

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Estudo ecofisiológico e prospecção de cianobactérias: crescimento,
fotossíntese e composição bioquímica relacionados ao controle de
fatores abióticos**

Douglas Henrique Baracho da Silva

São Carlos – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Estudo ecofisiológico e prospecção de cianobactérias: crescimento, fotossíntese e composição bioquímica relacionados ao controle de fatores abióticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, com ênfase em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^ª Dra Ana Teresa Lombardi

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Célis-Plá

São Carlos, dezembro -2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Douglas Henrique Baracho da Silva, realizada em 21/12/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Suzelei Rodgher (UNESP)

Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi (UNIFESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela conclusão desta importante etapa da minha formação acadêmica.

À minha mãe, pelo amor e auxílio inestimáveis. Sem ela nada disso seria possível.

À professora Ana Teresa Lombardi, pela paciência, orientação e amizade. Mais do que uma orientadora, mas também uma mão amiga.

À professora Paula Celis-Plá pela co-orientação e disponibilidade por me receber.

Aos colegas de laboratório por todo o suporte e parceria. Um agradecimento aos que me receberam (Jaque, Grazi, Camila, Eduardo, Farid, Vini e Dani), aos que chegaram junto comigo (Rafael Barty e Tamires), aos intercambistas (Jenna, Suleiman e Michael) e aos que me viram partir (Murilo, Guilherme, Julia, Lucas, Leonardo, Camila, Dani, Rafa e Nico). Vocês foram essenciais.

Aos amigos da vida, (muitos dos quais também do lab) por estarem sempre dispostos a ouvirem sobre meus experimentos e minha rotina no lab. Em especial a Jaque por estar presente desde o ensino médio (e contando). Ao Ricardo por ter me dado apoio em todos os momentos em que precisei. Aos amigos da graduação (Andreza, Ariane, Beatriz, Belle Bruninho, Fábio, Ingrid, Jéssica, Julia, Linda, Luiza, Mari G, Mari R. Neda, Nilmara, Rê Valio, Shade e Talita). E por fim, os amigos que me acolheram nos últimos anos de São Carlos quando os amigos de sala começaram a ir embora: Aline, Isabeti, João G, João P, Joaquim, José A., José V., Laiza, Leon, Marcelo, Matheus, Vanessa e Viviane Kim.

Agradeço às crianças da minha vida: Alice, Gael, Kevin, Lorena, Lucas e Miguel. Que no futuro vocês possam ler essa tese e sentirem orgulho do tio de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN) e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pelo suporte a esta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

RESUMO

O estudo do fitoplâncton tem sido um campo de investigação crescente devido à versatilidade de uso desses organismos. Esta investigação tem como foco as cianobactérias, organismos procarióticos fotossintéticos, importantes sob os aspectos da ecologia e da biotecnologia. No campo biotecnológico podem ser fonte de produtos para a indústria alimentícia, cosmética, nutricional, têxtil, dentre outras. Entretanto, um número limitado de espécies é usado comercialmente. Este trabalho teve como objetivo estudar a fisiologia e composição bioquímica de cianobactérias, bem como avaliar a resposta fisiológica frente ao controle abiótico do cultivo. Realizamos inicialmente um trabalho de prospecção de 20 cepas, avaliando o crescimento, composição bioquímica (pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídios, potencial antioxidante, compostos fenólicos e polihidroxicarboxilatos), além de estudo da fotossíntese por meio da fluorescência da clorofila (rendimentos quântico, dissipação fotoquímica e parâmetros de curvas de luz). Em seguida, realizamos manipulação bioquímica da biomassa de uma espécie selecionada com base nos resultados da prospecção, *Nostoc* sp. A manipulação bioquímica constou da adição de cloreto de sódio ou cobre, ambos em conjunto com diodos emissores de luz nas cores azul, vermelho e verde. Os resultados mostraram grande versatilidade da cianobactéria *Nostoc* sp., mas também resiliências às variações das condições impostas aos cultivos. Em condições ideais de cultivo *Leptolyngbya* sp. e *Nostoc* sp. apresentaram maiores taxas de crescimento ($0,71 \text{ d}^{-1}$), mas *Phormidium* sp. e *Microcystis* sp. maior rendimento de biomassa ($0,8 \text{ g L}^{-1}$). A composição de pigmentos variou entre as espécies estudadas. As maiores porcentagens de proteínas na biomassa foram determinadas em *Geitlerinema unigranulatum* (60%), de carboidratos em *Microcystis navacekii* (30%) e de lipídios em *Phormidium* sp. (20%). Os teores de polihidroxicarboxilatos foram maiores (~2%) em *Aphanocapsa holsatica*, *Sphaerocavum brasiliense*, *Microcystis aeruginosa* e *Nostoc* sp. Os parâmetros fotossintéticos para as 20 espécies mantiveram-se constantes ao longo do tempo de cultivo. Em relação ao processo de manipulação em *Nostoc* sp. observamos que cloreto de sódio e cobre atuaram diferentemente nas biomoléculas. Em adição de NaCl as ficobilinas aumentaram (pelo menos 2x) e em adição ao Cu observamos aumento de clorofila *a* e carotenoides (maior 1,2x). Proteínas, carboidratos e lipídios por unidade de biomassa reduziram em ambos os estímulos químicos. As cores de luz não influenciaram esses parâmetros, mas alteraram a produção de compostos fenólicos (1,4x) e atividade antioxidante (2x). A luz azul resultou em maiores rendimentos quânticos máximos, $rETR_{max}$ e I_k , porém esses ganhos não se refletiram no crescimento populacional de *Nostoc* sp. Este estudo é uma contribuição para o entendimento da fisiologia de cianobactérias, bem como uma contribuição de novas cepas para uso biotecnológico.

Palavras-chave: Bioprospecção, Biotecnologia, cobre, NaCl, Biomoléculas, Fotossíntese.

ABSTRACT

The study of phytoplankton has been a growing field of investigation due to the versatility for using these organisms. This investigation focuses on Cyanobacteria, photosynthetic prokaryotic organisms, important under the aspects of ecology and biotechnology. In the biotechnological field, they can be a source of products for the food, cosmetics, nutraceuticals, textile industries, among others. However, a limited number of species are used commercially. This work aimed at studying the physiology and biochemical composition of cyanobacteria, as well as to evaluate the physiological response to abiotic control of cultivation conditions. Initially, we prospected 20 strains, evaluating growth, and biochemical composition (pigments, proteins, carbohydrates and lipids, antioxidant potential, phenolic compounds and polyhydroxyalkanoates), in addition to photosynthesis through chlorophyll fluorescence (quantum yields, photochemical quenching and rapid light curve parameters). Then, we performed biochemical manipulation of the biomass of a specific taxon, selected based on the prospecting results, *Nostoc* sp. The biochemical manipulation consisted of adding sodium chloride or copper, together with culture exposure to blue, red and green lights. The results showed great versatility of the cyanobacteria *Nostoc* sp., but also some resilience to variations in the conditions imposed on the cultures. Under ideal growing conditions *Leptolyngbya* sp. and *Nostoc* sp. reached higher growth rates ($0,71\text{ d}^{-1}$), but *Phormidium* sp. and *Microcystis* sp. higher biomass yield ($0,8\text{ g L}^{-1}$). Pigment composition varied among the studied species. The highest percent of proteins in the biomass were determined in *Geitlerinema unigranulatum* (60%), of carbohydrates in *Microcystis navacekii* (30%) and of lipids in *Phormidium* sp. (20%). Polyhydroxyalkanoate contents were higher ($\sim 2\%$) in *Aphanocapsa holsatica*, *Sphaerocavum brasiliense*, *Microcystis aeruginosa* and *Nostoc* sp. The photosynthetic parameters for the 20 species remained constant throughout the cultivation period. Regarding the manipulation process in *Nostoc* sp. we observed that sodium chloride and copper acted differently on the biomolecules. Sodium chloride led to increased phycobilins (at least 2x), whereas under copper increased (greater 1.2x) chlorophyll *a* and carotenoids were obtained. Proteins, carbohydrates and lipids per unit of biomass decreased in both chemical stimuli. Light colors did not influence these parameters but altered the production of phenolic compounds (1.4x) and antioxidant activity (2x). Blue light resulted in higher maximum quantum yields, rETR_{max} and I_k, but these gains were not reflected in the population growth of *Nostoc* sp. This study is a contribution to understanding the physiology of Cyanobacteria, as well as a contribution of new strains for biotechnological use.

Keywords: Bioprospecting, Biotechnology, copper, NaCl, Biomolecules, Photosynthesis.

LISTA DE FIGURAS:

CAPÍTULO I. ESTUDO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E FOTOSÍNTESE DE 20 ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS CULTIVADAS EM FOTOBIOREATOR CILÍNDRICO

Figura 1. Fotobiorreator (FBR) desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Algas, UFSCar.

Figura 2. Em (a) taxa de crescimento (d^{-1}) e em (b) biomassa seca ($g L^{-1}$) para as 20 cepas de cianobactérias em função do tempo experimental. Em (b) barras brancas representam a biomassa em 48h e as barras cinzas a biomassa seca em 144h. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$) e o asterisco (*) o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 3. Concentração de pigmentos das 20 espécies de cianobactérias cultivadas. Em (a) e (d) clorofila *a* ($ug mL^{-1}$); em (b) e (e) carotenóides totais ($ug mL^{-1}$); em (c) e (f) ficocianina ($ug mL^{-1}$). As barras brancas representam 48h e as barras cinzas 144h. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$) e o asterisco (*) o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 4. Biomoléculas totais ($ug mL^{-1}$) nas 20 espécies de cianobactérias cultivadas. Em (a) determinação em 48h e em (b) 144h de tempo experimental. As barras brancas representam os lipídios, as barras pretas os carboidratos e as barras cinzas as proteínas. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). O asterisco (*) representa o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 5. Percentual de PHA na biomassa das 20 cepas de cianobactérias cultivadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). O asterisco (*) representa o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 6. Atividade de eliminação de radicais das 20 cepas de cianobactérias cultivadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). O asterisco (*) representa o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 7. Matriz de correlação para informações do cultivo em fase exponencial de crescimento (48h): taxa de crescimento (Taxa), Biomassa seca e biomoléculas determinadas (clorofila *a* – Clor *a*, Ficocianina – Ficoc, Carotenoides – Carot, Carboidratos – Carb, Proteínas – Prot, Lipídios – Lip).

Figura 8. Rendimento quântico máximo (a) e rendimento quântico efetivo (b) em 48h (barras brancas) e 144h (barras cinza) de cultivo para as cianobactérias cultivadas no fotobiorreator. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

Figura 9. Dissipação fotoquímica (qP) em 48h (barras brancas) e 144h (barras cinza) de cultivo para as espécies de cianobactérias cultivadas no fotobiorreator. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

Figura 10. Parâmetros relacionados à fotossíntese obtidos após o ajuste de RLC de acordo com Platt et al. (1980). Em (a) $rETR_{max}$, μmol de elétrons $m^{-2} s^{-1}$, (b) α , μmol

de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em (c) I_k , μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). Linha tracejada indica taxas de crescimento.

CAPÍTULO II. UM PROCESSO DE MANIPULAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO CULTIVO DE *NOSTOC* sp. PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E BIOATIVIDADE

Fluxograma 1. Esquema experimental de manipulação bioquímica em cultivos de *Nostoc* sp. que tem duração total de 144h

Figura 1. Cultivos de *Nostoc* sp. em fotobiorreator cilíndrico ilustrando as cores de LED e revestimento com papel alumínio.

Figura 2. Taxas de crescimento para *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp. em função das concentrações de NaCl (a, b e c) e log de cobre (d, e, f).

Figura 3. Logaritmo natural da concentração de clorofila *a in vivo* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Nostoc* sp. em função do tempo experimental. Em (a) cultivos em meio BG11 normal, (b) com adição de NaCl e em (c) com adição de cobre. Cores dos pontos representam as cores dos LEDs. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

Figura 4. Biomassa seca (mg mL^{-1}) em 48h e 96 h em culturas da cianobactéria *Nostoc* sp. exposta a NaCl e cobre, e sob diferentes qualidades de LEDs. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de biomassa seca em 48h. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 5. Produção de clorofila *a* e carotenoides em *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96h. Em (a) clorofila *a* e em (b) carotenoides. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a concentração média de pigmentos em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 6. Ficobiliproteínas em *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96h de exposição. Em (a) ficocianina, (b) aloficocianina e em (c) ficoeritrina. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de ficobiliproteínas em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 7. Proteínas totais (a), carboidratos totais (b) e lipídios totais (c) em *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96 h. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de biomoléculas em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 8. Atividade antioxidante (DPPH) de *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96 h. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média da atividade DPPH em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 9. Conteúdo total de fenóis de *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96h de exposição. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de fenóis totais em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 10. Rendimento quântico máximo (a), rendimento quântico efetivo (b) e dissipação fotoquímica (c) para todos os tratamentos de cobre e sal em 48 h e 96 h. Linha tracejada representa o valor médio em 48 h de tempo experimental. Pontos pretos indicam exposição ao LED branco, azul ao LED azul, vermelho ao LED vermelho e verde ao LED verde. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

Figura 11. Curva rápida de luz em 48 h representada como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus radiação fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Círculo: BG11-N; triângulo: BG11-NaCl; ampulheta: BG11-Cu. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

Figura 12. Curvas rápidas de luz em 96 h: taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus radiação fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Em (a) BG11-N; (b) BG11-NaCl; (c) BG11-Cu. Linhas pretas, culturas expostas a LED branco; linhas azuis, LEDs azuis; linhas vermelhas, LEDs vermelhos; linhas verdes, LEDs verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

Figura 13. Parâmetros obtidos após o ajuste da RLC de acordo com Eilers e Peeters (1988). Em (a) α ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (b) $rETR_{\text{max}}$ ($\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (c) I_k ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em (d) E_{opt} ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média em 48h para cada condição de cultivo. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Figura 14. Matriz de correlação para informações do cultivo em fase exponencial de crescimento (48h). Símbolos- FC: Ficocianina; AL: Alococianina; FE: Ficoeritrina; FC+AL+FE = somatória das ficobiliproteínas; Fo: Fluorescência mínima em adaptação ao escuro; F_m: Fluorescência máxima em adaptação ao escuro; F_v: Fluorescência variável em amostras adaptadas ao escuro.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. ESTUDO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E FOTOSÍNTESE DE 20 ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS CULTIVADAS EM FOTOBIOREATOR CILÍNDRICO

Tabela 1. Espécies de cianobactérias investigadas neste estudo. Estão apresentados o código da cepa, meio de cultivo utilizado e respectivos valores de irradiância saturante (I_k). Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$).

Tabela 2. Composição porcentual (% BS) de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa seca das cianobactérias investigadas. Estatística: mesma letra indica que não houve diferença significativa (ANOVA, $P > 0,05$). Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$).

CAPÍTULO II. UM PROCESSO DE MANIPULAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO CULTIVO DE *NOSTOC* sp. PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E BIOATIVIDADE

Tabela 1: Concentrações nominais de cloreto de sódio (NaCl) e cobre (Cu) para o estudo preliminar de definição das concentrações a serem usados nos experimentos de manipulação bioquímica nas cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp.

Tabela 2. Teor de polihidroxicanoato como porcentagem em relação à biomassa seca em *Nostoc* sp. Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Tabela 3. Composição elementar (CHNS) em *Nostoc* sp. ao final de 144h de cultivo em exposição ao metal cobre ou cloreto de sódio, ambos em conjunto com diferentes qualidades de luz LED. Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$). Estatística: para cada elemento químico letras iguais indicam diferença não significativa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
°C	Grau Celsius
μ	Taxa de crescimento específica
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm^{-3}	Micrometro cúbico
a^* Chl <i>a</i>	Coefficiente de absorção específico para clorofila <i>a</i>
ANOVA	Análise de Variância
BHA	Hidroxil anisol butilado
BHT	Hidroxil tolueno butilado
C	Carbono
CCIBt	Coleção de Cultura do Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil
CH_2Cl_2	Clorofórmio
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
cm^{-1}	Por centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
d^{-1}	Por dia
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
I_k	Irradiância saturante
FBR	Fotobiorreator
F'_M	Fluorescência máxima das células adaptadas ao claro
F'_o	Rendimento mínimo de fluorescência da clorofila na presença de centros de reação abertos do fotossistema II
F_M	Fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro
F_o	Fluorescência inicial de adaptação ao escuro
F_v/F_m	Rendimento fotossintético máximo

Fv	Variação da fluorescência final em relação a inicial
g	Gramas
h	Hora
L	Litro
l	Comprimento do caminho óptico
LED	Diodos emissores de luz
m ⁻²	Por metro quadrado
min	Minuto
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
NPQ	Dissipação não-fotoquímica
OD	Densidade óptica
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
P B	Produtividade primária
PHA	Polihidroxialcanoatos
PS	Peso seco
PGE	Floroglucinol
qP	Dissipação fotoquímica
rETR	Taxa de transporte de elétrons relativa
rETR _{max}	Taxa máxima (relativa) de transporte de elétrons
RFU	Unidades de fluorescência relativa
RLC	Curvas rápidas de saturação de luz
rpm	Rotação por minuto
ROS	Espécie reativa de oxigênio
s ⁻¹	Por segundo
Φ _M	Rendimento quântico efetivo de PSII
α	Eficiência fotossintética

APRESENTAÇÃO

A tese aqui apresentada está estruturada da seguinte maneira: Introdução geral, Justificativas e Objetivos, seguidos de dois capítulos com seus respectivos Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. Ao final da tese apresentamos as Considerações finais e as Referências citadas em todo o trabalho.

Capítulo I. Apresentamos os resultados da prospecção de 20 espécies de cianobactérias cultivadas em fotobiorreator cilíndrico de alto rendimento sob condições que consideramos ideais de crescimento. Foram analisados dados de crescimento, composição bioquímica (proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos fotossintéticos, teor de polihidroxialcanoato), atividade antioxidante e parâmetros fotossintéticos.

Capítulo II. Apresentamos os resultados de crescimento de 3 espécies de cianobactérias em exposição ao NaCl e ao cobre como um estudo preliminar para definição das condições a serem adotadas para a manipulação bioquímica. Posteriormente são apresentados os resultados da manipulação bioquímica de *Nostoc* sp. frente à exposição aos agentes químicos NaCl e cobre durante 48 horas e subsequente crescimento em diferentes qualidades de LED (azul, vermelho e verde) por 96h adicionais. Nesses períodos foram analisados proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos fotossintéticos e compostos fenólicos, além de atividade antioxidante e parâmetros fotossintéticos. Também são reportados os dados de composição elementar CHNS e polihidroxialcanoato referentes ao último dia de cultivo nas condições de manipulação.

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 CIANOBACTÉRIAS E CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS	15
1.2 POTENCIALIDADES DA BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIAS	17
1.3 IMPORTÂNCIA DA PROSPECÇÃO DE NOVAS CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS	19
1.4 PARÂMETROS ABIÓTICOS DO CULTIVO	22
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	24
3 CAPÍTULO I.	26
ESTUDO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E FOTOSÍNTESE DE 20 ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS CULTIVADAS EM FOTOBIOREATOR CILÍNDRICO	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.3 RESULTADOS	35
3.4 DISCUSSÃO	45
3.5 CONCLUSÃO	57
4 CAPÍTULO II.	58
ESTUDO DA MANIPULAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>NOSTOC</i> sp. POR MEIO DE ALTERAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DA CULTURA	58
4.1 INTRODUÇÃO	59
4.2 METODOLOGIA	61
4.3 RESULTADOS	69
4.4 DISCUSSÃO	84
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6 REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CIANOBACTÉRIAS E CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

Nas últimas décadas a preocupação ambiental vem incentivando a busca por fontes sustentáveis para a produção de compostos com menor impacto ambiental (TORIBIO et al., 2020; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). Dentre as possibilidades, temos a utilização de seres vivos, como fungos, bactérias e plantas, e em destaque o fitoplâncton, como microalgas e cianobactérias (LI et al., 2018). Nesta tese, estudamos as cianobactérias.

