azul. Esses resultados estão de acordo com diversos trabalhos que analisam os efeitos de diferentes cores de luz no crescimento de microalgas (Teo et al. 2014; Rebolledo-Oyarce et al. 2019). De acordo com Teo et al. (2014) as microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. foram expostas a luz azul, vermelha, azul-vermelha e branca e apresentaram maiores taxas de crescimento na luz azul. Segundo a literatura, o LED azul permite uma maior penetração através da cultura (Vadiveloo et al. 2015; Schulze et al. 2016), melhorando a divisão celular e as taxas de crescimento das microalgas (Teo et al. 2014). Além disso, segundo Ruyters (1984), a luz azul consegue afetar um grande número de enzimas, sendo elas fotossintéticas e participantes de processos importantes, como a síntese de pigmentos e a fotorrespiração. Outro ponto de atenção que pode justificar as maiores taxas de crescimento sob exposição à luz azul é o estudado por Schulze et al. (2016). Esses autores observaram maiores taxas de absorção de nutrientes em exposição à luzes coloridas, entre elas vermelha e azul, sendo a absorção maior sob luz azul. Essa observação pode justificar as maiores taxas de crescimento quando *K. contorta* foi exposta ao comprimento de onda de 445 nm nas menores concentrações e 652 nm nas duas maiores concentrações de Cu<sup>2+</sup>.

Além da luz azul, alguns trabalhos pontuam o efeito positivo da luz vermelha no crescimento do fitoplâncton (Wang et al. 2007; Abiusi et al. 2014; Han et al. 2019). Em exposição a luz vermelha *Spirulina platensis* apresentou um aumento na biomassa final (Wang et al. 2007) e *Tetraselmis suecica* um aumento de 2,5 vezes na concentração celular (Abiusi et

al. 2014) em relação ao controle. Segundo os autores, a luz vermelha permite uma melhor absorção da clorofila (Wang et al. 2007). Vale pontuar que o efeito da qualidade da luz no crescimento é dependente da espécie avaliada e relacionado aos diferentes conteúdos de pigmentos e fotorreceptores presentes em suas respectivas composições (Abiusi et al. 2014).



**Figura 6.** Parâmetros de crescimento obtidos em 48 h de exposição a LEDs coloridos para culturas de *K. contorta*, totalizando 96 h de tempo experimental. Em (a) taxa de crescimento em função do tempo experimental ( $d^{-1}$ ); (b) biomassa seca ( $g L^{-1}$ ); (c) biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células em função da concentração de  $\text{log Cu}^{2+}$  livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Cores das barras representam as cores dos LEDs. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Asteriscos representam barras com diferença significativa entre os tratamentos.

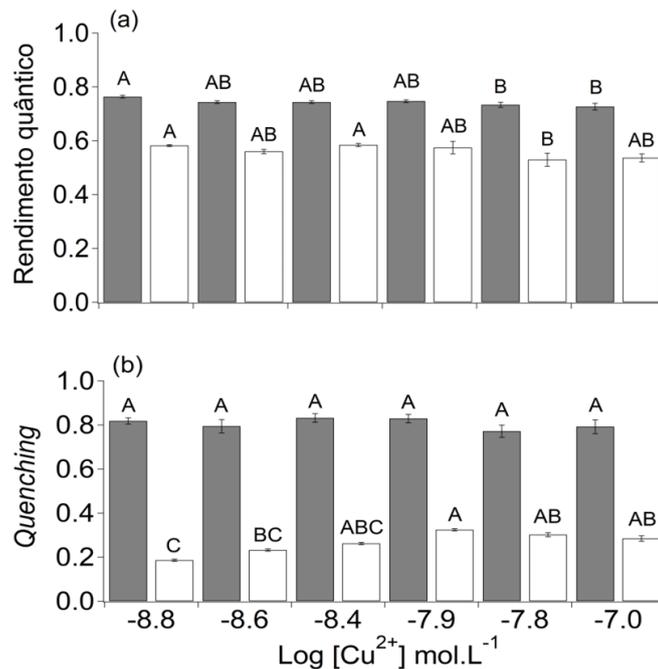
A qualidade da luz pode afetar o ciclo celular das microalgas resultando em mudanças morfológicas (Schulze et al. 2016). No nosso estudo, os menores valores de biovolume ocorreram em exposição à luz azul, concomitantemente aos maiores valores de taxas de crescimento (figura 2c). Estudando a morfologia celular em resposta à variação no espectro de luz, Schulze et al. (2016) observaram em ordem decrescente de área de superfície celular os tratamentos com luz branca, seguido por vermelho e azul para *Nannochloropsis oculata* e azul, vermelho e branco para *Tetraselmis chuii*. A mesma variação de acordo com a espécie foi observada por Aidar et al. (1994). Esses autores obtiveram maiores volumes celulares para

*Tetraselmis gracilis* em exposição à luz vermelha em comparação com a luz azul, e o inverso para *Cyclotella caspia*.

Em relação aos dados de viabilidade (não mostrados) as mesmas se mantiveram acima de 95%, tanto em 48 h quanto em 96 h. Esse comportamento era esperado, já que a amplitude da concentração de cobre usada foi cuidadosamente escolhida para não afetar o crescimento populacional.