Cianobactérias são organismos que possuem estrutura celular procarionte (KOMÁREK, 2003) e grande diversidade metabólica e morfológica (FRANSCSCHINI et al., 2010; PARMAR et al., 2011). Já foram descritas cerca de 2000 espécies distribuídas em ~ 150 gêneros (FRANSCSCHINI et al., 2010). Enquanto organismos unicelulares, existem em células únicas, planctônicas ou bentônicas, podendo formar agregados, com talos filamentosos, tricomas simples ou feixes com ou sem bainha (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Apresentam talo unicelular, colonial ou filamentoso (FRANSCSCHINI et al., 2010). A célula não possui um núcleo ligado à membrana e plastídios, sendo que o material genético e as membranas dos tilacóides fotossintéticos encontram-se dispersas no interior da célula (REYNOLDS, 2006). Graças à diversidade metabólica e fisiológica estão presentes em diversos ambientes (SANT'ANNA et al., 2004), sendo encontradas em habitats extremos, como desertos quentes e frios, lagos hipersalinos e fontes termais com temperaturas de até 70 °C (KOMÁREK, 2003). Existem registros fósseis desses organismos que datam de 3500 milhões de anos atrás (WHITTON, 2012) e sabe-se que desempenharam um papel importante na formação da geoquímica e da biosfera da Terra. É bem aceita a hipótese de que produziram oxigênio atmosférico no início do Proterozóico, permitindo a evolução de microorganismos aeróbicos (SHESTAKOV; KARBY SHEVA, 2017).

Nas cianobactérias a luz é a principal fonte de energia para o funcionamento metabólico (PAGELS et al., 2020a) realizando fotossíntese oxigênica e dependente de CO₂ (KOMÁREK, 2003). A partir da fotossíntese convertem compostos inorgânicos e energia luminosa em energia química (ATP) e reduzem NADP em NADPH, que será

usado para a fixação de carbono no ciclo de Calvin-Benson (BAILEY; GROSSMAN, 2008; PAGELS et al., 2020a) resultando em produção de matéria orgânica (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). A absorção da energia luminosa e a transferência de energia é feita pelos pigmentos fotossintéticos (PAGELS et al., 2020a) que estão localizados nas lamelas dos tilacóides (PAGELS et al., 2020a). Além disso, os pigmentos participam da defesa celular frente a estresses abióticos, como o excesso de luz, sendo responsáveis por manter o funcionamento saudável do aparato fotossintético (PAGELS et al., 2020a).

De modo similar às microalgas, as cianobactérias possuem como pigmento fotossintetizante a molécula de clorofila *a* (KOMÁREK, 2003). Além disso, possuem complexos proteicos conhecidos como ficobilissomas (PBS), que contém ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina (PAGELS et al., 2020a; ZITTELLI et al., 2022). Esses pigmentos estão presentes apenas em cianobactérias e algas vermelhas (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). A composição dos ficobilissomas e sua proporção na biomassa é espécie-específica e pode mudar pela foto-aclimação ou adaptação cromática (KOMÁREK, 2003).

Como organismos fotossintetizantes as cianobactérias respondem a mudanças nos fatores ambientais realizando ajustes nos parâmetros fotossintéticos. A fluorometria com pulso de amplitude modulada (PAM) é amplamente utilizada para determinações fotossintéticas *in vivo* do fitoplâncton (JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002). É uma técnica rápida e não invasiva para avaliar a fotossíntese em diferentes espécies e condições de cultivo. Entretanto, para cianobactérias alguns cuidados na utilização dessa técnica devem ser tomados, pois apresentam algumas particularidades em comparação com as microalgas verdes. Como esses organismos são procarióticos não existe separação entre a cadeia de transporte de elétrons fotossintética e a respiratória (ACUÑA et al., 2015; DOMINY; WILLIAMS, 1987). Assim, existe um compartilhamento entre o *pool* da plastoquinona, o complexo b6f e os carregadores de elétrons do lúmen (VERMAAS, 2015) e, esse compartilhamento resulta em oxidação apenas parcial da quinona primária do PSII durante a aclimação no escuro. Em se tratando de determinação de rendimento quântico máximo, quando as células são aclimatadas ao escuro, o compartilhamento dos espaços resulta em fluorescência basal mais alta do que em algas verdes (SCHUURMANS et al., 2015) e, por consequência menores valores do rendimento máximo. Além disso, existe um desbalanço nos teores de pigmentos entre o PSII e PSI. No fotossistema II estão presentes em maior quantidade as ficobiliproteínas e no

fotossistema I estão presentes em maior proporção a clorofila *a* (FALKOWSKI; RAVEN, 2007). Esta particularidade dos fotossistemas de cianobactérias resulta em diferenças nos rendimentos fotossintéticos de acordo com o espectro de luz de cultivo. Em cultivos com luz multicromática todos os pigmentos do PSII e PSI são estimulados. Entretanto, devido à especificidade da absorção dos pigmentos, em cultivos monocromáticos pode ocorrer um desbalanço na captação de luz entre o PSII e PSI (LUIMSTRA et al., 2018; PAGELS et al., 2020a), podendo gerar assim uma subestimação dos parâmetros fotossintéticos dependentes de aclimação no escuro.

1.2 POTENCIALIDADES DA BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIAS

A utilização da biomassa de cianobactérias tem grande potencial industrial (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). A partir da fotossíntese elas produzem biomoléculas para a sua sobrevivência, muitas das quais podem ser utilizadas na indústria alimentícia, cosmética, têxtil, entre outras. Na indústria alimentícia é sabido que podem ser fonte de proteínas, minerais e vitaminas para seres humanos e outros animais (DEVI et al., 1981; FONTES et al., 1987; RAJESHWARI; RAJASHEKHAR, 2011; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017; VARGAS et al., 1998). Cepas de *Spirulina*, *Anabaena* e *Nostoc* são consumidas como alimento pelo ser humano em muitos países (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Também podem ser utilizadas como fixadoras de nitrogênio atmosférico junto à agricultura, como produtoras de reguladores de crescimento para plantas e solubilizadoras de fosfatos (TORIBIO et al., 2020).

Biocombustíveis de terceira geração são derivados de microalgas eucarióticas e cianobactérias procarióticas (FARROKH et al., 2019; MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2013). Os lipídios e carboidratos podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2013; TSOLCHA et al., 2021). Além disso, carboidratos podem ser utilizados para processos fermentativos e lipídios como fonte de ômega-3 (TSOLCHA et al., 2021).

Os pigmentos de cianobactérias, como PBS, podem ser utilizados como sequestradores de radicais livres justificando seu uso na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (GALETOVIC et al., 2020). Esses pigmentos também podem ser usados como corantes em alguns produtos alimentícios (GALETOVIC et al., 2020).

Os metabólitos secundários são usualmente descritos como compostos que não são diretamente requeridos para o metabolismo primário (KOCH; FORCHHAMMER, 2021). Em cianobactérias, existe uma gama de atividades biológicas de metabólitos secundários já isolados que mostram capacidade antibacteriana, antifúngica, antiviral, dentre outras (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Esses metabólitos são específicos para cada espécie (KOCH; FORCHHAMMER, 2021) e provavelmente são usados para competir com outros organismos (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Inevitavelmente espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas por cianobactérias durante a fotossíntese e a respiração, gerando danos nas biomoléculas (KOCH; FORCHHAMMER, 2021). Para combater as ROS esses organismos utilizam mecanismos fotossintéticos de dissipação, como NPQ, ou podem produzir antioxidantes enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalases e peroxidases, bem como antioxidantes não enzimáticos como carotenoides, ficobiliproteínas e ácido ascórbico (KOCH; FORCHHAMMER, 2021). Esses antioxidantes são de interesse industrial, pois antioxidantes sintéticos, como o hidroxil anisol butilado (BHA) e o hidroxil tolueno butilado (BHT), são tóxicos (AYDAŞ; OZTURK; ASLIM, 2013; EL-ATY; MOHAMED; SAMHAN, 2014).

Em adição a todos os compostos que possam ser de interesse à saúde humana, a produção de materiais poliméricos de origem vegetal é uma meta para o futuro próximo. Já existe no mercado bioplásticos, como o ácido polilático (PLA), porém provenientes de fontes potenciais de alimento, como o milho (KOCH et al., 2020). O polihidroxialcanoato (PHA) pode ser uma fonte sustentável para os plásticos à base de petróleo, possuindo propriedades similares, mas sendo biodegradável (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009; KOCH et al., 2020). O PHA ocorre naturalmente em muitas espécies de cianobactérias, porém a maior produção ocorre em situação de desequilíbrio da disponibilidade de nutrientes (KOCH et al., 2020). Em situações de estresse, as fontes de carbono assimiladas são bioquimicamente processadas em unidades monoméricas de hidroxialcanoato, polimerizadas e então armazenadas na forma de inclusões insolúveis em água no citoplasma da célula (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009).

Além da riqueza de produtos que podem ser extraídos o cultivo de cianobactérias, microrganismos fotossintetizantes, tem diversas vantagens. Podem crescer em terras não aráveis e requerem menos nutrientes do que as plantas para consumo humano, assim não competindo com a agricultura e nem com a produção de alimento (GONÇALVES;

PIRES; SIMÕES, 2016). Ainda como vantagem das cianobactérias em comparação com as plantas, as primeiras apresentam altas taxas de crescimento e podem crescer em águas salobras ou do mar, podendo também ter suas necessidades nutricionais atendidas por águas residuais, melhorando a viabilidade econômica dos sistemas de produção (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2013). Somado a isto, elas participam da fixação de carbono, reduzindo assim esse gás na atmosfera (TANG et al., 2011; YAN et al., 2012).

1.3 IMPORTÂNCIA DA PROSPECÇÃO DE NOVAS CEPAS DE CIANOACTÉRIAS

Algumas cianobactérias já são produzidas comercialmente, como *Spirulina* para nutrição humana (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; ZHOU et al., 2018). Segundo BOROWITZKA (2013) a busca de bioprodutos extraídos de cianobactérias é um campo em expansão, muitos dos quais estão resultando em patentes. Como exemplos de patentes, temos métodos para controlar a proliferação de cianobactérias, o uso de moléculas bioativas e a melhoria por engenharia genética para a produção de biocombustíveis (BOROWITZKA, 2013).

Estudos que avaliam a composição de cianobactérias não são raros, mas em sua maioria focam em poucas espécies, como *Synechocystis* e *Spirulina platensis* (DEVI et al., 1981). Sabe-se que a composição bioquímica é variável entre as espécies (VARGAS et al., 1998) e por isso estudos que visem caracterizar novas cepas são de grande importância (TORIBIO et al., 2020). No trabalho de VARGAS et al. (1998) o teor de proteínas variou ~ 1,4x e de carboidratos ~ 2,4x entre as 12 cepas de cianobactérias estudadas.

Nas últimas décadas, características ecológicas, ultraestruturais e evidências moleculares influenciaram a classificação dos diversos gêneros (KOMÁREK, 2003). A análise filogenética de cianobactérias mostrou que são um filo diverso e monofilético (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Dentre os diferentes grupos de cianobactérias descrevemos abaixo algumas características gerais dos gêneros aqui estudados.

Aphanizomenon

Gênero composto por organismos com talo filamentoso e flutuante. Geralmente os talos são envoltos por mucilagem amorfa, pouco visível. As células vegetativas são diferenciadas com forma cilíndrica ou de barril. A multiplicação é vegetativa por fragmentação do tricoma. Em sua maioria são planctônicas de água doce, mas podem ocorrer em águas salobras (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Aphanocapsa

Esses indivíduos são compostos por células esféricas ou irregulares formando colônias mucilaginosas micro ou macroscópicas. As células, em sua maioria, não possuem envelope mucilaginoso individual. Colonizam principalmente subáreas, solos e habitats aquáticos. Presentes desde ambientes de água doce até marinhos e salobres (KOMÁREK, 2003).

Gleiterinema

Indivíduos desse gênero são formados por filamentos simples, raramente solitários. As células dos filamentos são cilíndricas e alongadas. Apresentam uma distribuição cosmopolita, vivendo em solos, em substratos, como macrófitas, ou no metafíton, em água doce ou salobra (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Gloeothece

As cianobactérias desse gênero estão dispostas de modo irregular e envoltas por seus próprios envelopes gelatinosos. Suas colônias são visíveis de micro até macroscopicamente. Apresentam células ovais ou cilíndricas. Estão presentes em sua maioria em rochas úmidas e poucas em corpos de águas claras, com muitas macrófitas e detritos (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Inacoccus

As espécies desse gênero são formadas por células hemisféricas e arredondadas. Se encontram solitárias ou em raras ocasiões agrupadas em colônias com poucas células. Possuem bainhas hialinas avermelhadas. Presentes em ambientes terrestres, crescendo em rochas e concreto (GAMA et al., 2019).

Leptolyngbya

Este gênero é formado por filamentos longos delgados. Podem ou não apresentar uma bainha gelatinosa, fina e firme. Os filamentos são formados por células cilíndricas.

Estão presentes mundialmente, sendo comuns em solos e sobre rochas, no perifíton e no metafíton de água doce e salgada (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Microcystis

Espécies desse gênero são formadas por talos coloniais e gelatinosos, dispostos em colônias micro ou macroscópicas. As células podem possuir diversos formatos, como discóides e ovais. Suas células estão dispostas de forma irregular e numerosas na mucilagem. Estão distribuídas mundialmente em ambientes de água doce e salobras (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Nostoc

São organismos dispostos em talos micro ou macroscópicos e gelatinosos. Possuem células cilíndricas, em forma de barril ou quase esféricas. Apresentam ampla distribuição podendo ser aquáticas ou terrestres. Podem estar fixas ou livres e algumas espécies são simbióticas (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Phormidium

São indivíduos formados por talos filamentosos e simples. Esses organismos apresentam mucilagem facultativa, podendo estar relacionada à condição ambiental. Suas células são cilíndricas ou em formato de barril. É um gênero cosmopolita, estando presente desde em rochas úmidas, macrófitas ou lodo (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Rhabdoderma

Organismos deste gênero se encontram dispostos em colônias microscópicas. Suas células quando jovens são esféricas e posteriormente alongadas. Apresentam envelope mucilaginoso (HONDA; AZEVEDO, 2004).

Sphaerocavum

As espécies desse gênero são formadas por colônias ocas, esféricas quando jovens, e posteriormente alongadas ou irregulares. Apresentam mucilagem. É um gênero subtropical e tropical. Estão presentes em ambientes eutróficos. Não apresentam toxicidade (SANT'ANNA et al., 2004).

Synechococcus

Esse gênero é caracterizado por células solitárias ou formando aglomerados irregulares e sem mucilagem. Suas células são cilíndricas ou ovais alongadas. Apresentam distribuição cosmopolita, mas algumas poucas são restritas. Estão presentes em substratos úmidos, como madeira e lama, podendo também crescer no perifíton e no metafíton em fontes termais e minerais (FRANSCSCHINI et al., 2010).

Trichormus

As espécies desse gênero são morfologicamente variáveis. Possuem filamentos ondulados, formando tricomas longos e irregularmente enrolados envoltos por um envelope mucilaginoso. Estão presentes desde ambientes bentônicos até no solo (RAJANIEMI et al., 2005).

Duas das espécies aqui estudadas não possuem taxonomia publicada. Portanto, aqui são identificadas pelo código da Coleção de Cultura do Instituto de Botânica, CCIBt3540 e CCIBt3157.

1.4 PARÂMETROS ABIÓTICOS DO CULTIVO

As cianobactérias são sensíveis às condições abióticas do meio em que estão inseridas. Devido à plasticidade fisiológica respondem às alterações químicas e físicas com mudanças em sua biomassa e metabolismo. São organismos sensíveis a variações no pH, intensidade luminosa, aeração, CO₂ e temperatura (PARMAR et al., 2011). Assim, testar e selecionar as condições de manutenção dos cultivos é de suma importância para qualquer estudo de fisiologia e de prospecção.

O fornecimento adequado da intensidade e qualidade luminosa é uma condição que para os organismos fotossintéticos precisa ser respeitada e corretamente definida (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). O crescimento desses organismos pode ser foto limitado ou foto inibido em intensidades luminosas abaixo ou acima das requeridas (EILERS; PEETERS, 1988; MACINTYRE et al., 2002). Déficit de luz interfere na produção de energia para o metabolismo essencial, prejudicando o crescimento (SCHAGERL; MÜLLER, 2006). Por outro lado, intensidades de luz inibitórias resultam em estresses oxidativos que podem levar, por exemplo, à degradação de membranas celulares (COULOMBIER et al., 2020). Ainda, referente à intensidade luminosa, cultivos cujo caminho óptico exceda certo tamanho podem sofrer com diferença na distribuição

de luz que atinge as células. Em se tratando de cultivos iluminados pelo sol células no fundo podem não receber intensidade de luz suficiente se forem muito profundos (FONTES et al., 1987).

A densidade celular do cultivo também deve ser levada em conta para manter a saúde das células. Com o aumento populacional a energia luminosa que cada célula recebe pode sofrer redução por meio de auto sombreamento das células da cultura (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Essa heterogeneidade de luz incidente pode gerar modificações bioquímicas, como mudança no teor de pigmentos (FONTES et al., 1987; VARGAS et al., 1998), dentre outras. Além disso, o aumento populacional tende a impactar na disponibilidade de nutrientes no cultivo e o fornecimento adequado de nutrientes, como metais e nitrogênio, influencia no crescimento desses organismos (LI et al., 2006; LOMBARDI; MALDONADO, 2011; SINETOVA et al., 2012; SUROSZ; PALINSKA, 2004). Culturas em batelada, por exemplo, podem chegar ao limite do suporte populacional por deficiência de nutrientes (SINETOVA et al., 2012).

O pH da cultura também é de suma importância para o crescimento saudável das espécies. Sabe-se que tanto a disponibilidade dos nutrientes como a especiação do carbono inorgânico é dependente do pH do meio de cultura (CHEN; DURBIN, 1994; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Com o crescimento do fitoplâncton o pH da cultura tende a aumentar e o carbono passa de bicarbonato para carbonato (CO_3^{2-}), que não é tão bem assimilado por esses organismos.

Pensando em produção industrial é interessante a seleção de espécies passíveis de serem cultivadas em larga escala. Entretanto, por enquanto um número limitado de espécies robustas capazes de serem mantidas em escalas ampliadas são descritas na literatura. É o caso dos gêneros *Spirulina* e *Dunaliella* (PARMAR et al., 2011). Cultivos extensos e abertos são normalmente expostos à maiores oscilações ambientais do que cultivos laboratoriais. Entre as limitações desses cultivos tem-se a susceptibilidade à contaminação, oscilação de temperatura e evaporação (TORZILLO et al., 1986; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). Para controlar essas adversidades, cultivos em reatores fechados são uma opção, pois permitem ajustes refinados para cada espécie (SCHUURMANS et al., 2015). Entretanto, são susceptíveis ao superaquecimento, um problema de difícil solução.

As condições abióticas vão determinar, junto com fatores intrínsecos de cada espécie, o período de crescimento exponencial e estacionário das culturas e o teor das biomoléculas presentes na biomassa. Em função do crescimento populacional cultivos em batelada sofrem com a diminuição da disponibilidade de nutrientes, resultando na diminuição da taxa de crescimento e teor de proteínas ao longo do tempo de cultivo (LI et al., 2018; VARGAS et al., 1998). Considerando essa plasticidade fisiológica, a partir do entendimento do efeito dos parâmetros ambientais no crescimento do fitoplâncton em geral, tem-se uma ótima ferramenta para processos de manipulação, visando aumentar o rendimento de biomoléculas de interesse industrial.

Assim, trabalhos que caracterizem diferentes cepas de cianobactérias a fim de identificar espécies promissoras, com potencial para a obtenção de biomoléculas, e selecionar condições abióticas que garantam e/ou estimulem a adequada qualidade da biomassa e um maior rendimento de biomoléculas são importantes para o desenvolvimento biotecnológico. Além disso, permitem entender as respostas desses organismos aos fatores que podem variar no ambiente e impactos ambientais de alterações climáticas, de contaminações, de eutrofização são melhor compreendidos.

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

As cianobactérias são organismos versáteis que suportam variação nas condições ambientais. Dadas as diferenças nas composições bioquímicas que as cianobactérias apresentam, o trabalho de prospecção tem papel importante na descoberta de novas cepas promissoras para a obtenção de biomoléculas. Conhecer sua composição e os bioprodutos resulta em possibilidade de aumentar a gama de cianobactérias que podem ser usadas comercialmente.

Para tanto, aqui garantimos que o processo de prospecção foi realizado em condições adequadas de cultivo, de modo que a composição bioquímica seja um reflexo de características intrínsecas, portanto, passíveis de serem replicadas nos setores industriais. Além disso, pensando na otimização de processos, objetivo central da indústria, propomos um processo de manipulação bioquímica baseado em estresse inicial

pela variação na composição química do meio de cultivo, seguida de variação na qualidade de luz de cultivo.