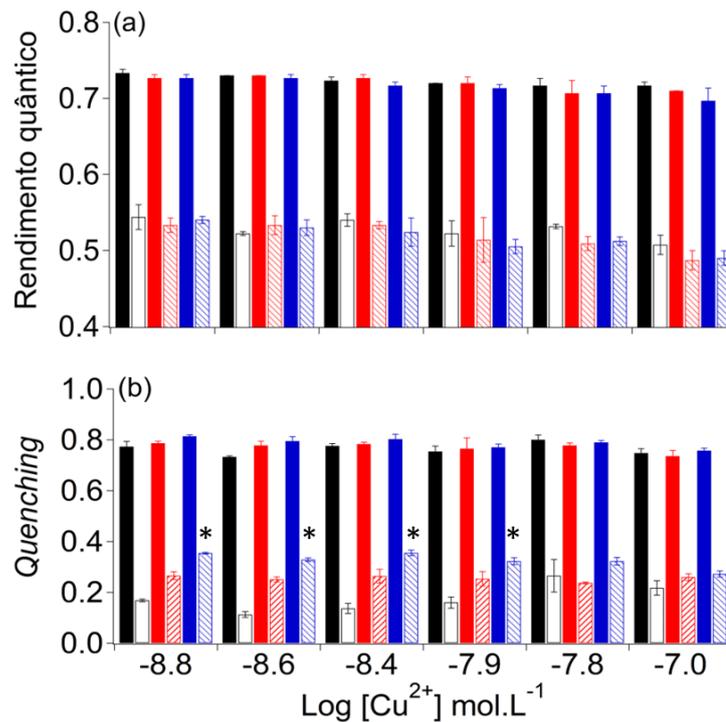
#### 4.2.b Efeito do cobre e choque de luz colorida nos parâmetros fotossintéticos

Nas figuras 7 e 8 estão mostrados os rendimentos quânticos e *quenchings* para *K. contorta*, no tempo de exposição de 48 h e 96 h, respectivamente.



**Figura 7.** Parâmetros de fluorescência do PSII em 48 h em função da concentração de cobre livre. Rendimento quântico (a) e *quenchings* (b). Símbolos da barra: Em (a) cinza, rendimento quântico máximo; branco, rendimento quântico operacional; Em (b) cinza, *quenching* fotoquímico (*qP*) e branco, *quenching* não fotoquímico dissipado na forma de calor (*NPQ*). Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Estatística: letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA  $p > 0,05$ ).

Os rendimentos fotossintéticos e *quenchings* fotoquímicos em 48 h não apresentaram diferenças significativas com o aumento da concentração de cobre. O *quenching* não fotoquímico (NPQ) apresentou aumento significativo (~ 30%) a partir da concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  de  $1,40 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . O aumento gradual do *quenching* não fotoquímico dissipado na forma de calor (NPQ) reflete alterações do aparato fotossintético. Resultado similar foi observado por Baracho et al. (2019), mas em concentrações de cobre mais elevadas. Esses autores observaram aumento de aproximadamente 81% da dissipação não fotoquímica na microalga *Chlorolobion braunii* em concentrações de cobre livre de  $\sim 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Esses resultados também estão de acordo com os encontrados por Echeveste et al. (2017) e Silva et al. (2018). As respostas fotossintéticas das microalgas refletem a saúde do cultivo. O aumento do cobre disponível resulta em um estresse oxidativo (Tripathi e Gaur 2006), afetando a transferência de prótons durante a fotossíntese (Dewez et al. 2005). Sabe-se que o aumento de NPQ é uma resposta da microalga aos estresses promovidos por mudanças ambientais, como variações das concentrações de nutrientes ou excesso de luz (López-Climent et al. 2008; Andersson et al. 2006; Ihnken et al. 2010). Essa resposta fotossintética da microalga evita o fluxo excessivo de elétrons para o PSI, diminuindo o risco de fotoinibição (Sonoike 2011).



**Figura 8.** Parâmetros de fluorescência do PSII obtidos em 48 h de exposição a LEDs coloridos para culturas de *K. contorta*, totalizando 96 h de tempo experimental, em função das concentrações de cobre testadas. Rendimento quântico (a) e quenchings (b). Símbolos da barra: Em (a) barras cheias, rendimento quântico máximo; barras hachuradas, rendimento quântico operacional; Em (b) barras cheias, quenching fotoquímico (qP) e hachuradas, quenching não fotoquímico dissipado na forma de calor (NPQ). As cores das barras representam as cores dos LEDs. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Asteriscos representam barras com diferença significativa entre os tratamentos.

Os rendimentos fotossintéticos e os *quenchings* fotoquímico não apresentaram diferenças significativas em função do choque de luz entre os tratamentos com cobre. Entretanto, dentro de cada concentração de cobre, o valor de NPQ aumentou em relação ao branco quando *K. contorta* foi exposta ao LED azul (2,4x maior) e vermelho (2x maior), com exceção das duas maiores concentrações. Segundo Das et al. (2011), a eficiência fotossintética no uso da energia luminosa é dependente do comprimento de onda recebido.