Esta pesquisa teve como objetivo principal contribuir com informações sobre a fisiologia e caracterização de cianobactérias, dentre as quais algumas descritas pela primeira vez. Aqui, avaliamos a composição de biomoléculas e bioprodutos de 20 cepas de cianobactérias, bem como estudamos a influência que um processo de manipulação exerceu nos diversos setores da célula, considerando *Nostoc* sp. Exemplificamos os setores celulares como a composição bioquímica, a fotossíntese e o potencial antioxidante, além do acúmulo de polihidroxialcanoatos, materiais de reserva com potencial uso em bioplásticos.

3 CAPÍTULO I.

ESTUDO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E FOTOSÍNTESE DE 20 ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS CULTIVADAS EM FOTOBIOREATOR CILÍNDRICO

RESUMO

As cianobactérias são organismos procarióticos com ampla diversidade morfológica e metabólica. Por meio da fotossíntese, elas convertem compostos inorgânicos em biomoléculas, muitas das quais de interesse comercial. Neste trabalho, avaliamos 20 linhagens de cianobactérias quanto aos seus aspectos fisiológicos como crescimento, fotossíntese e composição bioquímica, alguns aqui revelados pela primeira vez. Os organismos foram cultivados em fotobiorreatores cilíndricos (FBR) de alto desempenho por 144 h e a biomassa foi obtida. A luz no interior das culturas foi constante durante todo o tempo experimental e mantida na irradiância de saturação (I_k) de cada espécie. O pH da cultura foi mantido entre 7,8 e 8,4 por borbulhamento automático de CO_2 . A taxa de crescimento, e as concentrações de biomassa seca, clorofila *a*, carotenóides, ficocianina, proteínas, carboidratos, lipídios, polihidroxialcanoato (PHA) e atividade antioxidante foram determinados. Os parâmetros fotossintéticos também foram avaliados, em 48 h e 144 h. A proporcionalidade da composição bioquímica variou entre as espécies, assim como as taxas de crescimento. *Leptolyngbya* sp. e *Nostoc* sp. (CCIBt3249) apresentaram taxas de crescimento na faixa de 0,7-0,8 d^{-1} , sendo seguidas por *Rhabdoderma* sp. ($\sim 0,6 d^{-1}$), e *Phormidium* sp. ($\sim 0,5 d^{-1}$). Alto teor de carotenóides foi obtido em *Rhabdoderma* sp. ($4,0 \mu g mL^{-1}$) e ficocianina em *Leptolyngbya* sp. ($60 \mu g mL^{-1}$). Maiores quantidades de proteínas totais foram encontradas em *Geitlerinema unigranulatum* (64% BS), carboidratos em *Microcystis navacekii* (33% BS) e de lipídios em *Phormidium* sp. (20% BS). Além disso, *Aphanocapsa holsatica* apresentou a maior atividade antioxidante (65%) e *Sphaerocavum brasiliense*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc* sp. (CCIBt3249) e *A. holsatica* os níveis mais elevados de PHA ($\sim 2\%$ BS). Os parâmetros fotossintéticos mantiveram-se constantes indicando que as condições de cultivo estavam adequadas. Este estudo investigou 20 cepas de cianobactérias que podem impactar o ramo da biotecnologia, destacando cepas potenciais com alta produtividade de biomoléculas específicas.

palavras-chave: biotecnologia; proteínas; carboidratos; lipídios; pigmentos; ficocianina; carotenóides; polihidroxialcanoatos; antioxidantes; fotossíntese;

3.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o aumento da população mundial e a industrialização, a busca por fontes sustentáveis de matérias-primas para produtos do cotidiano tem tido um crescente interesse (TORIBIO et al., 2020; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). As cianobactérias podem ser consideradas como organismos promissores para a obtenção desses materiais (LI et al., 2018). São procariontes, metabólica e morfologicamente diversas e estão presentes em diferentes habitats, predominando em ambientes aquáticos (PARMAR et al., 2011). A partir da fotossíntese oxigênica são responsáveis por grande parte da fixação do dióxido de carbono atmosférico (TANG et al., 2011), um gás do efeito estufa (YAN et al., 2012).

As cianobactérias convertem compostos inorgânicos e energia luminosa em matéria orgânica (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). A absorção da energia luminosa é direcionada por pigmentos fotossintéticos, sendo eles clorofilas, carotenóides e ficobilinas, esta última presente apenas em cianobactérias e algas vermelhas (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). São várias as vantagens de gerar biomassa a partir desses organismos e entre elas, destaca-se a alta taxa de crescimento (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011) e a biofixação atmosférica de CO₂ (HALL et al., 1995). Além disso, podem ter sua produção acoplada a resíduos industriais gasosos ou cultivados em efluentes industriais (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2013) e assim ter seus custos de produção reduzidos.

Sabe-se que algumas cianobactérias são fonte de alimentação humana e animal devido ao seu alto teor proteico (USLU et al., 2013). Carboidratos de cianobactérias podem ser usados para produzir bioetanol e vários produtos de fermentação (KHAN; SHIN; KIM, 2018; WANG; YIN, 2018), além de lipídios para obter biodiesel (BILLER; ROSS, 2011; OLIVEIRA et al., 2018) e para a dieta humana, como o ômega-3 (PAGELS et al., 2020b; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2020). Além disso, pigmentos fotossintéticos como clorofila *a* (UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017), carotenóides (PANDEY; PANDEY, 2008; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017) e ficobiliproteínas (CORRÊA; TEIXEIRA, 2021; KHAN; SHIN; KIM, 2018) têm sua importância para a indústria nutricional e farmacêutica (WANG; YIN, 2018). Entre as novas possibilidades de uso da biomassa de cianobactérias está a produção de polihidroxicanoatos (PHA) para produção de bioplástico, como uma promessa para o

futuro (ROJA et al., 2019; YASHAVANTH; DAS; MAITI, 2021). No entanto, para obter essas biomoléculas, novas linhagens precisam ser caracterizadas em termos de produtividade e crescimento (ANSARI; FATMA, 2016; MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2018; OLIVEIRA et al., 2018; SHANMUGAM et al., 2020), bem como processos de produção otimizados visando maiores rendimentos (KHAN; SHIN; KIM, 2018; SHRIVASTAV; MISHRA; MISHRA, 2010; YASHAVANTH; DAS; MAITI, 2021). Portanto, a prospecção de cianobactérias torna-se fundamental para a descoberta de cepas promissoras, uma vez que a composição bioquímica entre as espécies é variável (VARGAS et al., 1998; WANG; YIN, 2018). Investigando sobre a composição bioquímica seremos capazes de conhecer toda a potencialidade das cianobactérias no contexto da biodiversidade nacional.

Além do conteúdo de biomoléculas intrínsecas de cada espécie, sabe-se que as proporções dessas moléculas variam em resposta às alterações abióticas no meio de cultura em que estão inseridas, como, por exemplo, a disponibilidade de nutrientes. Sabe-se que os cultivos em batelada são simples e suas condições internas variam ao longo do tempo (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Em seu trabalho VARGAS et al. (1998), observaram que a porcentagem de proteínas dobrou e a porcentagem de carboidratos diminuiu entre as fases de adaptação e exponencial em 12 espécies de cianobactérias. No trabalho de LI et al. (2018), a cianobactéria *Spirulina platensis* também apresentou variações na composição bioquímica ao longo do tempo. Os autores observaram uma redução na taxa de crescimento e uma diminuição de ~1,4x no teor de clorofila *a* entre os dias iniciais e o 10º dia de cultivo, justificando o efeito como resultado do consumo e consequente limitação de nutrientes (nitrogênio) no cultivo em batelada. Portanto, o controle das condições do cultivo, de modo a satisfazer as necessidades metabólicas em sistemas de produção de cianobactérias reflete na qualidade da biomassa final. Isso é particularmente importante para a produção industrial, pois a qualidade do produto precisa ser preservada.

Um fator determinante para o sucesso da produção de microalgas é o tipo de biorreator utilizado (KHAN; SHIN; KIM, 2018). O controle da intensidade da luz incidente, pH, aeração, CO₂ e temperatura reflete no rendimento e qualidade da biomassa (PARMAR et al., 2011). Por exemplo, culturas cultivadas em ambientes naturais e reatores abertos são mais suscetíveis à contaminação, flutuações de temperatura e evaporação (TORZILLO et al., 1986; UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017) do

que sistemas controlados. Além disso, cultivos com altas densidades ou com longo caminho óptico podem apresentar heterogeneidade na exposição de luz entre as células do cultivo (FONTES et al., 1987; HALL et al., 1995; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Para minimizar esse efeito, é essencial manter um fluxo constante de movimento na cultura. As cianobactérias podem usar CO_2 e HCO_3^- como fontes de carbono inorgânico e a dinâmica da especiação é controlada pelos valores de pH da cultura (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Com o crescimento celular o pH da cultura aumenta e, em $\text{pH} > 10$ o carbono é convertido em carbonato (CO_3^{2-}) (WETZEL; LIKENS, 2000), que não é tão bem assimilado pela maioria do fitoplâncton. Conseqüentemente, manter uma faixa de pH adequada é de fundamental importância para a boa nutrição das cianobactérias.

Os sistemas de cultivo abertos tendem a ser mais seletivos, devido às condições de difícil controle, como luz solar e contaminação biológica. Por outro lado, eles são menos propensos a problemas de aquecimento, uma vez que a evaporação é a forma natural de dissipação de calor. Portanto, um número limitado de culturas são bem sucedidas em sistemas abertos, como as de espécies dos gêneros *Spirulina* e *Dunaliella* (PARMAR et al., 2011). O crescimento bem-sucedido de cianobactérias em biorreatores fechados se deve a ajustes das propriedades inerentes do reator para acomodar de maneira ideal cada espécie (SCHUURMANS et al., 2015). Os fotobiorreatores fechados (FBR) apresentam vantagens sobre os abertos, pois possuem alta produtividade de biomassa e baixa probabilidade de contaminação (TORZILLO et al., 1986; YASHAVANTH; DAS; MAITI, 2021).

Considerando a grande diversidade de cianobactérias, o objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção de 20 espécies cultivadas em reatores tubulares, com foco no crescimento em condições ideais e no acúmulo de biomoléculas (proteínas, carboidratos, lipídios, clorofila *a*, carotenóides, ficocianina e polihidroxialcanoatos), bem como a atividade antioxidante de extratos metanólicos produzidos a partir da biomassa. Além disso, foram avaliados os parâmetros fotossintéticos (Φ_M , Φ'_M , qP e parâmetros da curva rápida de luz, RLC) ao longo do tempo experimental. Em nosso estudo, usamos um fotobiorreator de alto desempenho com ajustes internos para luz, pH, inserção de CO_2 e agitação da cultura por meio de borbulhamento e desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Algas, UFSCar (patente BR1020200239945). Como um sistema em escala de laboratório (2 L), o aquecimento não foi um problema nas condições utilizadas.

Nossos resultados são uma contribuição para o entendimento da fisiologia e da tecnologia de produção e uso comercial de novas espécies de cianobactérias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As 20 espécies de cianobactérias estudadas foram cedidas pela Professora Dra. Célia Leite Sant'anna, obtidas do Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. Todas as cepas (Tabela 1) são identificadas como CCIBt (Coleção de Cultura do Instituto de Botânica) e seu respectivo código.

Todas as cepas foram cultivadas em sala de cultivo com condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C). Dois tipos de meio de cultura foram utilizados, sendo eles o BG11 (RIPPKA, 1988) e o ASM-1 (GORHAM et al., 1964), referentes ao meio de cultivo em que as mesmas foram fornecidas e já estavam aclimatadas (Tabela 1). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (20 min, 121 °C, 1 bar; AV Phoenix Luferco, Brasil). Para todas as culturas o inóculo inicial em fase exponencial de crescimento foi $\sim 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila *a in vivo* determinada em um fluorômetro (Turner Designs, Trilogy, EUA). A duração total dos cultivos foi de 6 dias (144 h) para garantir maior biomassa de modo a permitir análise de PHAs.

Os cultivos foram realizados em um fotobiorreator (FBR) tubular de vidro borossilicato (figura 1). O FBR apresenta capacidade máxima de 3 L e cultivos de 2 L foram realizados e a iluminação ~~do cultivo~~ foi feita com diodos emissores de luz (LED) e realizada internamente. A intensidade luminosa foi determinada e mantida constante ao longo do tempo experimental ~~cultivo~~; o fotoperíodo foi de 12h claro:12h escuro. Cada espécie foi cultivada em sua respectiva irradiância saturante (tabela 1), previamente determinada a partir de curvas rápidas de luz. A agitação do cultivo foi feita por borbulhamento de ar por meio de bombas comerciais (Big Air, AZ30) com pedras porosas ao final do tubo de aeração. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,4. Após o início do experimento, o pH manteve-se ajustado pela inserção automática de CO₂ (25% v/v) em mistura com argônio (75% v/v). O sistema de inserção de CO₂ era ativado quando o pH da cultura atingia 8,4 e desligado em pH 7,8.



Figura 1: Fotobiorreator (FBR) desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Algas, UFSCar.

Tabela 1. Espécies de cianobactérias investigadas neste estudo. Estão apresentados o código da cepa, meio de cultivo utilizado e respectivos valores de irradiância saturante (Ik). Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média (n = 3).

Espécies	Código da cepa	Meio de cultivo	Ik μmol fótons m⁻² s⁻¹
<i>Gloeothece</i> sp.	CCIBt3513	ASM-1	57 (4,26)
<i>Aphanizomenon</i> sp.	CCIBt3148	ASM-1	293 (5,34)
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	CCIBt3231	BG11	148 (26,62)
<i>Nostoc</i> sp.	CCIBt3248	BG11	145 (2,46)
<i>Inacoccus carmineus</i>	CCIBt3411	ASM-1	196 (9,12)
Não identificado	CCIBt3540	ASM-1	79 (3,05)
Não identificado	CCIBt3157	BG11	241 (4,32)
<i>Aphanocapsa holsatica</i>	CCIBt3053	BG11	247 (4,30)
<i>Microcystis navacekii</i>	CCIBt3189	ASM-1	399 (5,48)
<i>Trichormus variabilis</i>	CCIBt3122	BG11	227 (2,77)
<i>Nostoc</i> sp.	CCIBt3206	BG11	146 (0,55)
<i>Synechococcus</i> sp.	CCIBt3050	BG11	238 (10,41)
<i>Microcystis</i> sp.	CCIBt3078	ASM-1	283 (2,56)
<i>Geitlerinema</i> sp.	CCIBt3241	BG11	259 (1,80)
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	CCIBt3179	BG11	340 (4,63)
<i>Phormidium</i> sp.	CCIBt3280	BG11	242 (15,47)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	CCIBt3174	BG11	135 (1,72)
<i>Rhabdoderma</i> sp.	CCIBt3165	BG11	275 (0,99)
<i>Nostoc</i> sp.	CCIBt3249	BG11	187 (4,91)
<i>Leptolyngbya</i> sp.	CCIBt1046	BG11	117 (16,21)

a) Parâmetros de crescimento

Diariamente foram coletados 3 mL de amostras para acompanhamento da absorbância em 684 nm e 570 nm, referente ao pico de absorbância da clorofila *a* e material particulado, respectivamente. As medições foram realizadas em um espectrofotômetro (NANOCOLOR, Macherey-Nagel, Germany). Diariamente também foram coletados 3 mL de cultura para determinação da concentração de clorofila *a in vivo* (Ca). A concentração de clorofila *a* foi determinada a partir de um fluorômetro digital (Turner Designs, Trilogy, EUA) e o cálculo da concentração do pigmento foi realizado a partir de uma curva de calibração feita com extrato de clorofila *a* obtido de uma cultura de *Chlorella sorokiniana*.

A taxa de crescimento (μ , d^{-1}) foi calculada considerando-se o intervalo de tempo de 0 a 48 horas, a partir de curvas de crescimento com base no logaritmo natural da clorofila *a in vivo* ($\mu g mL^{-1}$) versus o tempo de cultivo. O valor de μ é igual ao coeficiente angular do ajuste linear da curva durante a fase exponencial.

b) Composição bioquímica

A composição bioquímica foi determinada em 48h e 144h de cultivo. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, USA) durante 20 minutos em 4000 rpm. Para proteínas e carboidratos foram coletados 10 e 30 mL, respectivamente. Em seguida, seus respectivos *pellets* foram congelados (-80 °C) até posterior análise. A determinação de proteínas totais seguiu o protocolo de SLOCOMBE et al. (2013), com extração por ácido tricloroacético quente e solução alcalina e como solução padrão albumina bovina (2 mg mL^{-1}). Carboidratos totais foram determinados conforme o descrito em ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, (2013) com glicose como padrão. Para ficocianina 10 mL de cultura foram centrifugados e o pigmento determinado de acordo com YÉPRÉMIAN et al. (2017). Clorofila *a* e carotenoides foram quantificados a partir da filtração de 3 mL de cultura em filtro de acetato de celulose (Unifil, 0,22 μm) e determinado como proposto em WELLBURN (1994). O teor de lipídios totais foi determinado a partir da filtração de 100 mL de cultura em filtros de fibra de vidro (Sartorius - Germany), extração com clorofórmio e metanol e quantificação gravimétrica em uma balança microanalítica com 1 μg precisão (Mettler Toledo, XPE26). Por fim, para determinação de biomassa seca um volume de 10 mL foi coletado em 48h e 144h e filtrado em filtros de acetato de celulose (Unifil, 0,22 μm)

previamente mantidos em 100 °C em estufa (Qualxtron), e a massa aferida em uma balança de precisão (Mettler Toledo, XPE26).

A atividade antioxidante DPPH foi determinada em biomassa liofilizada com 144 h de tempo experimental. A extração foi realizada seguindo-se o método descrito em PIRES et al. (2017). Para cada amostra foram realizados três ciclos de extração com 1 mL de metanol, agitado em vortex com contas de vidro (*beads*, 2 mm) e posterior centrifugação (Legend XTR; Thermo Scientific, USA). O teor de PHA foi determinado em biomassa liofilizada obtida no último dia de cultivo. A extração e quantificação seguiu o método de COSTA et al. (2018), com rompimento celular com hipoclorito de sódio (4%), extração em clorofórmio quente, precipitação em metanol e evaporação do solvente em estufa.

c) Parâmetros fotossintéticos

Os parâmetros de fluorometria PAM foram medidos por meio de um fluorômetro de pulso de amplitude modulada (PHYTO-PAM II, Heinz Walz, Germany). Diariamente em células adaptadas ao escuro por 20 minutos foi determinado o rendimento quântico máximo (Φ_M) cujo cálculo seguiu a equação 1.

$$\Phi_M = F_m - F_o / F_m \quad (1)$$

O rendimento quântico efetivo (Φ'_M) e dissipação fotoquímica (qP) foram determinados em 48h e 144h de cultivo. Para tanto as células foram adaptadas à luz de mesma intensidade àquela incidente no cultivo e seguiram as equações descritas em JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC (2002), como descrito abaixo.

$$\Phi'_M = (F_{m'} - F_{S'}) / F_m \quad (2)$$

$$qP = F_{m'} - F_S / F_{m'} - F_{o'} \quad (3)$$

$$F_{o'} = F_o / ([F_v / F_m] + [F_o / F_{m'}]) \quad (4)$$

As curvas rápidas de luz (RLC) foram obtidas em 48h e 144h usando o PHYTO-PAM II. Para tanto, a amostra foi submetida a 20 pulsos de luz PAR a cada 20s. A taxa de transporte de elétrons relativa (rETR) foi calculada pela multiplicação da intensidade

PAR pelo rendimento quântico efetivo. As RLC foram ajustadas de acordo com o proposto por PLATT; GALLEGOS; HARRISON (1980) e o coeficiente de eficiência fotossintética (α), irradiância de saturação (E_k) e taxa relativa de transporte de elétrons máxima ($rETR_{max}$) foram obtidos.

d) Análise estatística e gráficos.

A estatística foi realizada utilizando-se o software MiniTab17. Os resultados foram analisados usando-se análise de variância (ANOVA) one-way e teste de Tukey com 95% de confiança para detectar diferenças significativas entre as espécies. Os gráficos foram feitos no programa IgorPro 6.0.5 (WaveMetrics, USA). A tabela de correlação foi produzida no programa Jamovi 1.2.27 usando os dados de 48h horas (fase exponencial).