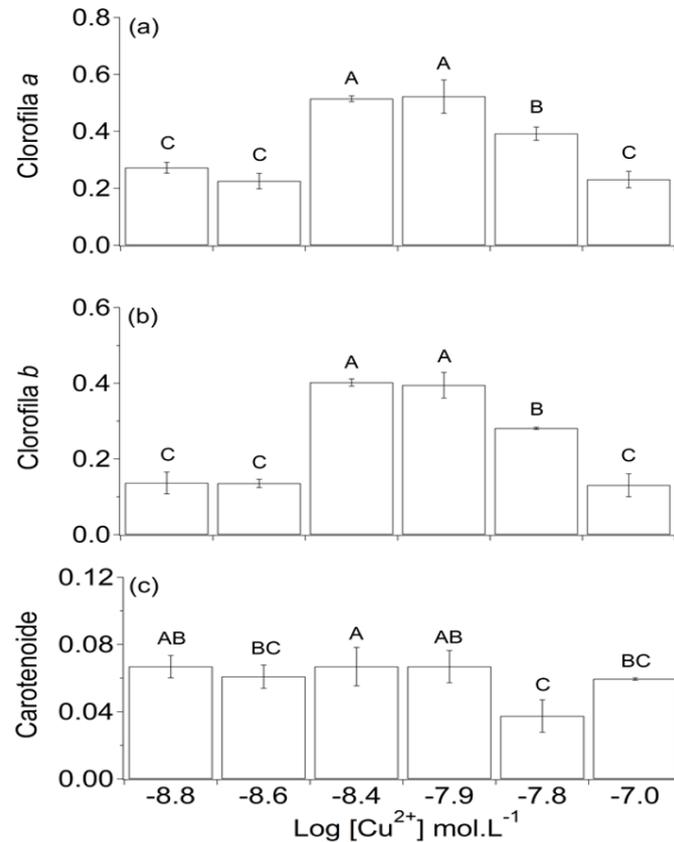
Em nosso estudo, até a concentração de cobre livre de  $1,4 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, os cultivos expostos à luz azul e vermelha apresentaram maiores NPQs que em LED branco. Isso sugere que até essas concentrações, o aumento de NPQ foi causado pela qualidade da luz. Sabe-se que as microalgas se adaptam ao meio circundante e isso reflete na sua fisiologia. Estudos indicam

que a fotossíntese pode ser beneficiada ou prejudicada pela qualidade da luz de maneira diferente entre as espécies algais (Mercado et al. 2004). Assim, as respostas fotossintéticas às diferentes qualidades de LEDs são dependentes das espécies estudadas. Os altos valores de NPQ em exposição à luz azul podem ser decorrentes da alta energia desse comprimento de onda, carregada pelos fótons e que finalmente atingem as algas (Kommareddy et al. 2003; Fu et al. 2012). É sabido que os fótons de comprimentos de ondas curtos, entre eles o azul (~ 460 nm), apresentam uma maior probabilidade de atingir o complexo de coleta de luz (Yan et al. 2013). Sendo assim, o fóton azul, por ser mais energético, pode resultar em um aumento de NPQ, em situações adversas, como mecanismo de defesa do aparato fotossintético (Matthijs et al. 1996; Baer et al. 2016). Essas observações vão de encontro ao descrito no trabalho de Mercado et al. (2004), que estudaram o efeito da luz azul na taxa fotossintética máxima ( $P_{max}$ ) e na irradiância de saturação de luz ( $E_k$ ) de cinco espécies de diatomáceas. Das cinco espécies, quatro apresentaram redução de  $P_{max}$  e todas apresentaram redução de  $E_k$  na presença da luz azul. Assim, o aumento de NPQ é uma resposta da microalga frente à alta energia dessa luz (azul), funcionando como um mecanismo de proteção da fotoinibição (Das et al. 2011; Yan et al. 2013).

Destacamos que na interação com o cobre nas duas maiores concentrações, as três cores de luz apresentaram valores semelhantes de NPQ. Sabe-se que o aumento do cobre pode resultar em danos oxidativos nas microalgas, devido à formação de espécies reativas de oxigênio (Pinto et al. 2003). Assim, sugerimos que nessas maiores concentrações, o aumento de NPQ possa ser uma resposta da microalga *K. contorta* ao sinergismo entre cobre e LED colorido.

#### *4.2.c Efeito do cobre e choque de luz na composição bioquímica*

A produtividade específica de pigmentos em 48 h em função da concentração de cobre está apresentada na figura 9.



**Figura 9.** Produtividade específica de pigmentos ( $\mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) em 48h para culturas de *K. contorta* em função das concentrações de cobre testadas. Em (a) clorofila a; (b) clorofila b; (c) carotenoides. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Estatística: letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA  $p > 0,05$ ).

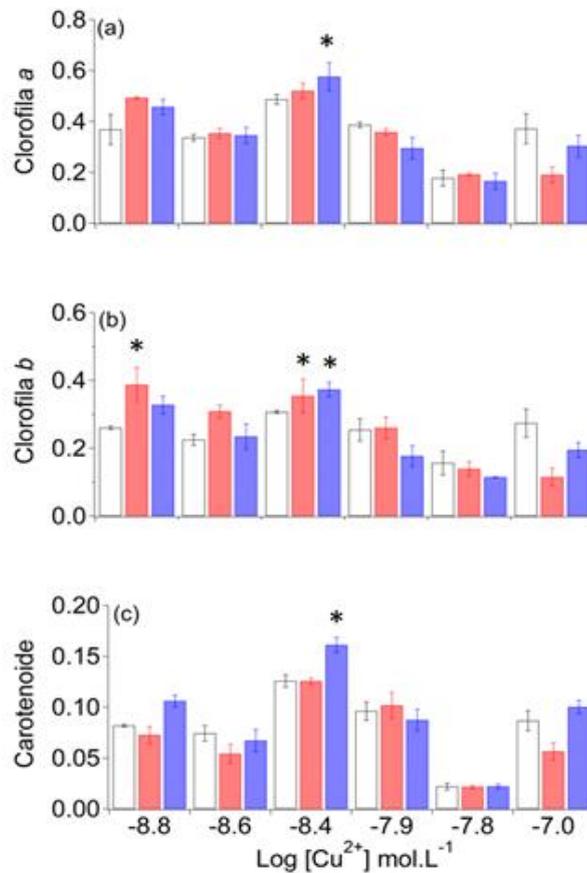
Para as clorofilas *a* e *b*, maiores produtividades foram encontradas em concentrações intermediárias de cobre (Chl *a*:  $\sim 0,52$ ; Chl *b*:  $0,40 \mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Carotenoide não apresentou diferença estatística com o aumento do cobre no meio de cultura.