3.3 RESULTADOS

a) Parâmetros de crescimento

A Figura 2 mostra os resultados do crescimento populacional, sendo a Fig. 2a as taxas de crescimento (μ) para as 20 espécies de cianobactérias cultivadas no PBR, e a Fig. 2b biomassa seca ($g L^{-1}$) das mesmas em 48h e 144h.

As taxas de crescimento entre as diferentes espécies variaram de 0,1 a 0,8 d^{-1} , com a maioria (65%) dentro de 0,3 – 0,5 d^{-1} . Os resultados mostram que apenas 5 cepas apresentaram taxas de crescimento superior a 0,5 d^{-1} . As espécies *Leptolyngbya* sp. (0,77 d^{-1}) e *Nostoc* sp. CCIBt 3249 (0,71 d^{-1}) destacaram-se com as maiores taxas de crescimento, seguidas de *Rhabdoderma* sp. (μ 0,62 d^{-1}), *M. aeruginosa* (μ 0,54 d^{-1}) e *Phormidium* sp. (μ 0,51 d^{-1}). *Gloeotheca* sp. e *Aphanizomenon* sp. apresentaram taxas de crescimento ~ 8x menores do que as duas espécies com as taxas mais altas. Em relação à biomassa seca, todas as espécies apresentaram aumento entre 48h e 144h, como esperado. Ao final do período experimental, quatro espécies se destacaram com maior produção de biomassa (~ 0,8 $g L^{-1}$), a saber, *Leptolyngbya* sp., *Rhabdoderma* sp., *Phormidium* sp. e *Microcystis* sp.

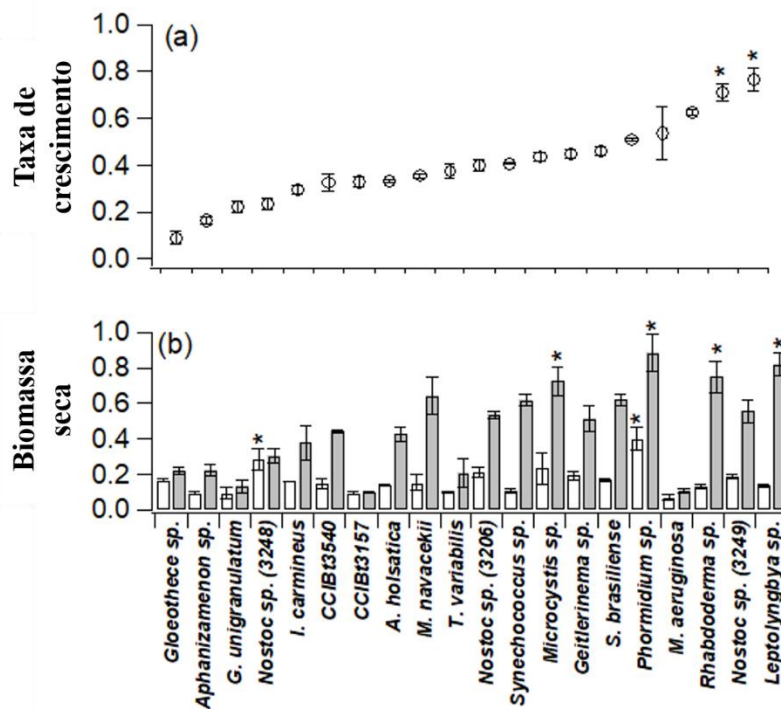


Figura 2. Em (a) taxa de crescimento (d^{-1}) e em (b) biomassa seca ($g L^{-1}$) para as 20 cepas de cianobactérias em função do tempo experimental. Em (b) barras brancas representam a biomassa em 48h e as barras cinzas a biomassa seca em 144h. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$) e o asterisco (*) o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

b) Composição bioquímica

A concentração dos pigmentos clorofila *a*, carotenóides e ficocianina em 48h e 144h são apresentadas na figura 3. Durante as primeiras 48h de cultivo, a cianobactéria *Phormidium sp.* apresentou a maior concentração de clorofila *a* ($\sim 5 \mu g mL^{-1}$). No entanto, ao final de 144h três espécies se destacaram como potenciais fontes de clorofila *a*, sendo elas *Leptolyngbya sp.* ($\sim 15 \mu g mL^{-1}$), seguido por *Rhabdoderma sp.* e *Phormidium sp.* ($\sim 11,5 \mu g mL^{-1}$). Em relação aos carotenóides totais (figura 3b e 3e), após 48h de cultivo, a maior concentração ($\sim 1 \mu g mL^{-1}$) foi encontrada em *Phormidium sp.*

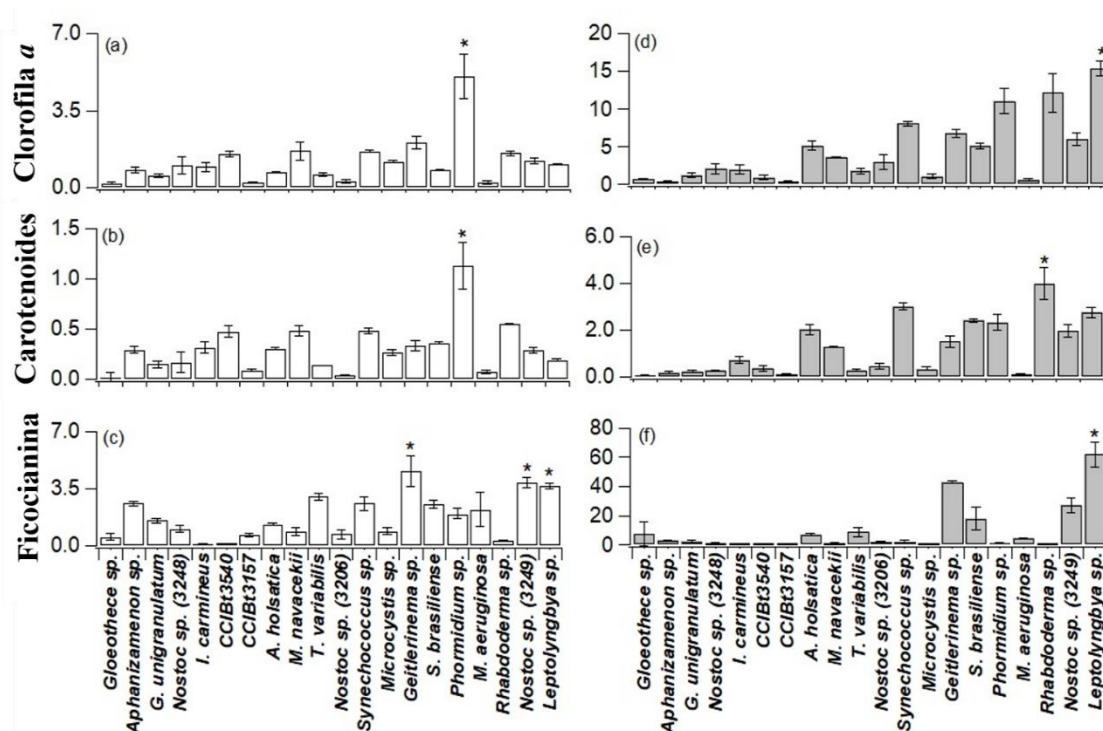


Figura 3. Concentração de pigmentos das 20 espécies de cianobactérias cultivadas. Em (a) e (d) clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$); em (b) e (e) carotenóides totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$); em (c) e (f) ficocianina ($\mu\text{g mL}^{-1}$). As barras brancas representam 48h e as barras cinzas 144h. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$) e o asterisco (*) o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

Ao final do período experimental, entretanto, *Rhabdoderma* sp. foi destaque na produção de carotenóides totais, atingindo $\sim 4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, outras candidatas viáveis ao final de 144h para produção de carotenóides ($\sim 2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram *A. holsatica*, *Synechococcus* sp., *S. brasiliense*, *Phormidium* sp., *Nostoc* sp. (3249) e *Leptolyngbya* sp. As concentrações de ficocianina variaram entre as espécies (figura 3c e 3f). Com baixas quantidades de ficocianina *I. carmineus* e CCIBt 3540, enquanto outras mostraram-se possíveis candidatas à produção deste pigmento. As maiores concentrações de ficocianina foram encontradas em *Geitlerinema* sp. ($43 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Nostoc* sp. CCIBt3249 ($27 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Leptolyngbya* sp. ($62 \mu\text{g mL}^{-1}$) em 48h e 144h.

A Figura 4 mostra a concentração total de carboidratos ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e lipídios ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em 48h (Fig. 4a) e 144h (Fig. 4b) para as 20 cepas de cianobactérias cultivadas no FBR.

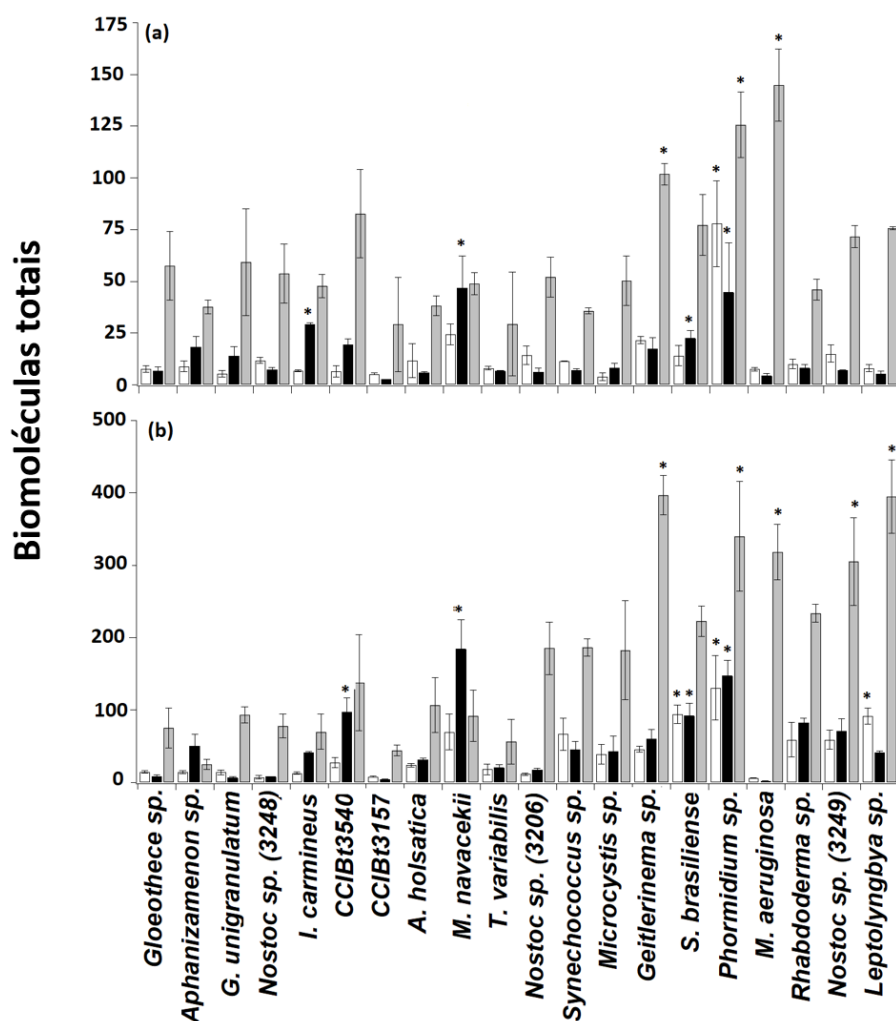


Figura 4. Biomoléculas totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nas 20 espécies de cianobactérias cultivadas. Em (a) determinação em 48h e em (b) 144h de tempo experimental. As barras brancas representam os lipídios, as barras pretas os carboidratos e as barras cinzas as proteínas. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). O asterisco (*) representa o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

As concentrações de proteínas foram superiores às determinadas para carboidratos totais e lipídios. Maiores concentrações de proteínas foram encontradas nas espécies que apresentaram maiores taxas de crescimento. *Geitlerinema* sp., *Phormidium* sp. e *M. aeruginosa* destacaram-se e, ao final do cultivo, acrescentamos *Nostoc* sp. (CCIBt 3249) e *Leptolyngbya* sp., que atingiram $\sim 350 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas totais. Entre 48h e 144h de cultivo, três espécies foram importantes produtoras de carboidratos totais, a saber, *M. navacekii*, *S. brasiliense* e *Phormidium* sp. Em relação aos lipídios totais, nas primeiras 48h de cultivo, a espécie *Phormidium* sp. produziu a maior quantidade, $\sim 70 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta

mesma espécie juntamente com *S. brasiliense* e *Leptolyngbya* sp. resultaram em valores de lipídios totais de $\sim 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ no final do cultivo. Os percentuais de proteínas, carboidratos e lipídios em 48 horas em relação à biomassa seca de cada espécie estão reportados na tabela 2.

Tabela 2. Composição porcentual (% BS) de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa seca das cianobactérias investigadas. Estatística: mesma letra indica que não houve diferença significativa (ANOVA, $P > 0,05$). Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$).

Espécies	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
<i>Gloeotheca</i> sp.	33,6 (8,4) ^{ABCD}	3,8 (1,1) ^{EF}	4,61 (1,2) ^{CDE}
<i>Aphanizomenon</i> sp.	39,4 (3,5) ^{ABCD}	19,4 (7) ^B	9,1 (2,2) ^{BCDE}
<i>G. unigranulatum</i>	64,2 (19,7) ^A	9,9 (2,9) ^{CDEF}	5,7 (1,0) ^{CDE}
<i>Nostoc</i> sp. CCIBt3248	18,7 (3,1) ^{CD}	2,6 (0,4) ^F	4,2 (0,7) ^{DE}
<i>I. carmineus</i>	29,3 (3,4) ^{ABCD}	17,9 (0,4) ^{BC}	4,1 (0,2) ^{DE}
CCIBt 3540	58,8 (21) ^{AB}	14,0 (4,7) ^{BCD}	4,1 (1,9) ^{DE}
CCIBt 3157	34,1 (29,8) ^D	2,7 (0,2) ^F	5,8 (1,1) ^{CDE}
<i>A. holsatica</i>	26,9 (3,1) ^{ABCD}	4,0 (0,3) ^{EF}	12,5 (0,5) ^{ABC}
<i>M. navacekii</i>	35,8 (13,8) ^{ABCD}	33,8 (0,5) ^A	16,9 (4,1) ^{AB}
<i>T. variabilis</i>	29,7 (25,6) ^{ABCD}	6,4 (0,3) ^{DEF}	8,0 (1,2) ^{CDE}
<i>Nostoc</i> sp. CCIBt3206	24,9 (4,2) ^{BCD}	3,0 (1,1) ^F	6,8 (2,0) ^{CDE}
<i>Synechococcus</i> sp.	33,2 (3,0) ^{ABCD}	6,4 (1,2) ^{DEF}	10,1 (0,8) ^{BCD}
<i>Microcystis</i> sp.	22,8 (4,7) ^{BCD}	3,6 (0,5) ^F	1,5 (0,2) ^E
<i>Geitlerinema</i> sp.	53,4 (8,3) ^{ABC}	9,3 (4,1) ^{CDEF}	11,2 (0,6) ^{BCD}
<i>S. brasiliense</i>	45,3 (8,7) ^{ABCD}	13,0 (1,7) ^{BCDE}	8,2 (2,7) ^{CDE}
<i>Phormidium</i> sp.	32,7 (8,7) ^{ABCD}	6,2 (0,3) ^{DEF}	20,0 (5,5) ^A
<i>M. aeruginosa</i>	33,4 (1,2) ^{ABCD}	6,9 (3,6) ^{DEF}	11,5 (4,0) ^{BCD}
<i>Rhabdoderma</i> sp.	35,2 (7,6) ^{ABCD}	6,1 (2,1) ^{DEF}	7,4 (1,2) ^{CDE}
<i>Nostoc</i> sp. CCIBt3249	38,2 (1,6) ^{ABCD}	3,7 (0,2) ^{EF}	7,9 (2,1) ^{CDE}
<i>Leptolyngbya</i> sp.	54,9 (3,2) ^{ABC}	3,9 (1,1) ^{EF}	5,9 (1,5) ^{CDE}

Em geral, para todas as espécies as porcentagens de biomoléculas em relação à biomassa seca permaneceram constantes entre 48h e 144h (dados não apresentados). No entanto, houve variação entre os percentuais totais de proteínas (19-64%), carboidratos (2,5-34%) e lipídios (1,5-20%) entre as espécies cultivadas. Ao final de 48h, *G. unigranulatum*, *Leptolyngbya* sp. e *Geitlerinema* sp. destacaram-se com 64%, 55% e 53% de proteínas totais, respectivamente. Os maiores teores de carboidratos totais por biomassa seca foram encontrados em *M. navacekii* (34%), *Aphanizomenon* sp. (19%) e CCIBT 3540 (14%). Quando o conteúdo lipídico da biomassa foi avaliado, as cepas *Phormidium* sp. e *M. navacekii* apresentaram valores maiores, 20% e 17%, respectivamente.

A porcentagem de PHA nas cepas estudadas é mostrada na figura 5. Entre as espécies houve variação de 0,4 a 2% de PHA em relação à biomassa seca. Os maiores valores foram encontrados em *A. holsatica*, *S. brasiliense*, *M. aeruginosa* e *Nostoc* sp. (CCIBT3249).

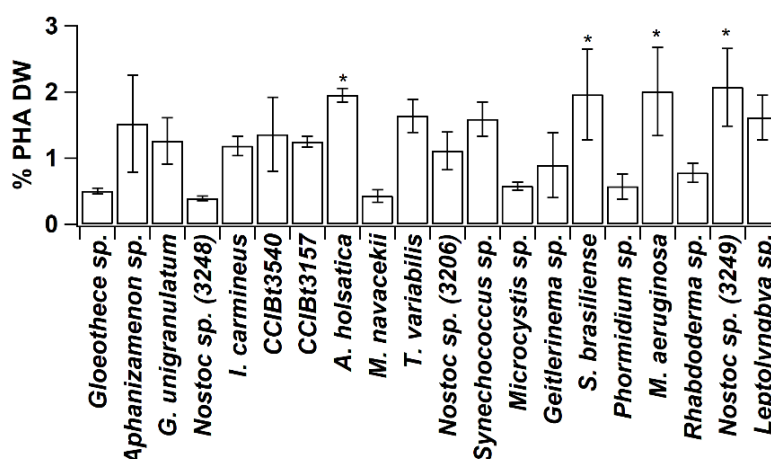


Figura 5. Percentual de PHA na biomassa das 20 cepas de cianobactérias cultivadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). O asterisco (*) representa o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

c) Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da biomassa liofilizada de cada espécie estão reportados na figura 6.

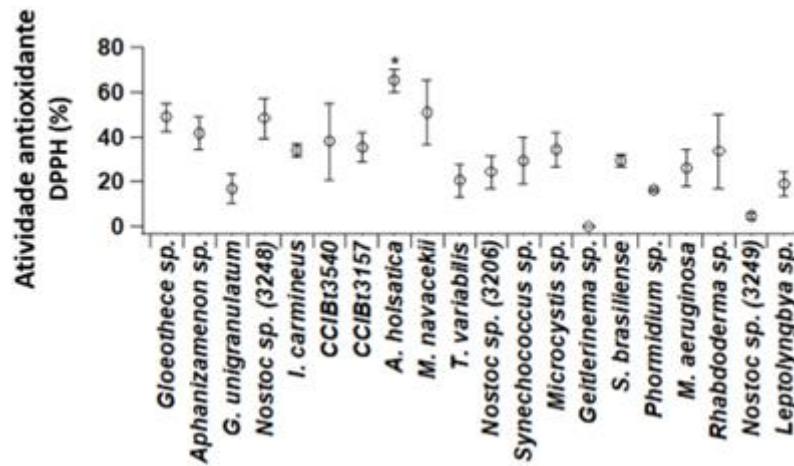


Figura 6. Atividade de eliminação de radicais das 20 cepas de cianobactérias cultivadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). O asterisco (*) representa o maior valor (ANOVA, $p < 0,05$).

A maior atividade antioxidante foi encontrada em *A. holsatica* com 65% de atividade, seguida por *M. navacekii* (51%), *Gloeothece* sp. (49%), *Nostoc* sp. (CCIBt3248) (45%) e *Aphanizomenon* sp. (41%).

d) Correlação entre crescimento e composição bioquímica

Os dados de correlação entre parâmetros de crescimento, pigmentos e biomoléculas são apresentados na figura 7.

A taxa de crescimento apresentou relação positiva de 0,8 com a concentração de proteínas totais e 0,7 com clorofila *a*. Uma forte correlação positiva de 0,8 também foi observada entre biomassa seca e teor de lipídios totais. A biomassa seca também apresentou correlação positiva ($> 0,7$) com clorofila *a* e carotenóides.

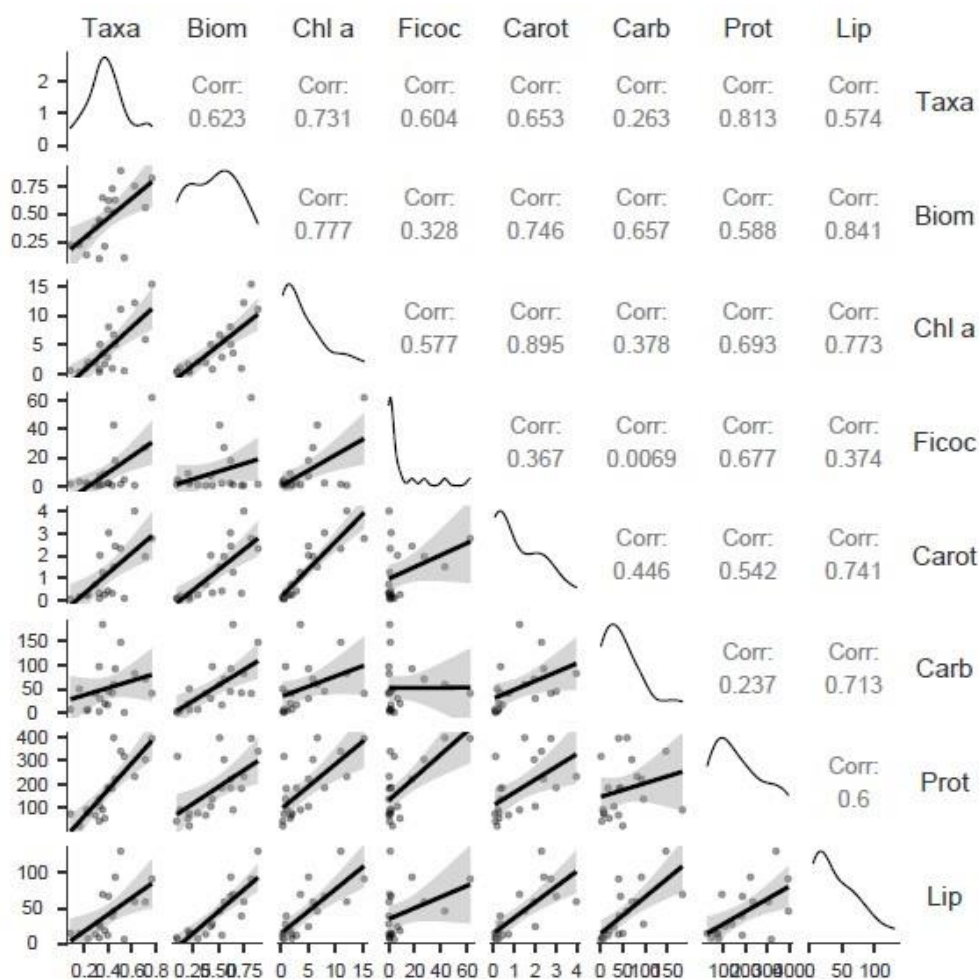


Figura 7. Matriz de correlação para informações do cultivo em fase exponencial de crescimento (48h): taxa de crescimento (Taxa), Biomassa seca e biomoléculas determinadas (clorofila *a* – Clor *a*, Ficocianina – Ficoc, Carotenoides – Carot, Carboidratos – Carb, Proteínas – Prot, Lipídios – Lip).

e) Parâmetros fotossintéticos

A figura 8 reporta os dados de rendimento quântico máximo e efetivo em 48h e 144h para as 20 cepas cultivadas. Entre as espécies, o valor do rendimento máximo variou de 0,20 a 0,50 e do rendimento quântico efetivo entre 0,12 a 0,33. Para ambos os parâmetros os valores se mantiveram constantes nos tempos de 48 h e 144 h.

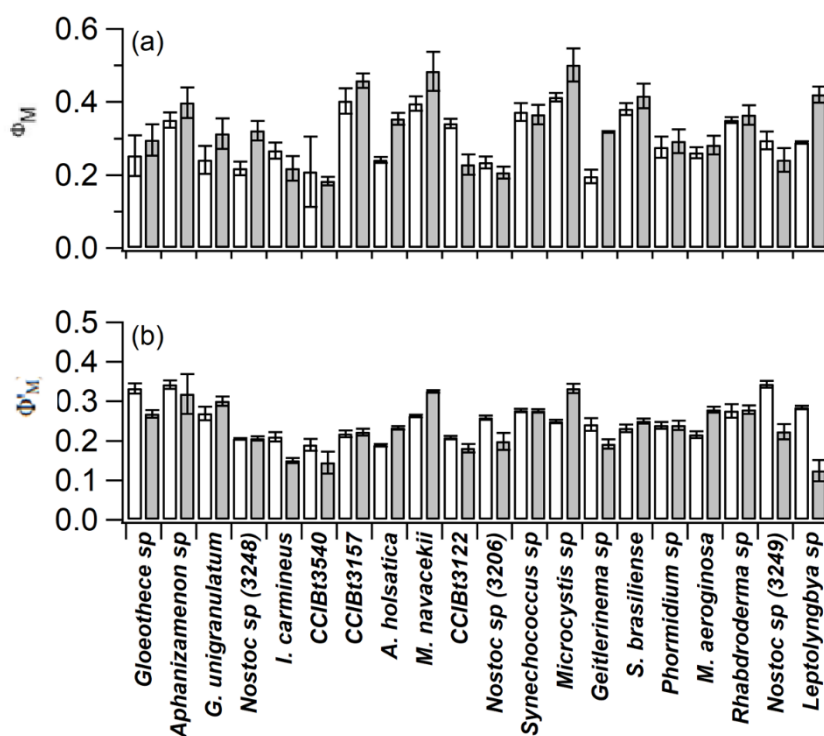


Figura 8. Rendimento quântico máximo (a) e rendimento quântico efetivo (b) em 48h (barras brancas) e 144h (barras cinza) de cultivo para as cianobactérias cultivadas no fotobiorreator. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

A figura 9 reporta os dados de dissipação fotoquímica para as espécies de cianobactérias estudadas no FBR. Assim como os rendimentos quânticos, os valores de qP mantiveram-se constantes ao longo do tempo experimental.

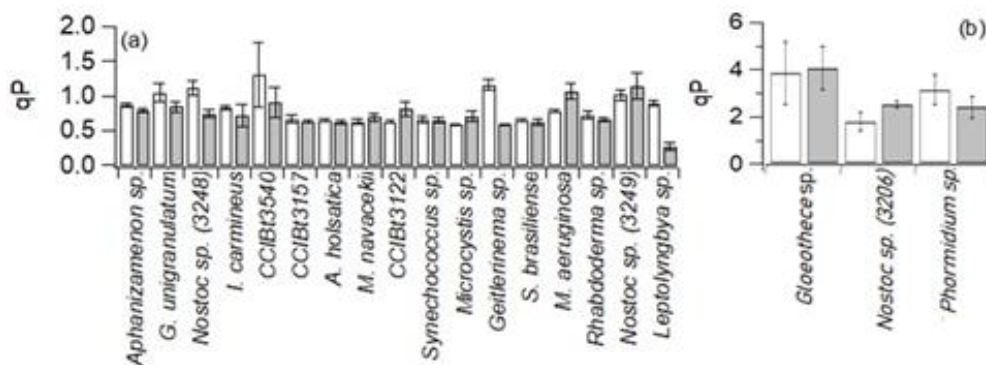


Figura 9. Dissipação fotoquímica (qP) em 48h (barras brancas) e 144h (barras cinza) de cultivo para as espécies de cianobactérias cultivadas no fotobiorreator. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

Dentre as espécies estudadas, 3 apresentaram valores de qP superior ao valor teórico máximo (1,0). Essas espécies foram *Gloeothece* sp., *Nostoc* sp. (3206) e *Phormidium* sp. e qP manteve-se constante no tempo experimental (48 h e 144 h).

A figura 10 mostra os parâmetros extraídos das RLC para as cianobactérias. Os valores de $rETR_{max}$, I_k e α variaram entre as diferentes espécies. Esses resultados revelam que *M. navacekii* e *Aphanizomenon* sp. obtiveram maiores valores de $rETR_{max}$, ~ 176 e $\sim 152 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Os maiores valores de I_k também foram nessas espécies, sendo ~ 398 para *M. navacekii* e $\sim 329 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *Aphanizomenon* sp. Os valores de α (aproveitamento da luz PAR) variaram entre $\sim 0,3$ e $\sim 0,5$, e não se correlacionaram com a taxa de crescimento. Espécies com baixa taxa de crescimento apresentaram valores similares às cepas com altas taxas de crescimento.

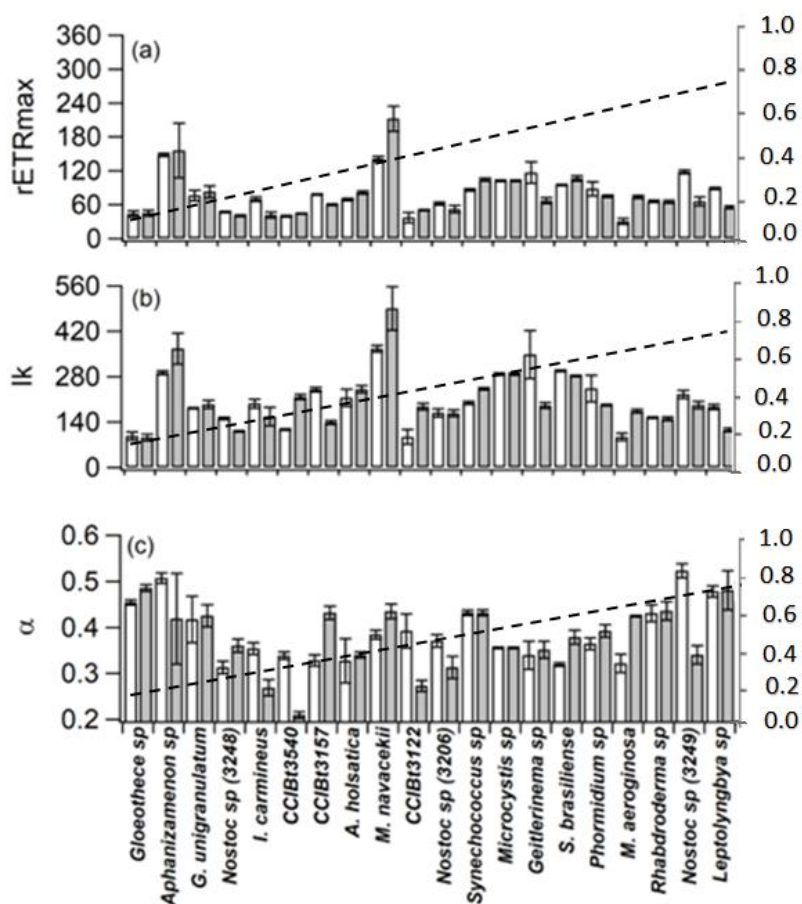


Figura 10. Parâmetros relacionados à fotossíntese obtidos após o ajuste de RLC de acordo com Platt et al. (1980). Em (a) $rETR_{max}$, $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (b) α , $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em (c) I_k , $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). Linha tracejada indica taxas de crescimento.

3.4 DISCUSSÃO

a) Parâmetros de crescimento

A variação nas taxas de crescimento entre as espécies pode ser considerada esperada, uma vez que a taxa de crescimento, sob condições ótimas é uma característica intrínseca da espécie. Em um estudo comparando as taxas de crescimento de *Chlorella vulgaris* com 4 espécies de cianobactérias (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena planctonica*, *Borzia trilocuraris* e *Synechocystis* sp.) MENDEZ et al. (2015) mostraram variação de 0,2 a 1,2 d⁻¹, com 0,6 d⁻¹ como o maior valor entre as cianobactérias (*Synechocystis* sp.). Comparando esses resultados com os do presente estudo, observa-se que o nosso é 25% maior ao encontrado para *Leptolyngbya* sp., a cianobactéria com maior taxa de crescimento entre as que estudamos. Diferenças nas taxas de crescimento entre cepas da mesma espécie são comuns. Em um estudo com 3 espécies pertencentes ao gênero *Spirulina*, foi observada a maior taxa de crescimento em *S. platensis* (1,4 d⁻¹) e a menor em *S. lonar* (0,63 d⁻¹) (BHATTACHARYA; SHIVAPRAKASH, 2005). As espécies de *Nostoc* (CCIBt3206; CCIBt3249) aqui estudadas tiveram taxas de crescimento aproximadamente 2x maiores do que *N. muscorum* também cultivada sob suplementação de CO₂ (CORDEIRO et al., 2017). Embora essas diferenças possam ser simplesmente devido a uma característica intrínseca da espécie, elas podem estar relacionadas às condições de crescimento. Nosso FBR possui entre suas vantagens a regulação da luz à medida que aumenta a densidade da cultura, que aliado ao controle do pH por borbulhamento interno de CO₂, fornece condições adequadas de crescimento, assumindo-se que nutrientes solúveis são disponibilizados em excesso. Em outro trabalho, a cianobactéria *S. platensis* apresentou taxa de crescimento de 0,8 d⁻¹ (LI et al., 2018), similar à de *Leptolyngbya* sp. neste estudo. Com taxa de crescimento de 0,8 d⁻¹ e biomassa seca de ~ 0,8 g L⁻¹ em 144 h, a cianobactéria *Leptolyngbya* sp. pode ser um organismo promissor para a obtenção de biomassa (e seus produtos associados).

Além da variação nas taxas de crescimento, nossos resultados mostraram que algumas espécies foram particularmente promissoras no acúmulo de biomassa. Isso se aplica a *M. navacekii*, *Nostoc* sp. (3206), *Synechococcus* sp., *Microcystis* sp., e *Phormidium* sp. que apresentaram taxa de crescimento na faixa de 0,3 a 0,5 d⁻¹, mas biomassa semelhante àquelas que apresentaram taxa de crescimento de 0,6 a 0,8 (*Rhabdoderma* sp, *Nostoc* sp, *Leptolyngbya* sp). A faixa de biomassa seca ao final do

cultivo para 65% das espécies que investigamos foi de 0,4 a 0,8 g L⁻¹. Comparando os nossos resultados de *Synechococcus* sp. (0,6 g L⁻¹) com os do mesmo gênero no estudo de SHANMUGAM et al. (2020), obtivemos duas vezes mais biomassa, mesmo considerando que em SHANMUGAM et al. (2020), 24h a mais de tempo de cultura foi realizada. Investigando 4 espécies de *Mycrocystis* (*M. navacekii*, *M. aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. protocystis*) um valor máximo de biomassa seca foi encontrado para *M. protocystis* (CORDEIRO et al., 2017), próximo ao que obtivemos para *M. navacekii*, cujo rendimento foi 1,6x maior. A biomassa acumulada em *Leptolyngbya* sp. é o dobro da encontrada para *Synechococcus* sp. sob condições de crescimento semelhantes (YAN et al., 2012). É provável que as condições que usamos tenham favorecido o maior acúmulo de biomassa em comparação com os dados da literatura para cianobactérias. A manutenção do pH por meio de inserção automática de CO₂ favorece a fotossíntese, processo primário para a geração de biomassa e, adicionando-se a isso, temos a manutenção constante da intensidade luminosa no interior do FBR conforme adensamento da cultura, reduzindo efeitos de auto-sombreamento.

Segundo literatura, os valores de correlação indicam relações fortes, fracas e moderadas entre variáveis, sendo valores entre 0,7 e 1,0 considerados como uma forte relação linear positiva ou negativa (RATNER, 2009). Dados da literatura mostram que a correlação entre taxa de crescimento e rendimento de biomassa pode variar (GONÇALVES et al., 2016). Esses autores cultivaram duas espécies de microalgas e duas cianobactérias e observaram que em diferentes concentrações de CO₂ as maiores taxas de crescimento não foram observadas em concentrações de CO₂ que apresentaram maior rendimento de biomassa. Entendemos que dois motivos podem resultar em maior biomassa em taxas de crescimento menores, são eles células de maior dimensão e/ou maior acúmulo de biomoléculas por unidade celular. Neste estudo observamos um coeficiente de correlação de ~0,62 entre esses parâmetros, considerando todas as 20 espécies analisadas. Entretanto, observamos que a biomassa se correlacionou mais fortemente com clorofila a (~0,78), carotenoides (~0,75) e lipídios (~0,84).

Destacamos que grande parte da literatura realiza cultivos de cianobactérias abaixo de 100 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ (BABIC' et al., 2016; LU; VONSHAK, 2002; LU; ZHANG, 2000). Aqui, o cultivo em Ik (em sua maioria acima de 100 μmol de fótons m⁻² s⁻¹) pode ter favorecido a divisão celular, resultando em maiores taxas de crescimento em comparação com a literatura. De fato, a cianobactéria *S. platensis* em exposição a 40,

60 e 120 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou maior taxa de crescimento em exposição a maior intensidade luminosa (KEPEKÇI; SAYGIDEGER, 2012).

b) Composição bioquímica

Conforme relatado na literatura, diferentes espécies de cianobactérias possuem diferentes proporções de pigmentos em sua biomassa (SOBIECHOWSKA-SASIM; STOŃ-EGIERT; KOSAKOWSKA, 2014). As cianobactérias cultivadas neste estudo apresentaram uma quantidade maior de clorofila *a* do que a maioria dos resultados da literatura. *Leptolyngbya* sp. foi destaque nesta pesquisa e, atingindo valor de rendimento de clorofila *a* ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 6 dias, o seja $2,5 \mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$), compatível com a cianobactéria de maior comercio, *Spirulina platensis* (LU e VONSHAK, 2002), mas $\sim 2,5\text{x}$ maior do que o reportado para a mesma espécie em ZHOU et al. (2018). Sugerimos que *Leptolyngbya* sp. juntamente com *Rhabdoderma* sp. e *Phormidium* sp., que também atingiram valores expressivos de clorofila *a*, são candidatas promissoras para culturas em larga escala visando à produção comercial deste pigmento. Houve uma correlação positiva de 0,73 entre clorofila *a* e taxa de crescimento, em conformidade com a literatura (XUE et al., 2010).

Os carotenóides são pigmentos fotossintéticos comercialmente desejados para serem aplicados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (PALIWAL et al., 2015). Assim como ocorreu com clorofila *a*, as concentrações de carotenoides que obtivemos foram em geral maiores do que as encontrados na literatura, com destaque para *Rhabdoderma* sp. Esta espécie, com $0,67 \mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ de carotenoides produziu cerca de 5 vezes mais do que *Spirulina platensis* ($0,13 \mu\text{g mL}^{-1} \text{d}^{-1}$, ZHOU et al. 2018), amplamente comercializada. Em um estudo com *Anabaena cylindrica*, *Anabaenopsis elenkinii*, *Anabaena torulosa* e *Nostoc* sp. SCHAGERL; MÜLLER (2006) encontraram o maior rendimento de carotenóides totais em *Anabaenopsis elenkinii*. Em comparação com esta espécie o rendimento de carotenoides foi 13x maior em *Rhabdoderma* sp. (este estudo).

O pigmento ficocianina está presente em cianobactérias e é de interesse comercial como corante natural (UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). Entre as espécies, *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. (CCIBt 3249) e *Geitlerinema* sp. demonstraram potencial para a produção de ficocianina. Nossos valores para *Leptolyngbya* sp. são até 9x maiores do que o encontrado para *Spirulina* sp., cultivada sob condições controladas em outros

estudos (CHAKRABORTY et al., 2017; LU; VONSHAK, 2002; ZHOU et al., 2018). Ressaltamos que a ficocianina é apenas um dos pigmentos presentes nos ficobilissomas (UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). As espécies que apresentaram baixos valores de ficocianina podem ter outros tipos de ficobiliproteínas em sua composição, como ficoeritrina e aloficocianina (SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018). Complementamos que, assim como em nosso trabalho, em meio de cultura Zarrouk e condições ideais de cultivo, a cianobactéria *Spirulina platensis* apresentou maiores concentrações de ficocianina do que clorofila *a* (LU; VONSHAK, 2002).