O cobre é um micronutriente importante para os processos metabólicos das microalgas sendo requerido em quantidades adequadas (Lombardi e Maldonado 2011; Raven et al. 1999). Em nosso estudo, o aumento do cobre em concentrações até  $1,75 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  promoveu um aumento da produtividade específica de Chl *a* e *b*. O mesmo aumento do teor de clorofila foi encontrado para *Pseudokirchneriella subcapitata* (Bossuyt e Janssen 2004) e para *Phaeodactylum tricorutum* (Cid et al. 1995) em concentrações de  $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre total.

Em contrapartida, na maior concentração de cobre houve uma redução na produtividade de clorofila *a* e *b*. Esse resultado é corroborado pelo trabalho de Tripathi e Gaur (2006) que obtiveram redução do teor de clorofila *a* e *b* em *Scenedesmus sp.* em concentrações elevadas de cobre. Em concentrações de  $3,9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre total *Pseudokirchneriella subcapitata* também apresentou um ganho no teor de Chl *a*, entretanto com o aumento para concentrações de  $7,9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> ocorreu uma redução desse pigmento (Soto et al. 2011). No estudo de Purbonegoro et al. (2018) a concentração de  $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre reduziu a quantidade de clorofila *a* produzida por *Pavlova sp.* Casos assim confirmam que em altas concentrações o cobre deixa de ser um micronutriente benéfico e passa a ser tóxico (Tripathi e Gaur 2006). Assim, é importante trabalhar dentro de concentrações adequadas de cobre.

Em nosso trabalho não houve diferença na produtividade específica de carotenoides (48 h) entre os tratamentos de cobre. Diferente do encontrado neste estudo, em *Pseudokirchneriella subcapitata* o aumento de cobre ( $1,6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) resultou em um aumento de 6.7x de carotenoides (Bossuyt e Janssen 2004). No trabalho de Mallick (2004) as concentrações de cobre estimularam um aumento na síntese de carotenoides até a concentração de  $4,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> para a microalga *Chlorella vulgaris*

A produtividade das clorofilas *a* e *b* após a exposição por 48 h aos LEDs coloridos foram as menores a partir das concentrações de cobre de Cu<sup>2+</sup> de  $1,4 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Quanto aos carotenoides a concentração de  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> resultou no maior valor de produtividade específica independente da cor do LED quando comparada ao controle. Mas, a maior produtividade (50% maior em comparação ao tratamento com luz branca e cobre controle) de carotenoides foi obtida mediante interação sinérgica com cobre em concentração  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> e luz azul, como pode ser visto na figura 10C.



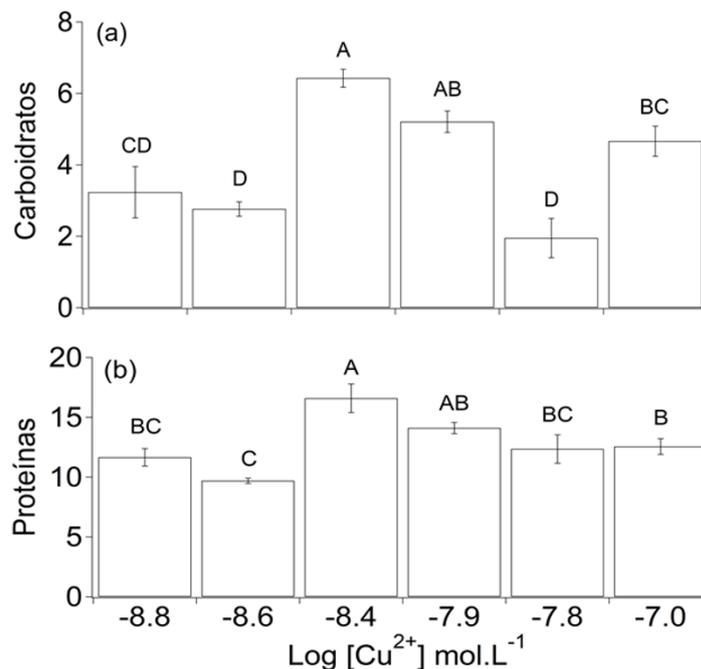
**Figura 10.** Produtividade específica de pigmentos ( $\mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) em 48h de exposição à LEDs coloridos para culturas de *K. contorta*, totalizando 96 h de tempo experimental em função das concentrações de cobre testadas. Em (a) clorofila a; (b) clorofila b; (c) carotenoides. Cores das barras representam as cores dos LEDs. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Asteriscos representam barras com diferença significativa entre os tratamentos.

Segundo literatura, as microalgas apresentam variação da composição de seus fotorreceptores, a qual é crucial para adaptação à variação natural da luz no ambiente (Chory et al. 2010; Shu et al. 2012). Há estudos que relatam diferenças no teor de pigmentos em resposta à exposição a diferentes qualidades de luz (Chen et al. 2010; Rebolledo-Oyarce et al. 2019). Para *K. contorta* o LED vermelho resultou em ganho na produtividade específica de Chl *a* e *b* no controle. Diferente deste estudo, em exposição ao LED azul a microalga *Tetraselmis suecica* obteve maiores rendimentos Chl *a* e *b* (Abiusi et al. 2014) e menores em luz vermelha. Esse aumento no teor de clorofila em exposição à luz azul também foi observado para *Nannochloropsis sp* (Vadiveloo et al. 2015), *Spirulina platensis* (Chen et al. 2010) e em

*Dunaliella tertiolecta* um aumento de ~14% (Rebolledo-Oyarce et al. 2019), todos em relação a luz branca.