Considerando as biomoléculas proteínas, carboidratos e lipídios, nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, que mostra variação na composição bioquímica entre as diferentes espécies de cianobactérias (BILLER; ROSS, 2011; OLIVEIRA et al., 2018; VARGAS et al., 1998; YADAV et al., 2021). Além disso, destacamos que não obtivemos variação no teor dessas biomoléculas com o avanço do tempo experimental, por exemplo, a composição percentual de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa seca foi semelhante às 48h e 144h, confirmando que as condições usadas nesta pesquisa suportaram o crescimento saudável das células. Similar ao nosso estudo, Vargas et al. (VARGAS et al., 1998) avaliaram os níveis de carboidratos, lipídios e proteínas de 12 cianobactérias e mostraram uma variação de 16 - 37% para carboidratos, 37% - 52% para proteínas e 8 - 13% para lipídios entre as espécies.

Quanto às proteínas totais, espera-se que em condições saudáveis, essa biomolécula predomine na composição celular quando comparada com carboidratos e lipídios. Foi o que aconteceu neste estudo com todas as espécies investigadas. Da mesma forma, em um estudo visando a caracterização da biomassa, a cianobactéria *Synechocystis* sp. e *Borzia trilocularis* apresentaram níveis mais elevados de proteínas do que carboidratos (MENDEZ et al., 2015). A obtenção de biomassa rica em proteínas é um dos objetivos da aquicultura, sendo que se considera o uso de *Synechococcus* sp. e *Arthrospira maxima* como fonte proteica e suplementação nutricional (SÁNCHEZ-ALEJANDRO; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, 2015). O rendimento de proteínas que obtivemos para *Geitlerinema* sp., *Phormidium* sp., *M. aeruginosa*, *Nostoc* sp. (CCIBt 3249) e *Leptolyngbya* sp. foi cerca de 1,6x maior em comparação com *Anabaena sphaerica* (CHAKRABORTY et al., 2017). Sabe-se que em células saudáveis e crescimento exponencial, muitas das proteínas presentes nas cianobactérias são estruturais, constituintes de material genético (KOKSHAROVA; BABYKIN, 2011), e assim

participam do aumento populacional. Com um coeficiente de correlação de 0,81 para proteínas e taxa de crescimento, nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos para *M. aeruginosa* (DOWNING et al., 2005) e *Cyanothece* sp. (SINETOVA et al., 2012). Obtivemos também correlação positiva (0,69) entre proteínas e clorofila *a*, semelhante ao descrito para *G. lemmermanii* (SÁNCHEZ-ALEJANDRO; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, 2015).

Os percentuais de proteínas na biomassa seca que obtivemos são superiores aos encontrados para outras cepas de cianobactérias relatadas na literatura (BANO et al., 2021; KHAZI; DEMIREL; DALAY, 2018; VARGAS et al., 1998). Com 64% proteínas na biomassa seca, *G. unigranulatum* (48 h de cultivo) produziu 2x mais essa biomolécula do que o encontrado para *Geitlerinema lemmermanii* também em 48 h (SÁNCHEZ-ALEJANDRO; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, 2015). *G. unigranulatum* produziu proteínas em quantidade similar à encontrada para espécies comerciais em condições ideais de cultivo, como *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. (COSTA et al., 2018b), *Synechocystis* sp. (PALIWAL et al., 2015) e *Spirulina platensis* (USLU et al., 2013), e 1,2x maior do que *Anabaena variabilis* (FONTES et al., 1987). O gênero *Geitlerinema* já foi descrito como uma linhagem de destaque para a produção de biomassa rica em proteínas em comparação com outras espécies (SÁNCHEZ-ALEJANDRO; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, 2015), o que foi confirmado nesta pesquisa. Em um estudo com *Spirulina platensis* em sistema fotoautotrófico, o maior teor de proteína foi de 55% ao final do terceiro dia de cultivo e houve redução para 25% ao final do 10º dia (LI et al., 2018), quando provavelmente algum estresse teve início. Atribuímos a alta concentração de proteínas nas cepas cultivadas nesta pesquisa às condições ideais de cultivo, uma vez que o teor de proteínas em *G. unigranulatum* foi similar em 48h e em 144h, ~60% (dados não mostrados). Assim, sugerimos que o FBR utilizado forneceu condições de crescimento em níveis ideais para manter a saúde da cultura.

Analisando a produção de carboidratos, constatamos que *M. navacekii* em 144h foi destaque, sendo sua produção ~1,4x maior do que a de *Anabaena sphaerica* ao final de 192h de crescimento (CHAKRABORTY et al., 2017). Com 34% de carboidratos em base biomassa seca, esta espécie foi semelhante à *Spirulina platensis* (~30%) sob condições adequadas de cultivo (LI et al., 2018). Nossos valores também foram próximos aos encontrados para a *Spirulina maxima* (TORZILLO et al., 1986), *Synechocystis* sp. (PALIWAL et al., 2015) e *Scytonema bohneri* (RAJESHWARI; RAJASHEKHAR,

2011). No presente estudo, a concentração de carboidratos, diferentemente das proteínas, apresentou baixa correlação com taxa de crescimento, mas uma correlação de 0,71 com lipídios totais. Isso confirma que em cianobactérias esta biomolécula está associada à formação de glicolipídios, uma molécula importante na estabilidade de membranas e, nas cianobactérias exercem também funções nos heterocistos e em acinetos, como demonstrado em GARG; MALDENER (2021).

Os lipídios são moléculas de reserva e fazem parte das membranas celulares (SATO; WADA, 2009). Nossos resultados mostraram que, com $\sim 130 \mu\text{g mL}^{-1}$ de lipídios nos cultivos de *Phormidium* sp. ao final de 144 h, esta espécie é promissora, superando os $119 \mu\text{g mL}^{-1}$ (XUE et al., 2010) e $65 \mu\text{g mL}^{-1}$ (USLU et al., 2013) ambos obtidos para *S. platensis* em outros estudos em tempo de cultivo semelhante. *Phormidium* sp. (20% BS) e *M. navacekii* (17% BS) mostraram-se cepas promissoras para a produção de lipídios, mas a maioria das cepas aqui investigadas produziu menos do que 10% desta biomolécula. Esses resultados concordam com a literatura (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2018; SAHU et al., 2013; YADAV et al., 2021). Investigando 12 cepas de cianobactérias, VARGAS et al. (1998) mostrou variação de 8 a 13% na porcentagem lipídica das cepas.

Espécies com alto teor de lipídios podem despertar grande interesse e serem cultivadas para produção de biodiesel (PARMAR et al., 2011). O conteúdo lipídico de *Phormidium* sp. é $\sim 1,5\text{x}$ maior do que o encontrado para *Nodularia* sp. e *Nostoc* sp. (VARGAS et al., 1998), e 2x maior do que o encontrado para *Anabaena variabilis* (FONTES et al., 1987). Comparando sua produção de lipídios com outras cepas do mesmo gênero, obtivemos 3x mais lipídios do que o encontrado em *Phormidium* sp. FW01 e $2,4\text{x}$ mais que em *Phormidium* sp. FW02 conforme relatado em Yadav et al. (2021), e 2x mais que em *Phormidium valderianum* (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2018).

A triagem de cepas para produção de lipídios assume papel significativo na biotecnologia, pois a produção inerente de lipídios nas espécies já conhecidas é relativamente baixa (MATHARASI; ANAHAS; MURALITHARAN, 2014) e procurar novas espécies promissoras pode ser um passo para seu cultivo em larga escala e futuramente na produção de biocombustíveis (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2018). Ressaltamos que *Phormidium* sp., além de possuir alto teor lipídico entre as espécies estudadas, também apresentou alta taxa de crescimento no FBR. A partir desses

resultados e visando biomassa rica em lipídios, sugerimos que *Phormidium* sp. juntamente com *M. navacekii* são linhagens promissoras para a produção de lipídios. Sugerimos que os níveis lipídicos aqui obtidos são resultado não só das características endógenas das cepas, mas também dos ajustes internos do FBR utilizado. Acrescentamos ainda que as múltiplas correlações positivas obtidas para lipídios com todas as outras biomoléculas produzidas pelas cianobactérias estudadas, exceto ficocianina, são uma demonstração de que em cianobactérias outras funções importantes, além de reserva é exercida pelos lipídios.

É importante observar que a composição bioquímica das cianobactérias, além de ser inerente a cada espécie (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2018), também está relacionada à mudanças nas condições de crescimento (VARGAS et al., 1998). Esta é a razão pela qual é melhor caracterizar os organismos a partir de células saudáveis, em crescimento exponencial, em vez de fase estacionária nas culturas em batelada. Isso é particularmente significativo quando o organismo está sendo investigado pela primeira vez como algumas das cepas aqui estudadas. Alterações na composição bioquímica das cianobactérias podem ser indicativas de situações de estresse, seja por limitações luminosas ou nutricionais. Em geral, os níveis de proteínas, carboidratos e lipídios obtidos em 48 h não apresentaram diferença estatística em relação à determinação em 144 h (dados não apresentados). Isso sugere que durante todo o período de cultivo, as cianobactérias encontraram condições adequadas, em parte devido ao modo de operação do reator, que permitiu radiação e pH ideais durante todo o experimento. Isso nos permitiu estender a fase de crescimento exponencial, resultando em maior quantidade de biomassa sem comprometer sua qualidade.

Nas microalgas, os PHAs são ésteres que se acumulam intracelularmente em cianobactérias (e bactérias) exercendo a função de reserva de energia (HONG et al., 2021; ROJA et al., 2019). Como polímero biodegradável (VARGAS et al., 1998), há um grande interesse em cepas que produzem PHAs (ROJA et al., 2019; YASHAVANTH; DAS; MAITI, 2021). A concentração de PHAs que obtivemos para as espécies estudadas (0,4% e 2% de PHA em sua biomassa) estão dentro dos valores relatados na literatura. De acordo com SHARMA et al. (2007) que investigaram PHAs em mais de 100 cepas de cianobactérias, cerca de 70% delas continham PHA em concentrações que variavam de 0,04% a 6% da biomassa seca. Em um estudo com 23 espécies de cianobactérias, 20 apresentaram níveis de PHA variando de 0,51% (*S. platensis*) a 6,4% (*Nostoc muscorum*)

(ANSARI; FATMA, 2016). Em nosso estudo, *A. holsatica*, *S. brasiliense*, *M. aeruginosa* e *Nostoc* sp. (CCIBt3249) apresentaram ~ 2% de PHA na biomassa, que foi 2x maior do que o encontrado em *A. platensis* (CORRÊA; TEIXEIRA, 2021) e semelhante aos valores obtidos em *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. (COSTA et al., 2018b), e *Microcystis aeruginosa* em outro estudo avaliando 25 espécies de cianobactérias (BHATI et al., 2010).

Há necessidade de triagem de novas espécies para obtenção, caracterização e processamento de PHA (ANSARI; FATMA, 2016). Nossos resultados servem de indicação para linhagens que produzam intrinsecamente PHAs em condições ideais de cultivo. Investigações posteriores podem buscar estratégias de manipulação para aumentar os PHAs acumulados, como limitação de nutrientes. A literatura mostrou que até 5x mais PHAs foram obtidos sob condições estressantes de crescimento (CORDEIRO et al., 2017; VARGAS et al., 1998; XUE et al., 2010; YASHAVANTH; DAS; MAITI, 2021). Sabe-se que bactérias heterotróficas produzem grandes quantidades do biopolímero (BHATI et al., 2010; COSTA et al., 2018b), porém com alto custo de substrato (LÖWE et al., 2017; SUDESH; TAGUCHI; DOI, 2002). O destaque do uso de cianobactérias frente às bactérias é que elas são organismos fotoautotróficos e requerem nutrientes mínimos (COSTA et al., 2018b; YASHAVANTH; DAS; MAITI, 2021).

c) Atividade antioxidante

Nas cianobactérias os compostos antioxidantes são responsáveis por combater e eliminar os radicais livres (EL-ATY; MOHAMED; SAMHAN, 2014; NAINANGU et al., 2020; RENUGADEVI et al., 2018; SENOUSY; ABD ELLATIF; ALI, 2020). As cepas aqui estudadas apresentaram variação da atividade antioxidante contra radicais DPPH e, em comum acordo com a literatura, diferentes organismos apresentam diferentes respostas antioxidantes. Algumas apresentaram atividade antioxidante acima de 40%, chegando até 65% em *A. holsatica*, valores considerados de alto potencial antioxidante, mas também dentro da faixa esperada para cianobactérias (SINGH et al., 2014). A atividade de *A. holsatica* em nosso estudo foi semelhante à encontrada por MORONE et al. (2020) em extrato etanólico de *Synechocystis salina* LEGE 06099, que foi de 60%. Nossos valores para *A. holsatica* também estão próximos aos encontrados para *S. platensis* (68%) em extrato hexânico (SANTOYO et al., 2006). Avaliar a atividade

antioxidante requer considerar o solvente em que o extrato foi produzido, pois dele é dependente. Algumas diferenças que encontramos na atividade com a literatura pode ser resultado dos diferentes solventes utilizados (MAADANE et al., 2015). Em um estudo comparando os solventes de extração hexano, éter de petróleo, etanol e água, foram demonstradas maiores atividades antioxidantes para *S. platensis* em hexano (SANTOYO et al., 2006). A extração eficiente está relacionada à penetração do solvente na célula e à dissolução dos compostos alvo relacionados à polaridade combinada do solvente/antioxidante (SAFAFAR et al., 2015). Em nosso estudo, utilizamos extratos metanólicos que, de acordo com a literatura recente, compostos fenólicos (ELSHOBARY et al., 2020) e carotenoides (SAFAFAR et al., 2015) são melhor obtidos; ambos os compostos participam da atividade antioxidante (NAINANGU et al., 2020; RENUGADEVI et al., 2018; SENOUSY; ABD ELLATIF; ALI, 2020). Portanto, as espécies aqui estudadas são uma fonte natural de sequestro de radicais livres, sendo uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (AYDAŞ; OZTURK; ASLIM, 2013) e podem ser de interesse para uso na indústria alimentícia ou afins (SANTOYO et al., 2006).

d) Parâmetros fotossintéticos

A análise de fluorescência da clorofila é uma ferramenta de medição não invasiva que permite avaliar aspectos chave da captura de luz fotossintética e transporte de elétrons (CAMPBELL et al., 1998; CAMPBELL; ÖQUIST, 1996). O Φ_M diz respeito à eficiência máxima da fotoquímica do PSII e o Φ'_M à eficiência da energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII (LU; VONSHAK, 2002). A similaridade dos valores de rendimento máximo ao longo do cultivo, como obtidos nesta pesquisa, sinalizam manutenção de cultivo saudável. Os valores que obtivemos estão dentro do esperado para cianobactérias na literatura, que varia de 0,17 a 0,65 (GRINTEN et al., 2005; WU et al., 2012; CHAKRABORTY et al., 2017) e são em geral mais baixos do que os obtidos para microalgas verdes. Diferentemente de nosso estudo, feito em PBR com alto controle, LI et al. (2018) mostraram redução no rendimento quântico máximo em cultivo de *Spirulina platensis*, que segundo os autores pode estar relacionado à limitação nutricional com o aumento da densidade populacional. Além disso, sabe-se que o crescimento populacional pode ocasionar auto sombreamento na cultura, impactando os rendimentos fotossintéticos (FONTES et al., 1987). Assim como o rendimento quântico máximo, o efetivo também pode sofrer redução em função das situações de estresse, como limitação nutricional ou

mudanças na irradiação (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Nesta pesquisa, as duas cepas com maiores quedas de rendimento efetivo foram justamente as que apresentaram maiores taxas de crescimento, *Leptolyngbya* sp. (2,3x menor) e *Nostoc* sp. CCIBt3249 (1,5x menor) e, conseqüentemente tinham as maiores densidades celulares nos cultivos. Isso pode ter resultado em eventual limitação nutricional, pois nosso PBR não foi alimentado com nutrientes, exceto o CO₂. A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* cultivada em uma avaliação do efeito de limitação de fósforo inorgânico apresentou variação do Φ'_M entre 0,5 (controle) e 0,2 (deficiente em P) (WU et al., 2012).

O menor rendimento quântico máximo observado para cianobactérias em comparação às microalgas verdes pode ser atribuído à incompleta oxidação da quinona primária do PSII. Em cianobactérias há uma interação das cadeias de transporte de elétrons respiratória e fotossintética (ACUÑA et al., 2015; DOMINY; WILLIAMS, 1987; VERMAAS, 2015), de modo que o *pool* da plastoquinona, o complexo do citocromo b6f e os carregadores de elétrons solúveis no lúmen são compartilhados (VERMAAS, 2015), levando a um Fo mais alto e menor Φ_M (ACUÑA et al., 2015; SCHUURMANS et al., 2015). Além disso, nas cianobactérias a participação da antena do ficobilissoma resulta em maior fluorescência de Fo, como mostrado para *Synechococcus* sp. (CAMPBELL et al., 1996), em que quanto maior a razão ficocianina/clorofila maior foi Fo. Portanto, o método de fluorometria PAM para cianobactérias é influenciado pela característica morfológica do grupo e pela razão de ficobiliproteínas/clorofila, podendo subestimar valores de rendimentos extraídos de células adaptadas previamente ao escuro. Apesar disso, os sinais PAM de cianobactérias servem como um indicativo para detectar rapidamente condições estressantes e respostas adaptativas em uma cepa (SCHUURMANS et al., 2015), finalidade para a qual foi utilizado nesta pesquisa. Destacamos que realizamos uma matriz de correlação (dados não mostrados) entre a concentração de ficocianina e os parâmetros Fo, F_m e F_v aqui obtidos e os mesmos apresentaram fraca correlação com este pigmento (- 0,3).

A dissipação fotoquímica diz respeito ao direcionamento da luz absorvida para a etapa fotoquímica da fotossíntese (CAMPBELL et al., 1998). Em situações de estresse, qP tende a diminuir. A ausência de variação no qP, confirmando o crescimento saudável do cultivo, pode ser devido ao sistema de iluminação interno do FBR juntamente com a inserção de CO₂, que foram mantidos praticamente constantes durante todo o período de cultivo. Uma exceção nesta pesquisa foi *Leptolyngbya* sp., que apresentou alta taxa de

crescimento e alta biomassa, com redução significativa de qP ao final. Sabe-se que sistemas batelada suportam condições saudáveis até certa densidade, havendo, portanto, uma limitação para este tipo de cultivo e uma capacidade populacional máxima (em comparação com cultivos contínuos). Sugerimos que para *Leptolyngbya* sp. a densidade alcançada seja a capacidade máxima do FBR, ocorrendo então ajustes metabólicos na nova condição. A limitação para *Leptolyngbya* sp. pode ser por deficiência nutricional ou por autosombreamento das células. Em um cultivo em batelada *Spirulina platensis* apresentou um aumento da dissipação não fotoquímica ao final de 10 dias de cultivo (LI et al., 2018), indicando ajustes fotossintéticos. Em nosso estudo, 3 espécies apresentaram valores de qP fora do valor teórico esperado (1,0), *Gloethece* sp. com ~ 3,8 qP, *Nostoc* sp. CCIBt3206 com ~ 2,1 qP e *Phormidium* sp. com ~ 2,7 qP. Os motivos que levam a estes resultados são ainda pouco entendidos e mais estudos são necessários para elucidar a razão desses valores.

Quanto às curvas rápida de luz (RLC), neste estudo 2 espécies apresentaram valores elevados de $rETR_{max}$ (acima de $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e I_k (superior a $280 \mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), t\u00edpicos de c\u00e9lulas que suportam altas intensidades luminosas (ZHANG et al., 2011). Essas cepas s\u00e3o, portanto, prop\u00edcias para serem cultivadas em ambientes abertos com altas irradi\u00e2ncias, pois a isso s\u00e3o mais tolerantes. Esse resultado \u00e9 promissor, pois uma das dificuldades de cultivos abertos em escala ampliada \u00e9 a dificuldade de controle da intensidade solar ao longo do dia (TORZILLO et al., 1986). Por outro lado, observamos cepas que apresentaram valores de $rETR_{max}$ baixos ($\sim 45 \mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e irradi\u00e2ncia de satura\u00e7\u00e3o abaixo de $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como as esp\u00e9cies *Gloethece* sp. e *Nostoc* sp. (3248). S\u00e3o organismos menos exigentes quanto \u00e0 intensidade de luz e possivelmente sofreriam menos a quest\u00e3o do autosombreamento conforme o aumento da densidade populacional com o passar do tempo de cultivo. Ainda analisando as RLC, α corresponde \u00e0 regi\u00e3o onde apenas a luz \u00e9 fator limitante para a fotoss\u00edntese e representa a efici\u00eancia de absor\u00e7\u00e3o de luz (FU et al., 2007). Os valores obtidos neste estudo (0,20 – 0,52) est\u00e3o dentro dos apresentados na literatura. MASOJ\u00cdDEK et al. (2001) obteve valores nessa amplitude para amostras coletadas na superf\u00edcie de um lago natural, enquanto WU et al. (2012) obteve para cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii* em laborat\u00f3rio sob diferentes concentra\u00e7\u00f5es de fosfato.

Tendo como base os resultados obtidos nesta pesquisa, pontuamos que a efici\u00eancia de captura de luz (α) parece n\u00e3o ser determinada apenas pelos valores de I_k e $rETR_{max}$.

Os maiores valores de $rETR_{max}$ e I_k foram encontrados em *M. navacekii* e *Aphanizamenon* sp., que apresentaram valores de $\alpha \sim 0,4$, entretanto com valores similares *Leptolyngbya* sp. ($\alpha = 0,48$) e *Rhabdoderma* sp. ($\alpha = 0,40$) não estão entre as cepas que apresentaram maiores valores de taxa de transporte de elétrons e irradiância saturante (I_k). Além disso, não houve uma relação direta entre α e taxa de crescimento. Espécies que apresentaram baixo crescimento populacional apresentaram valores de eficiência de captura de luz tão alto quanto espécies com alta taxa de crescimento.

De forma geral, os valores dos parâmetros da RLC entre o período de 48h e 144h mantiveram-se constantes para cada espécie de cianobactéria. Entretanto, em algumas espécies houve ajustes entre a luz de cultivo (tabela 1) previamente determinadas no inóculo e os valores encontrados para o cultivo no reator. Ajustes fotossintéticos em novas condições de cultivo são suportados pela literatura. Em cultivos de *Synechococcus* e *Prochlorococcus* com suplemento de CO_2 , somente a primeira espécie apresentou aumento nos valores de rendimentos fotossintéticos e do α (FU et al., 2007). Nesse mesmo estudo, os autores observaram que *Synechococcus* com suplementação de CO_2 apresentou aumento na taxa fotossintética máxima (P_{max}) em $60 \mu mol \text{ fótons } m^{-2} s^{-1}$, permanecendo em um platô até $900 \mu mol \text{ fótons } m^{-2} s^{-1}$. A mesma capacidade de tolerar intensidades de luz mais altas do que as intensidade de luz de cultivo foi observada também em *Synechococcus* no estudo de Ritchie (2008). Esse autor sugere que algumas cianobactérias apresentam uma capacidade de minimizar a fotoinibição na presença de altas irradiâncias. A mesma dinâmica de diferentes comportamentos ao aumento de PAR foi encontrada para 3 espécies do gênero *Chamaesiphon* (AIGNER et al., 2017). Com o aumento da intensidade luminosa houve aumento de $rETR$ até $200 \mu mol \text{ fótons } m^{-2} s^{-1}$ para *C. polonicus*, até $\sim 370 \mu mol \text{ fótons } m^{-2} s^{-1}$ para *C. geitleri* e ausência de fotoinibição até $1000 \mu mol \text{ fótons } m^{-2} s^{-1}$ para *C. starmachii*. Esses resultados indicam que os requerimentos luminosos para as espécies são ajustados em diferentes condições de cultivo.

3.5 CONCLUSÃO

Este capítulo avaliou o crescimento, composição bioquímica e parâmetros fotossintéticos de 20 espécies de cianobactérias, dentre elas espécies estudadas pela primeira vez. A busca por novas linhagens para obtenção de biomoléculas em culturas otimizadas é um campo em expansão que interessa às indústrias farmacêutica, cosmética e de geração de energia, dentre outras. Neste estudo, usamos um fotobiorreator de alto desempenho que possibilitou a produção de alta biomassa de várias cianobactérias em condições saudáveis durante 6 dias. *Leptolyngbya* sp. e *Nostoc* sp. CCIBt3249 apresentaram maiores taxas de crescimento, e culturas de *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp. CCIBt3249, *Phormidium* sp. e *Microcystis* sp. maior biomassa seca em ($0,8 \text{ g L}^{-1}$).

Entre as espécies investigadas, maior concentração de clorofila *a* foi encontrada em *Leptolyngbya* sp., *Rhabdoderma* sp. e *Phormidium* sp. *Rhabdoderma* sp. se destacou na produção de carotenóides ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Leptolyngbya* sp. em ficocianina ($62 \mu\text{g mL}^{-1}$). A composição (%) da biomassa seca em relação a proteínas, carboidratos e lipídios totais permaneceu constante ao longo das 144 h de crescimento. Mais proteínas totais estavam presentes nas linhagens que apresentaram maiores taxas de crescimento (*Geitlerinema* sp., *Phormidium* sp., *M. aeruginosa*, *Nostoc* sp. e *Leptolyngbya* sp.). Para carboidratos totais *M. navacekii* e *Phormidium* sp. apresentaram maiores concentrações e *S. brasiliense*, *Phormidium* sp. e *Leptolyngbya* sp. maiores rendimentos de lipídios totais. Considerando os teores dessas biomoléculas na biomassa de cianobactérias, *G. unigranulatum* apresentou os maiores teores de proteínas (64%), *M. navacekii* de carboidratos (33%) e *Phormidium* sp. de lipídios (20%).

As espécies *A. holsatica*, *S. brasiliense*, *M. aeruginosa* e *Nostoc* sp. (CCIBt3249) apresentaram o maior teor de PHA na biomassa (2%) entre as espécies estudadas. Além disso, *A. holsatica*, apresentou alta atividade antioxidante (65%), sendo uma alternativa aos antioxidantes sintéticos.

Por meio da prospecção de 20 cepas de cianobactérias isoladas no Brasil este estudo é uma importante contribuição para a indústria biotecnológica, indicando cepas promissoras para a obtenção de biomoléculas específicas. O fotobiorreator utilizado permitiu a determinação bioquímica em células saudáveis, garantindo a qualidade da biomassa.

4 CAPÍTULO II.

ESTUDO DA MANIPULAÇÃO BIOQUÍMICA DE *NOSTOC* sp. POR MEIO DE ALTERAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DA CULTURA

RESUMO

Nos últimos anos a busca por produtos de origem sustentável vem se expandindo e cianobactérias são fonte renovável de biomoléculas de interesse biotecnológico, como carboidratos, proteínas, e pigmentos com propriedades antioxidantes. Este estudo tem como objetivo a manipulação da composição bioquímica de uma cianobactéria em busca de maior rendimento de biomoléculas e bioatividade. Como agentes manipuladores, testamos o NaCl e o Cobre (Cu) em experimentos separados, cada qual em exposição a diferentes cores de luz, buscando um efeito sinérgico. Preliminarmente foram cultivadas 3 cianobactérias (*Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp.) em amplitude de concentração de NaCl de 0 até 30 g L⁻¹ e de cobre de 4x10⁻⁸ até 9x10⁻⁴ mol L⁻¹ para definir cepa e concentração dos agentes manipuladores. *Nostoc* sp. foi selecionada e as concentrações definidas foram 3,5 g L⁻¹ NaCl e 7,6x10⁻⁸ mol L⁻¹ cobre. Cultivos com NaCl e cobre foram expostos à luz branca nas primeiras 48h, e nas 96h seguintes expostos à luz LED de cores vermelho, azul e verde. Em 48h e 96h foram determinados proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos, fenóis e atividade antioxidante, e em 144h o teor de polihidroxialcanoato e a composição elementar. *Nostoc* sp. apresentou menor taxa de crescimento em meio com adição de cobre e de NaCl do que no controle. *Nostoc* teve menor taxa de crescimento em luz azul e verde, mas em luz vermelha foi similar ao controle. Os resultados mostraram papel chave dos pigmentos nas condições adversas, em 48h de cultivo carotenoides e clorofila *a* aumentaram na presença do cobre, mas com NaCl aumentou ficobiliproteínas. NaCl e Cu resultaram em menor produção de carboidratos, proteínas e lipídios em 48h. Luz vermelha e verde promoveram aumento da atividade antioxidante e luz azul maior produção de compostos fenólicos. Luz verde resultou em maiores teores de PHA. Os parâmetros fotossintéticos foram mais conservados do que os de crescimento frente ao aumento do NaCl e do cobre. A luz azul resultou em maior rendimento quântico máximo e efetivo, maior eficiência de captura e uso da luz e rETR_{max}, mas menor dissipação fotoquímica. Esse trabalho é uma contribuição para o entendimento do efeito isolado de cloreto de sódio e de cobre e em conjunto com diferentes qualidades de luz, sendo uma ferramenta útil para processos biotecnológicos futuros.

palavras-chave: biotecnologia; LEDs; proteínas; carboidratos; lipídios; pigmentos; polihidroxialcanoatos; antioxidante; fotossíntese; respostas fotossintéticas;

4.1 INTRODUÇÃO

A obtenção de matéria-prima para produção de materiais do cotidiano que sejam provenientes de fontes sustentáveis é um campo em expansão nas últimas décadas. Dentre as possibilidades o uso de organismos como bactérias, fungos e microalgas/cianobactérias tem se destacado.

Cianobactérias são organismos procarióticos fotossintetizantes e presentes em diversos ambientes (KHAN; SHIN; KIM, 2018), mas principalmente no ambiente aquático. Esses organismos têm a habilidade de alterar sua composição bioquímica em função de variações ambientais, assim adaptando-se às diferentes condições que o meio lhes impõe. Esse processo pode ser referido como plasticidade fisiológica (KOCH; FORCHHAMMER, 2021).

A biomassa de cianobactérias vem sendo estudada como fonte de proteínas, carboidratos, lipídios e outros biocompostos (CASTRO-VARELA et al., 2021; MORONE et al., 2019; PAGELS et al., 2021). Tem-se por exemplo que espécies com altos teores de proteínas podem ser utilizadas na aquicultura (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009; KAAMOUSH et al., 2022), com altos teores de carboidratos na produção de bioetanol e produtos para fermentação (KHAN; SHIN; KIM, 2018) e, altos teores lipídicos, em vários setores, dependendo da composição de ácidos graxos (UDAYAN; ARUMUGAM; PANDEY, 2017). Possuem clorofila *a* e carotenoides, utilizados na indústria alimentícia e cosmética (SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018), além de pigmentos acessórios como ficocianina, usada como corante na indústria alimentícia (GALETOVIC et al., 2020).

Para uso industrial e comercial tem-se buscado espécies que apresentem altas taxas de crescimento, muita biomassa e um alto teor de biomolécula de interesse. Entretanto, pode-se também usar estratégias para estimular a produção das biomoléculas, e processos de manipulação bioquímica são uma delas (BLAGOJEVIĆ et al., 2018; MORONE et al., 2019). A diversidade de processos de manipulação existentes na literatura é significativa. Tem sido proposto diferentes cores de luz (KIM et al., 2014), diferentes concentrações de nitrato (COSTA et al., 2018a), de fosfato (DEVI et al., 2022), de cobre (KAAMOUSH et al., 2022), de NaCl (BLUMWALD; TEL-OR, 1982), dentre outros. Entretanto, a junção de 2 processos em busca de um efeito sinérgico que

potencialize o acúmulo de biomoléculas é mais rara. CHIA et al. (2015) combinou adição de cádmio com depleção de fosfato e mostrou aumento de até 300% na produção de lipídios em *Chlorella vulgaris*.

O cobre é um micronutriente essencial para o fitoplâncton, participando de processos metabólicos essenciais, como a fotossíntese (RAVEN; EVANS; KORB, 1999), sendo requerido na plastocianina. Em baixas concentrações (da ordem de 10^{-8} molL⁻¹ ou ambientais), o cobre pode ter um efeito estimulante no crescimento do fitoplâncton (KAAMOUSH et al., 2022), mas sabe-se que em altas concentrações (acima das normalmente requeridas) esse metal pode ter um efeito tóxico (SEDER-COLOMINA et al., 2013). Em altas concentrações (acima de 10^{-6} molL⁻¹) o cobre pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), degradando, por exemplo, membranas celulares (AHAD; SYIEM, 2018).

Sabe-se que assim como o cobre, a adição de cloreto de sódio (NaCl) em cultivos de cianobactérias pode resultar em mudanças na composição bioquímica. O NaCl em concentrações acima das adequadas produz ROS e gera desbalanço osmótico e iônico no citosol de cianobactérias (BLUMWALD; TEL-OR, 1982). Frente a esse estresse, esses organismos podem aumentar a expressão de biomoléculas antioxidantes e produzir solutos para diminuir a toxicidade do NaCl (REED; STEWART, 1985; REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019; SINGH et al., 1996).

Grande parte dos estudos na literatura se utilizam de estressores químicos em altas concentrações (MOISANDER; MCCLINTON; PAERL, 2002; REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019; SINGH et al., 2014). Nesses casos ocorre o ganho na produção da biomolécula de interesse, porém com perda drástica na taxa de crescimento (CHIA et al., 2013; 2015). Além disso, em situações de estresse as células se tornam fragilizadas e vulneráveis à perda de material intracelular durante a coleta. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de processos que aumentem o rendimento dessas biomoléculas sem comprometer a taxa de crescimento e a qualidade da biomassa. Como organismos fotossintetizantes, além de mudanças na concentração de agentes químicos, as cianobactérias respondem à variação na qualidade (ou cor) da luz de cultivo. Podem ser afetados pela mudança na qualidade da luz a composição de proteínas, carboidratos, lipídios e pigmentos, além da atividade antioxidante e fotossintética (COULOMBIER et al., 2020).

Partindo-se da premissa de que concentrações ambientais de metais possam ocasionar um ajuste metabólico nas células, mas menor efeito nas taxas de crescimento, a biomassa gerada carregaria consigo concentrações mais elevadas de biomoléculas. Essas concentrações não são tão elevadas em comparação com estresses que ocasionem redução significativa na taxa de crescimento, como mostrado em CHIA et al. (2013) e, portanto, um efeito de sinergia com algum outro fator de manipulação pode produzir resultados de interesse. Este estudo é uma contribuição para a otimização da produção de biomoléculas em diferentes condições abióticas.

Neste capítulo buscou-se introduzir um efeito sinérgico quanto ao acúmulo de biomoléculas mediante a exposição a diferentes cores de luz em cultivos que estavam expostos por 48h a baixas concentrações de cobre ou de NaCl. Assim, avaliamos alguns parâmetros fisiológicos de uma cianobactéria (*Nostoc* sp.) frente a mudanças químicas (NaCl e cobre) e físicas (cores de luz LED) nos cultivos. De 48h a 144h as culturas foram expostas à luz LED de cores azul, ou vermelha ou verde, além da branca usada como controle. Os parâmetros fisiológicos que se investigou foram crescimento populacional e biomoléculas, e fotossíntese. Assim, para melhor organização deste capítulo, sua discussão está dividida em 3 subitens, como listados a seguir.

3.4.1 Estudo preliminar: seleção de concentrações de NaCl e cobre para manipulação bioquímica

3.4.2 Efeito da manipulação bioquímica no crescimento e composição de biomoléculas em Nostoc sp.

3.4.3 Efeito da manipulação bioquímica na fotossíntese em Nostoc sp. com enfoque em curvas rápidas de luz

4.2 METODOLOGIA

Para o estudo que se apresenta neste capítulo, as amostragens dos cultivos foram feitas em 3 tempos experimentais distintos: em 48h para obtenção de informações relativas somente à exposição aos agentes NaCl e cobre, em 96h para obtenção de informações relativas à sinergia do NaCl e cobre com cores de luz branca (controle), azul, vermelha e verde e, em 144h, com as culturas já em fase estacionária, as amostragens

foram feitas para a quantificação de polihidroxialcanoatos (PHA) e composição elementar (CHNS).

Três espécies de cianobactéria foram testadas preliminarmente como candidatas ao estudo da manipulação bioquímica com base nos resultados da prospecção (capítulo 1 desta tese) por apresentarem maior rendimento de PHA em condição ideal de cultivo (~2%) e maior taxa de crescimento dentre as 20 espécies investigadas. As espécies selecionadas foram *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp. Essas cepas foram cedidas pela professora Dra. Célia Leite Sant'anna, do Instituto de Botânica, Secretária do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. Não temos informação sobre a toxicidade das cepas e nem tampouco isso foi abordado neste estudo.

Seleção de concentrações de NaCl e cobre para manipulação bioquímica

Para selecionarmos uma concentração do cloreto de sódio e uma do cobre que não resultassem em mudança significativa no crescimento populacional, realizou-se um estudo preliminar em microplacas de 96 poços com volume de 300 µL cada poço e seus efeitos no crescimento foi monitorado diariamente por absorvância em 684 nm (EpochTM Microplate Spectrophotometer, U.S.A.). Vinte concentrações de cobre (valores nominais) em amplitude de 4×10^{-8} até 3×10^{-5} mol L⁻¹ e 20 concentrações de NaCl de 0 até 30 g L⁻¹, como apresentado na tabela 1 foram testadas nas 3 espécies de cianobactérias. Todos os tratamentos foram feitos com 3 réplicas.

Tabela 1: Concentrações nominais de cloreto de sódio (NaCl) e cobre (Cu) para o estudo preliminar de definição das concentrações a serem usados nos experimentos de manipulação bioquímica nas cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp.

Tratamento	NaCl		[Cu]	
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	g L ⁻¹	mol L ⁻¹
1 - Controle	0	0	2,55x10 ⁻⁶	4,00x10 ⁻⁰⁸
2	0,25	4,30x10 ⁻³	3,80x10 ⁻⁶	6,00x10 ⁻⁰⁸
3	0,50	8,60x10 ⁻³	5,70x10 ⁻⁶	9,00x10 ⁻⁰⁸
4	1,00	1,70x10 ⁻²	7,65x10 ⁻⁶	1,20x10 ⁻⁰⁷
5	1,50	2,60x10 ⁻²	9,55x10 ⁻⁶	1,50x10 ⁻⁰⁷
6	2,00	3,40x10 ⁻²	1,90x10 ⁻⁵	3,00x10 ⁻⁰⁷
7	2,50	4,30x10 ⁻²	3,80x10 ⁻⁵	6,00x10 ⁻⁰⁷
8	3,00	5,10x10 ⁻²	5,72x10 ⁻⁵	9,00x10 ⁻⁰⁷
9	3,50	6,00x10 ⁻²	7,63x10 ⁻⁵	1,20x10 ⁻⁰⁶
10	4,00	6,85x10 ⁻²	9,55x10 ⁻⁵	1,50x10 ⁻⁰⁶
11	4,50	7,70x10 ⁻²	1,90x10 ⁻⁴	3,00x10 ⁻⁰⁶
12	6,00	1,00x10 ⁻¹	2,85x10 ⁻⁴	4,50x10 ⁻⁰⁶
13	7,00	1,20x10 ⁻¹	3,80x10 ⁻⁴	6,00x10 ⁻⁰⁶
14	8,00	1,40x10 ⁻¹	4,80x10 ⁻⁴	7,50x10 ⁻⁰⁶
15	10,0	1,71x10 ⁻¹	5,70x10 ⁻⁴	9,00x10 ⁻⁰⁶
16	12,5	2,15x10 ⁻¹	6,70x10 ⁻⁴	1,05x10 ⁻⁰⁵
17	15,0	2,60x10 ⁻¹	7,65x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁰⁵
18	20,0	3,40x10 ⁻¹	8,60x10 ⁻⁴	1,35x10 ⁻⁰⁵
19	25,0	4,30x10 ⁻¹	9,55x10 ⁻⁴	1,50x10 ⁻⁰⁵
20	30,0	5,15x10 ⁻¹	1,90x10 ⁻³	3,00x10 ⁻⁰⁵

O meio de cultivo utilizado foi o BG11 (RIPPKA, 1988) autoclavado (20 min, 121 °C, 1 bar; AV Phoenix Lufenco, Brazil). O controle foi intitulado de BG11-N (BG11 normal). O tratamento BG11-Cu é referente ao meio com adição de cobre (AAS/ICP, 1000 mg L⁻¹, 38996 Sigma-Aldrich, USA) e o BG11-NaCl referente ao tratamento com adição de NaCl (Synth, American Chemical Society). Para os tratamentos com adição de cobre tomou-se o cuidado de adicionar o metal 24 h antes da inoculação da cianobactéria para que o equilíbrio químico com o meio fosse atingido.