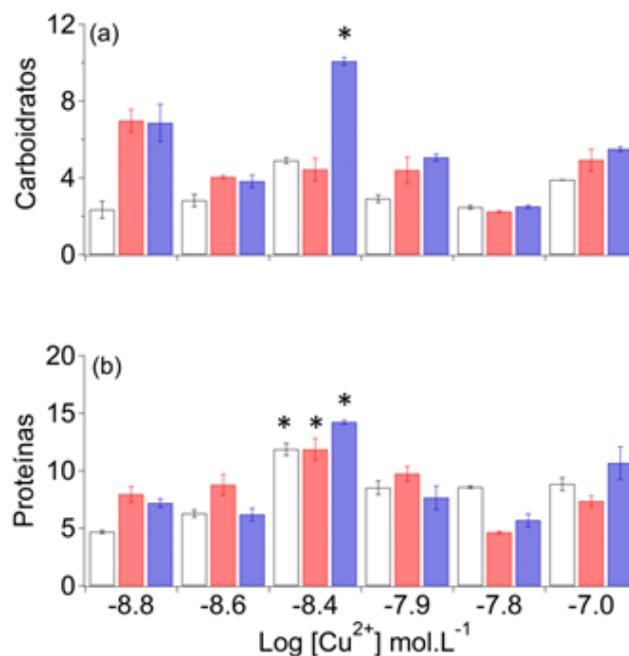
Neste estudo, mostramos que ocorreu um efeito sinérgico entre o cobre ( $\sim 4 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> livre) e a luz azul resultando em ganho de 22% a mais do que o controle na produtividade de carotenoides, como mostrado na figura 10. Trabalhos da literatura corroboram o efeito das diferentes cores de luz na produção de carotenoides (Lamers et al. 2008; Abiusi et al. 2014; Han et al. 2019). Entretanto o efeito parece ser dependente da espécie e cepa estudadas. Assim como neste estudo, a microalga *Haematococcus pluvialis* apresentou maior rendimento de carotenoide em exposição a luz azul (Suyono et al. 2015). Já no trabalho de Han et al. (2019), que também investigou *H. pluvialis*, a luz vermelha aumentou a produção de carotenoides em ~13%. Fu et al. (2013) combinaram luz vermelha e azul e relataram maior biossíntese de carotenóides (2,3x) em *Dunaliella salina*.

As produtividades específicas de carboidratos e proteínas estão mostradas nas figuras 11 e 12, em 48 e 96 h, respectivamente.



**Figura 11.** Produtividade de biomoléculas ( $\mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) em 48h para culturas de *K. contorta* em função das concentrações de cobre testadas. Em (a) carboidratos e em (b) proteínas. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Estatística: letras iguais acima das barras indicam diferença não significativa (ANOVA  $p > 0,05$ ).

Assim como os pigmentos fotossintéticos, a produtividade de carboidratos em 48 h foi maior nas concentrações de cobre intermediárias ( $3,8 \times 10^{-9}$  e  $1,4 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>). Em comparação com o controle, houve um aumento de carboidratos de 80% em  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> e de 47% em  $1,4 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A produtividade de proteínas também aumentou em células expostas à  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre, sendo 30% maior do que no controle. As mudanças que ocorrem na fisiologia das microalgas frente à exposição ao cobre (e outros metais) são consideradas mecanismos de defesa e incluem a produção de ligantes metálicos, diminuindo a biodisponibilidade (Pistocchi et al. 1997; Cobbett e Goldsbrough 2002). Silva et al. (2018) mostrou que em concentrações de cobre  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre nominal *Scenedesmus quadricauda* apresentou aumento da biossíntese de proteínas e carboidratos, mas em concentrações mais elevadas a literatura mostra que o efeito inibitório resulta em redução das biomoléculas (Tripathi e Gaur 2006).



**Figura 12.** Produtividade específica de biomoléculas ( $\mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) obtidos em 48 h de exposição a LEDs coloridos para culturas de *K. contorta*, totalizando 96 h de tempo experimental, em função das concentrações de cobre testadas. Em (a) carboidratos e em (b) proteínas. Cores das barras representam as cores dos LEDs. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Asteriscos representam barras com diferença significativa entre os tratamentos.

Considerando o efeito do cobre em diferentes cores de luz, mostramos que em geral, tanto o vermelho como o azul induziram ao aumento da produtividade de carboidratos. Aqui novamente observamos que sob luz azul e  $3,8 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> livre a maior produtividade de

carboidratos ( $\sim 9 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida, representando 51% a mais que no controle. Na concentração de cobre controle, e exposição à luz azul e vermelha  $\sim 7 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de carboidratos foi obtida. A literatura mostra que o efeito da qualidade de luz no teor de carboidratos em microalgas pode ser bastante variável. Por exemplo, em exposição à luz azul e vermelha a microalga *N. oculata* apresentou maior rendimento de carboidratos enquanto *T. chuii* foi somente sob luz vermelha (Schulze et al. 2016). Já, nenhum efeito foi observado em *Nannochloropsis sp* (Vadiveloo et al. 2015), mas *Tetraselmis suecica* apresentou redução de carboidratos sob luz vermelha quando comparadas com luz branca e azul (Abiusi et al. 2014). Podemos racionalizar que essas diferenças podem ser devidas, pelo menos em parte, às adaptações e história evolutiva das espécies.

Em estudos de combinação de tratamentos de qualidade de luz, mas com os nutrientes nitrogênio e fósforo, Li et al. (2019) observaram que em privação dos nutrientes o teor de carboidratos em *Chlorella sp* variou conforme o dia de amostragem. Segundo os autores, essas variações ocorriam em respostas a variação de energia fornecidas pelas diferentes luzes. Para a luz azul, o maior rendimento de carboidratos foi obtido em 72 h e em condição repleta de nutrientes

Quanto às proteínas, novamente  $3,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  livre estimulou a produtividade de proteínas nas três cores de luz, alcançando valor máximo de  $\sim 12 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na luz azul. Mas, o efeito dos LEDs coloridos variou de acordo com a concentração de cobre livre no cultivo e com a cor da luz. No controle houve aumento de  $\sim 41\%$  e em  $2,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\sim 30\%$  na produtividade de proteínas sob luz vermelha em comparação com a luz branca. Esse ganho no rendimento é maior do que o encontrado por Abiusi et al. (2014), que observaram que a luz vermelha promoveu um aumento de 5% de proteínas na microalga *Tetraselmis suecica*. Resultado semelhante foi observado para *Spirulina sp* onde houve um aumento de  $\sim 80\%$  em luz vermelha (da Fontoura Prates et al. 2020). Já em *Nannochloropsis sp*. as diferentes cores não resultaram em diferenças no teor de proteínas (Vadiveloo et al. 2015). O fato por nós observado, de que as maiores produtividades de proteínas deram-se em luz vermelha e as maiores taxas de crescimento em luz azul pode sugerir mecanismos diferentes de acúmulo da biomolécula e não necessariamente as proteínas produzidas sob luz vermelha sejam estruturais. Isso seria esperado se maiores teores de proteínas tivessem sido observados sob luz azul. De fato, em seu trabalho, Korbee et al. (2005) observaram maiores taxas de crescimento e de rendimento de proteínas estruturais na alga *Porphyra leucosticta* em exposição à luz azul. Como pontuado anteriormente, considerando as microalgas fototróficas, os diversos grupos estão

adaptados diferentemente à variação da luz ambiental (Baer et al. 2016), o que por si só já pode resultar em variabilidade nas respostas das algas.

Nossos resultados mostram claramente um efeito sinérgico na produção de biomoléculas, sejam elas, carotenóides, proteínas ou carboidratos quando se associa cobre com luz azul. Particularmente para *K. contorta*, a concentração do metal que resultou nos maiores valores de biomoléculas foi  $3,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ .

## 5. Conclusão

O metabolismo de *Kirchneriella contorta* foi afetado pela combinação de estresse, expondo-a ao cobre e LED azul ou vermelho. Variação de cobre no cultivo não resultou em mudanças nos parâmetros de crescimento, mas este em combinação com luz azul promoveu maiores taxas de crescimento na microalga.

O aparato fotossintético mostrou-se sensível às mudanças na qualidade da luz e à presença do cobre na amplitude de concentrações usada. A partir de  $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  houve um aumento da dissipação não fotoquímica NPQ, mas que conseguiu superar o estresse, mantendo os rendimentos fotossintéticos similar ao controle. O efeito sinérgico não ocorreu somente na produção de biomoléculas, mas também refletiu-se no aumento de NPQ, que ocorreu quando as células foram expostas aos LEDs azul e vermelho.

Em relação à composição bioquímica, clorofilas *a* e *b*, carboidratos e proteínas apresentaram maiores produtividades em concentrações intermediárias de cobre nas primeiras 48 h de cultivo. Na concentração de  $3,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  livre e exposição à luz azul ou vermelha, aumento de mais de 50% na produtividade de carotenoides, carboidratos e 30% de proteínas foi obtido sem detrimento da taxa de crescimento e, portanto, mesmo produzindo mais biomoléculas, permaneceu a geração de biomassa algal.

Mostramos que, se fornecidos em quantidade correta, o cobre pode estimular a produtividade de biomoléculas, e que essa produtividade pode ser magnificada por sinergismo mediante a combinação de estímulos/estresses, apresentado aqui como cobre e LED azul. Essa dupla mostrou-se ótima ferramenta para a manipulação bioquímica e crescimento de *Kirchneriella contorta*.

## 6. Referências

- Abiusi, F., Sampietro, G., Marturano, G., Biondi, N., Rodolfi, L., D'Ottavio, M., & Tredici, M. R. (2014). Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnology and bioengineering*, *111*(5), 956-964.
- Afkar, E., Ababna, H., & Fathi, A. A. (2010). Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. *American Journal of Environmental Sciences*, *6*(3), 230.
- Aidar, E., Gianesella-Galvão, S. M. F., Sigaud, T. C. S., Asano, C. S., Liang, T. H., Rezende, K. R. V., ... & Sandes, M. A. L. (1994). Effects of light quality on growth, biochemical composition and photo synthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher. *Journal of experimental marine biology and ecology*, *180*(2), 175-187.
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, *97*(2), 253-261.
- Andersson, M., Schubert, H., Pedersén, M., & Snoeijs, P. (2006). Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology*, *149*(3), 653-665.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, *148*, 373-378.
- Baer, S., Heining, M., Schwerna, P., Buchholz, R., & Hübner, H. (2016). Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. *Algal research*, *14*, 109-115.
- Baracho, D. H., Silva, J. C., & Lombardi, A. T. (2019). The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorobion braunii*. *Journal of Phycology*, *55*(6), 1335-1347.
- Beauvais-Flück, R., Slaveykova, V. I., & Cosio, C. (2019). Comparative study of Cu uptake and early transcriptome responses in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the macrophyte *Elodea nuttallii*. *Environmental Pollution*, *250*, 331-337.
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, *2*(4), 333-340.

- Bossuyt, B. T., & Janssen, C. R. (2004). Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic toxicology*, 68(1), 61-74.
- Camacho, F., Macedo, A., & Malcata, F. (2019). Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. *Marine drugs*, 17(6), 312.
- Chen, H. B., Wu, J. Y., Wang, C. F., Fu, C. C., Shieh, C. J., Chen, C. I., ... & Liu, Y. C. (2010). Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 52-56.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., & Melao, M. D. G. G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(4), 1427-1438.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Maria da Graça, G. M., & Parrish, C. C. (2017). Phosphorus levels determine changes in growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* during cadmium stress. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 1883-1891.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. D. G. G., & Parrish, C. C. (2013). Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 48(1), 1-11.
- Chory, J. (2010). Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *The Plant Journal*, 61(6), 982-991.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., & Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic toxicology*, 31(2), 165-174.
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology*, 53(1), 159-182.
- Das, P., Lei, W., Aziz, S. S., & Obbard, J. P. (2011). Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*, 102(4), 3883-3887.
- da Fontoura Prates, D., Duarte, J. H., Vendruscolo, R. G., Wagner, R., Ballus, C. A., da Silva Oliveira, W., ... & Costa, J. A. V. (2020). Role of light emitting diode (LED) wavelengths on increase of protein productivity and free amino acid profile of *Spirulina* sp. cultures. *Bioresource Technology*, 123184.

- Davies, D. J. A., & Bennett, B. G. (1985). Exposure of man to environmental copper—An exposure commitment assessment. *Science of the total environment*, 46(1-4), 215-227.
- Debelius, B., Forja, J. M., DelValls, Á., & Lubián, L. M. (2009). Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(5), 1503-1513.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., & Popovic, R. (2005). Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic toxicology*, 74(2), 150-159.
- de Abreu, F. C., da Costa, P. N., Brondi, A. M., Pilau, E. J., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., ... & Garcia, J. S. (2014). Effects of cadmium and copper biosorption on *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(4), 405-409.
- Echeveste, P., Silva, J. C., & Lombardi, A. T. (2017). Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. *Ecotoxicology and environmental safety*, 143, 228-235.
- Fabisiak, J. P., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Borisenko, G. G., Korotaeva, A., Pitt, B. R., ... & Kagan, V. E. (1999). Redox regulation of copper–metallothionein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 363(1), 171-181.
- Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsón, G., Andrésson, Ó. S., Palsson, B. Ø., & Brynjólfsón, S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), 2395-2403.
- Galasso, C., Gentile, A., Orefice, I., Ianora, A., Bruno, A., Noonan, D. M., ... & Brunet, C. (2019). Microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: A focus on cancer prevention and interception. *Nutrients*, 11(6), 1226.
- G. Georgopoulos, A. Roy, MJ Yonone-Lioy, RE Opiekun, PJ Lioy, P. (2001). Environmental copper: its dynamics and human exposure issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 4(4), 341-394.
- Gong, Y., & Miao, X. (2019). Short chain fatty acid biosynthesis in microalgae *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Marine drugs*, 17(5), 255.
- Guillard, R. R., & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide, *Journal of Phycology*, 8(1), 10-14.

- Han, S. I., Kim, S., Lee, C., & Choi, Y. E. (2019). Blue-Red LED wavelength shifting strategy for enhancing beta-carotene production from halotolerant microalga, *Dunaliella salina*. *Journal of Microbiology*, *57*(2), 101-106.
- Horváth, G., Arellano, J. B., Droppa, M., & Barón, M. (1998). Alterations in Photosystem II electron transport as revealed by thermoluminescence of Cu-poisoned chloroplasts. *Photosynthesis research*, *57*(2), 175-181.
- Hultberg, M., Jönsson, H. L., Bergstrand, K. J., & Carlsson, A. S. (2014). Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, *159*, 465-467.
- Ihnken, S., Eggert, A., & Beardall, J. (2010). Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. *Aquatic Botany*, *93*(3), 185-194.
- Juneau, P., El Berdey, A., & Popovic, R. (2002). PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *42*(2), 155-164.
- Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual review of plant biology*, *64*, 583-607.
- Khalaj, M., Kamali, M., Khodaparast, Z., & Jahanshahi, A. (2018). Copper-based nanomaterials for environmental decontamination—an overview on technical and toxicological aspects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *148*, 813-824.
- Kommareddy, A., & Anderson, G. (2003). Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). In *2003 ASAE Annual Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers. *Ecotoxicology and environmental safety*, *148*, 813-824.
- Korbee, N., Figueroa, F. L., & Aguilera, J. (2005). Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *80*(2), 71-78.
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2008). Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in biotechnology*, *26*(11), 631-638.

- Levy, J. L., Angel, B. M., Stauber, J. L., Poon, W. L., Simpson, S. L., Cheng, S. H., & Jolley, D. F. (2008). Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquatic toxicology*, 89(2), 82-93.
- Levy, J. L., Stauber, J. L., & Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, 387(1-3), 141-154.
- Li, D., Yuan, Y., Cheng, D., & Zhao, Q. (2019). Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of *Chlorella* sp. AE10. *Bioresource technology*, 291, 121783.
- López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2011). Effects of cadmium on gas exchange and phytohormone contents in citrus. *Biologia Plantarum*, 55(1), 187-190.
- Lombardi, A. T., Hidalgo, T. M. D. R., Vieira, A. A. H., & Sartori, A. L. (2007). Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia*, 46(1), 74-78.
- Lombardi, A. T., & Maldonado, M. T. (2011). The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis research*, 108(1), 77-87.
- Lombardi, A. T., Vieira, A. A., & Sartori, L. A. (2002). Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). *Journal of Phycology*, 38(2), 332-337.
- Lunka, A. A., & Bayless, D. J. (2013). Effects of flashing light-emitting diodes on algal biomass productivity. *Journal of applied phycology*, 25(6), 1679-1685.
- Malapascua, J. R., Jerez, C. G., Sergejevová, M., Figueroa, F. L., & Masojídek, J. (2014). Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquatic biology*, 22, 123-140.
- Mallick, N. (2004). Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 161(5), 591-597.
- Matthijs, H. C., Balke, H., Van Hes, U. M., Kroon, B. M., Mur, L. R., & Binot, R. A. (1996). Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnology and bioengineering*, 50(1), 98-107.

- Mercado, J. M., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Correa-Reyes, G., Lubián, L., Montero, O., & Figueroa, F. L. (2004). Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 78(3), 265-277.
- Olle, M., & Viršile, A. (2013). The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and food science*, 22(2), 223-234.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae 1. *Journal of phycology*, 39(6), 1008-1018.
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Balboni, V., & Boni, L. (1997). Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *European journal of phycology*, 32(2), 125-132.
- Purbonegoro, T., Puspitasari, R., & Husna, N. A. (2018, February). Toxicity of copper on the growth of marine microalgae *Pavlova* sp. and its chlorophyll-a. In *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* (Vol. 118, p. 012060).
- Raven, J. A., Evans, M. C., & Korb, R. E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynthesis research*, 60(2-3), 111-150.
- Rebolledo-Oyarce, J., Mejía-López, J., García, G., Rodríguez-Córdova, L., & Sáez-Navarrete, C. (2019). Novel photobioreactor design for the culture of *Dunaliella tertiolecta*—Impact of color in the growth of microalgae. *Bioresource technology*, 289, 121645.
- Reynolds, C. S. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press. ISBN: 9780521605199. 552 p. 2006.
- Ruyters, G. (1984). Effects of blue light on enzymes. In *Blue light effects in biological systems* (pp. 283-301). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sabatini, S. E., Juárez, Á. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., & de Molina, M. D. C. R. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(4), 1200-1206.
- Sandmann, G., & Böger, P. (1980). Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 98(1), 53-59.
- Schaanning, M. T., Trannum, H. C., Øxnevad, S., & Ndungu, K. (2019). Benthic community status and mobilization of Ni, Cu and Co at abandoned sea deposits for mine tailings in SW Norway. *Marine pollution bulletin*, 141, 318-331.
- Schneider, M., Keiblinger, K. M., Paumann, M., Soja, G., Mentler, A., Golestani-Fard, A., ... & Zehetner, F. (2019). Fungicide application increased copper-bioavailability and

- impaired nitrogen fixation through reduced root nodule formation on alfalfa. *Ecotoxicology*, 28(6), 599-611.
- Schulze, P. S., Pereira, H. G., Santos, T. F., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., ... & Varela, J. C. (2016). Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Research*, 16, 387-398.
- Sekiguchi, A., Nishina, A., Kimura, H., Fukumoto, R. H., Kanoh, K., Ishihara, H., & Koketsu, M. (2005). Superoxide anion-scavenging effect of 2-amino-1, 3-selenazoles. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 53(11), 1439-1442.
- Shu, C. H., Tsai, C. C., Liao, W. H., Chen, K. Y., & Huang, H. C. (2012). Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(5), 601-607.
- Silva, J. C., Echeveste, P., & Lombardi, A. T. (2018). Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 161, 57-63.
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource technology*, 129, 51-57.
- Sonoike, K. (2011). Photoinhibition of photosystem I. *Physiologia plantarum*, 142(1), 56-64.
- Soto, P., Gaete, H., & Hidalgo, M. E. (2011). Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(2), 280-285.
- Sunda, W. G., & Lewis, J. A. M. (1978). Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri* 1. *Limnology and Oceanography*, 23(5), 870-876.
- Suyono, E. A., Pradani, L., Mu'avatun, U., Habiba, R. N., & Rohma, E. F. (2015). Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Procedia Environmental Sciences*, 28, 399-405.
- Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., & Idris, A. (2014). Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource technology*, 162, 38-44.

- Tripathi, B. N., & Gaur, J. P. (2006). Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma*, 229(1), 1-9.
- Vadiveloo, A., Moheimani, N. R., Cosgrove, J. J., Bahri, P. A., & Parlevliet, D. (2015). Effect of different light spectra on the growth and productivity of acclimated *Nannochloropsis* sp.(Eustigmatophyceae). *Algal research*, 8, 121-127.
- Voltolina, D., Nieves, M., Navarro, G., Oliva, T., Peraza, D. (1998). The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth, *Aquacultural Engineering*, 19(1), 7-15
- Wang, C. Y., Fu, C. C., & Liu, Y. C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21-25.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- Yan, C., Zhang, L., Luo, X., & Zheng, Z. (2013). Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. *Ecological Engineering*, 51, 24-32.
- Zhao, Y., Wang, J., Zhang, H., Yan, C., & Zhang, Y. (2013). Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process. *Bioresource technology*, 136, 461-468.