As microplacas foram cobertas com Parafilm® para minimizar a evaporação e incubadas em luz branca durante 120h, com ciclo claro: escuro de 12h: 12h em sala

climatizada (24 ± 1 °C). As intensidades luminosas de cultivo foram obtidas de curvas rápidas de luz determinadas previamente em um fluorômetro de pulso de amplitude modulada (PHYTO-PAM II, Heinz Walz, Germany). Os valores de irradiância de cultivo para *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp. foram, respectivamente, 150, 200 e 200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As taxas de crescimento foram calculadas a partir das curvas de crescimento com base no logaritmo natural da absorb\u00e2ncia em 684 nm *versus* o tempo de cultivo. O valor do coeficiente angular do ajuste linear da curva no per\u00edodo exponencial corresponde ao valor da taxa de crescimento (μ , d^{-1}).

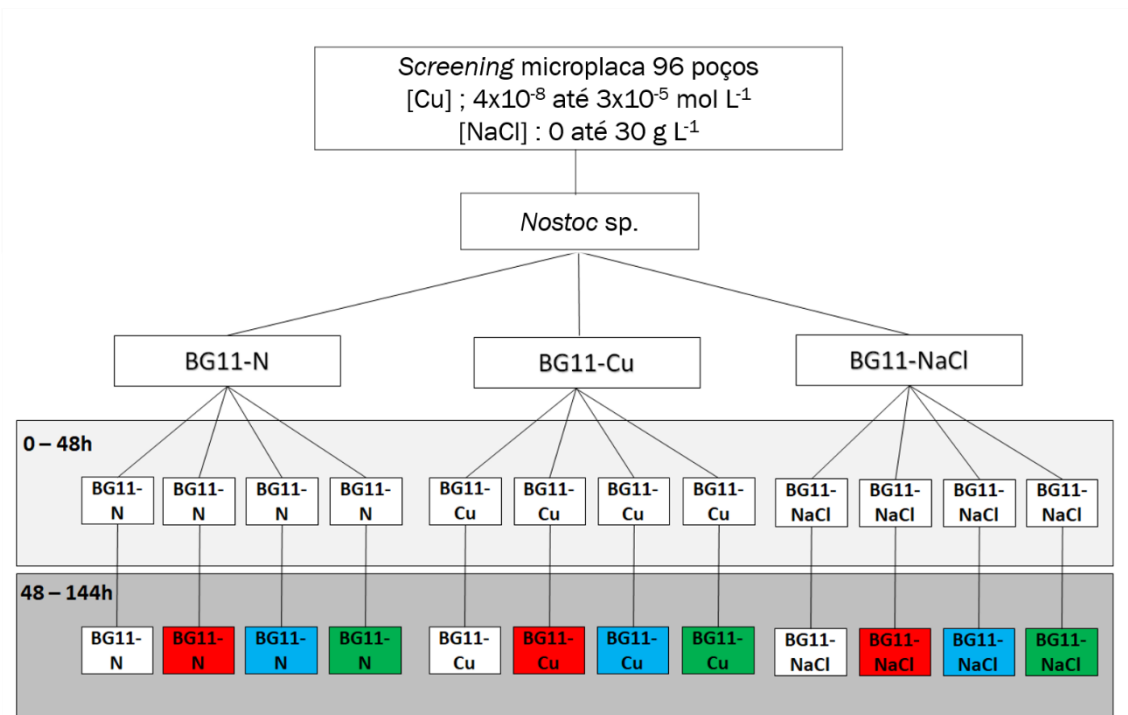
Para quantificar o efeito do estresse por NaCl e cobre em cada esp\u00e9cie calculamos o valor de EC20, que foi realizado com o aux\u00edlio do programa Graph Pad Prism 6. Estes valores foram usados no estudo da manipula\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica.

Finalizado o estudo preliminar e analisados os resultados, a sele\u00e7\u00e3o da cianobact\u00e9ria *Nostoc* sp. para a etapa de manipula\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica foi feita e teve como base a resposta ao estresse qu\u00edmico no meio, al\u00e9m da facilidade da coleta de biomassa quando pensamos em uma escala industrial.

Manipula\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica

A cepa selecionada para o processo de manipula\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica foi *Nostoc* sp. Este estudo foi realizado no Laborat\u00f3rio de Biotecnologia de Algas, UFSCar, Brasil, em parceria com o Laborat\u00f3rio de Investiga\u00e7\u00e3o Aqu\u00e1tico Ambiental (LACER) do Centro de Estudos Avan\u00e7ados/HUB Ambiental, Universidade de Playa Ancha, Chile.

O experimento de manipula\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica (fluxograma 1) foi realizado em fotobiorreatores (FBR) tubulares de vidro borosilicato, do tipo *air-lift*, com borbulhamento de ar filtrado (0,22 μm ; Chromafil Xtra PUF 20/25) por meio de bombas comerciais (Big Air, AZ30) e uso de pedras porosas. O pH do cultivo foi mantido entre 7,8 e 8,4 por meio da inser\u00e7\u00e3o autom\u00e1tica de CO_2 (25%) em mistura com arg\u00f4nio (75%). O volume de cultivo foi 2L, fotoper\u00edodo de 12h: 12h claro: escuro feito com diodos emissores de luz (LED) e irradi\u00e2ncia saturante de 200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A intensidade luminosa foi ajustada diariamente de modo a mant\u00ea-la constante independente da densidade populacional.



Fluxograma 1. Esquema experimental de manipulação bioquímica em cultivos de *Nostoc* sp. que tem duração total de 144h.

O processo de manipulação consistiu na exposição de *Nostoc* sp. durante 48h à três condições de cultivo sob luz LED branca, sendo elas, controle com meio BG11 normal (BG11-N), com adição de 3,5 g L⁻¹ NaCl (BG11-NaCl) e com adição de cobre (nominal) de 7,6x10⁻⁸ mol L⁻¹ (BG11-Cu). Após 48h de cultivo, foi realizada a troca de cores de luz, por luz azul, vermelha e verde, exceto no controle, que permaneceu sob luz branca. A exposição às luzes coloridas permaneceu por 96h. A emissão do espectro de luz para todas as cores foi verificada usando-se um espectroradiômetro Ocean Opticus UBS 2000 com fibra óptica BIF-600-UV-VIS e software OIBase32 (Dunedin, FL). O espectro de luz confirmou as diferentes qualidades dos LEDs (branco 455/566 nm, azul 445 nm, verde 521 nm e vermelha 652 nm). Para evitar influência de luzes externas, os reatores foram revestidos com papel alumínio. A figura 1 é uma fotografia com os fotobiorreatores (FBR) ilustrando as cores dos LEDs e o papel alumínio usado no revestimento.

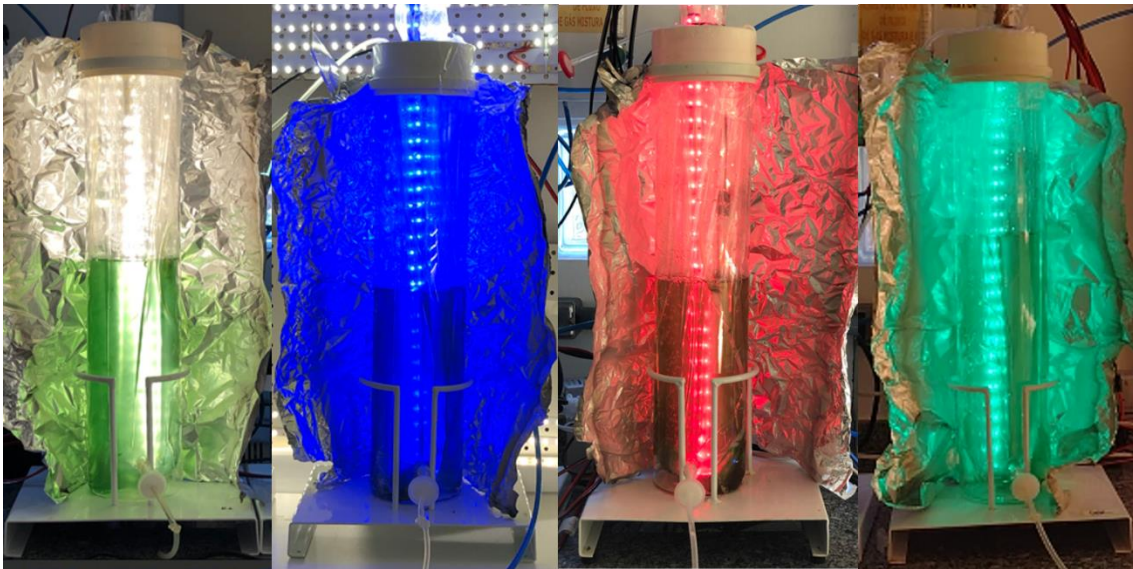


Figura 1. Cultivos de *Nostoc* sp. em fotobiorreator cilíndrico ilustrando as cores de LED e revestimento com papel alumínio.

Parâmetros de crescimento

Diariamente foi determinada a concentração de clorofila *a in vivo* (Turner Designs, Trilogy, USA). A biomassa seca foi quantificada em 48h e 96h de cultivo a partir da filtragem de amostras em filtros de fibra de vidro (Sartorius – Germany) previamente muflados e com massa aferida em uma balança analítica de 1 µg de precisão (Mettler Toledo, XPE26). Os dados de concentração de clorofila *a* em função do tempo experimental foram plotados em gráfico e um ajuste por meio de regressão linear foi feito para os resultados obtidos nas 48h iniciais do cultivo. O coeficiente angular da reta é equivalente à taxa de crescimento específica.

Composição bioquímica e atividade antioxidante

Em 48h e 96h de cultivo foram feitas as determinações bioquímicas. A concentração de clorofila *a* e carotenoides foi feita a partir de biomassa liofilizada e extração com acetona 80% e absorvância medida em espectrofotômetro em 480, 664 e

647 nm (RITCHIE, 2008). Para determinação de ficobiliproteínas foram centrifugados 10 mL de cultura, o sobrenadante foi descartado e o pellet extraído a partir de uma solução tampão pH 7,5 (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) e absorvância registrada em espectrofotômetro em 620, 650, 565 nm (YÉPRÉMIAN et al., 2017). Foram centrifugados 5 mL e 20 mL de cultura para determinação de proteínas e carboidratos totais, respectivamente, e os pellets congelados em -80 °C até a análise. A determinação de proteínas totais foi feita com extração por ácido tricloroacético quente e solução alcalina (SLOCOMBE et al., 2013) e solução padrão de 2 mg mL⁻¹ de albumina bovina. Carboidratos foram determinados como descrito em ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI (2013), com glicose como padrão (1 mg mL⁻¹). Lipídios totais foi quantificado por gravimetria em uma balança analítica de 1 µg de precisão (Mettler Toledo, XPE26) e a extração lipídica seguiu o descrito em FOLCH et al. (1957) com modificação de PARRISH (1999) em solução de clorofórmio: metanol (2:1).

Também em 48h e 96h, a atividade antioxidante e compostos fenólicos foram determinados a partir de biomassa liofilizada e as extrações realizadas com o solvente metanol 80%. Para compostos fenólicos uma curva padrão foi produzida com fluoroglucinol e para DPPH foi usado Trolox como padrão (CELIS-PLÁ et al., 2014, 2021).

A cultura foi mantida até 144h para entrada na fase estacionária de crescimento, quando todo o cultivo foi centrifugado e liofilizado. Usando-se a biomassa liofilizada foi feita a determinação da porcentagem de polihidroxialcanoatos (PHA). PHA foi determinado conforme o descrito em COSTA et al. (2018), com rompimento celular com hipoclorito de sódio, extração em clorofórmio e precipitação em metanol.

Parâmetros fotossintéticos

Em 48 h e 96 h foram determinados os parâmetros fotossintéticos. Para isso utilizou-se um PHYTO-PAM II (Walz- Germany) e utilizadas as equações apresentadas em JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC (2002). Esta análise é realizada pela variação nas fluorescências emitidas pelas moléculas de clorofila *a* antes e após a excitação por um pulso luminoso saturante. O rendimento quântico máximo (Φ_M) foi determinado em células aclimatadas ao escuro (20 min) e calculado pela equação (1) mostrada a seguir,

onde F_m é a fluorescência máxima e F_o a fluorescência mínima (basal) de células adaptadas ao escuro.

$$\Phi_M = (F_m - F_o) / F_m \quad (1)$$

Os rendimentos quânticos efetivos (equação 2) e as dissipações fotoquímicas, qP (equação 3 e 4) foram determinados seguindo o descrito em JUNEAU et al. (2002). Essas determinações foram obtidas em células adaptadas à luz actínica (ou PAR). O rendimento quântico efetivo (Φ'_M) é calculado de acordo com a equação 2, onde tem-se que F_s representa a fluorescência estável após exposição à luz actínica, F_m' a fluorescência máxima após a exposição a pulsos de saturação de luz em intervalos de 20 s.

$$\Phi'_M = (F_m' - F_s) / F_m' \quad (2)$$

O decaimento fotoquímico (qP) é um indicativo do potencial de conversão da energia dos fótons capturados em energia química (KRAUSE; WEIS, 1991; MAXWELL; JOHNSON, 2000) e relaciona-se à proporção de centros de reação do PSII que se encontram abertos. O valor de qP foi estimado a partir das equações 3 e 4, onde F_o' é a fluorescência mínima, constante, em células adaptadas à luz, F_v é a fluorescência variável obtida pela diferença entre F_m e F_o .

$$F_o' = F_o / [(F_v / F_m) + (F_o / F_m')] \quad (3)$$

$$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o') \quad (4)$$

As curvas rápidas de luz (RLC) são gráficos do tipo “fotossíntese *versus* irradiância” (FALKOWSKI; RAVEN, 2007), no qual no eixo Y representa-se uma variável indicativa da atividade fotossintética e no eixo X os valores de intensidade luminosa. Para a elaboração das curvas foram coletadas amostras (3 mL) em 48h e 96h de cultivo e deixadas durante 20 min no escuro. Em seguida, pulsos graduais de luz em intervalos de 20 s foram aplicados na amostra. Para determinar o valor da taxa relativa de transferência de elétrons (rETR) os valores de rendimento quântico efetivo foram multiplicados pela irradiância (E). A partir do ajuste matemático de EILERS; PEETERS (1988) calculamos os valores da inclinação inicial das curvas (α), a taxa máxima (relativa) de transporte de elétrons (rETR_{max}), a irradiância saturante (I_k) e irradiância ótima (Eopt).

Para a extração dos parâmetros da RLCs consideramos a fração de irradiância incidente que é absorvida pelas algas e a fração da energia da clorofila relacionada ao PSII, sendo de 0,3 em cianobactérias (JOHNSEN; SAKSHAUG, 2007).

Análise estatística

Os gráficos foram produzidos no programa IGOR Pro 5.04. Foram realizadas análises estatísticas ANOVA one-way para dados de 48h e ANOVA two-way para dados de 96 h e 144 h, ambas no programa JAMOVİ (versão 1.2.27). Os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade foram verificados antes da análise por meio do teste de Shapiro-Wilk.

4.3 RESULTADOS

Para o estudo preliminar, de definição das concentrações de NaCl e de cobre visando à manipulação bioquímica, as taxas de crescimento de *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc* sp. para as diferentes concentrações de NaCl e Cu estão apresentadas na figura 2. Todas as espécies apresentaram sensibilidade ao aumento da concentração de NaCl e de cobre no meio de cultivo. Em concentrações intermediárias de cobre ou do cloreto de sódio houve crescimento populacional para as 3 cepas, porém em altas concentrações as taxas de crescimento foram próximas de zero.

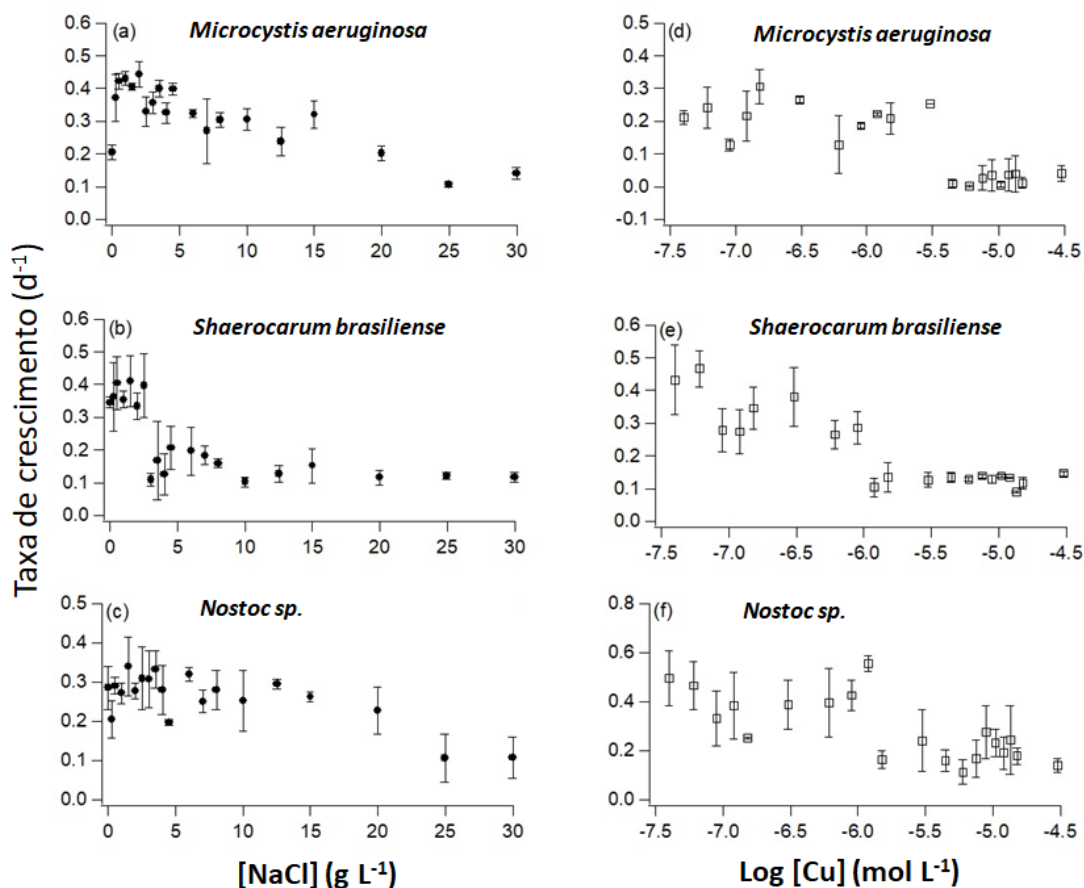


Figura 2. Taxas de crescimento para *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliense* e *Nostoc sp.* em função das concentrações de NaCl (a, b e c) e log de cobre (d, e, f).

Considerando NaCl a espécie mais sensível foi *Sphaerocavum brasiliense* (EC20 1,7 g L⁻¹), seguida por *Microcystis aeruginosa* (EC20 3,3 g L⁻¹) e por fim *Nostoc sp.* (EC20 3,5 g L⁻¹). Em contrapartida, *Sphaerocavum brasiliense* (EC20 6,10x10⁻⁸ mol L⁻¹) foi a espécie mais sensível ao aumento da concentração de cobre, seguida por *Nostoc sp.* (EC20 7,6x10⁻⁸ mol L⁻¹) e *Microcystis aeruginosa* (EC20 1,5x10⁻⁷ mol L⁻¹).

A seguir são apresentados os resultados de crescimento, bioquímica e fotossíntese de *Nostoc sp.* em meio de cultura sob luz branca com adição de cobre e de NaCl durante 48h, e posterior exposição às diferentes qualidades de luz por 48h adicionais.

Parâmetros de crescimento

A figura 3 mostra as curvas de crescimento para *Nostoc* sp. em função do tempo experimental nos diferentes tratamentos.

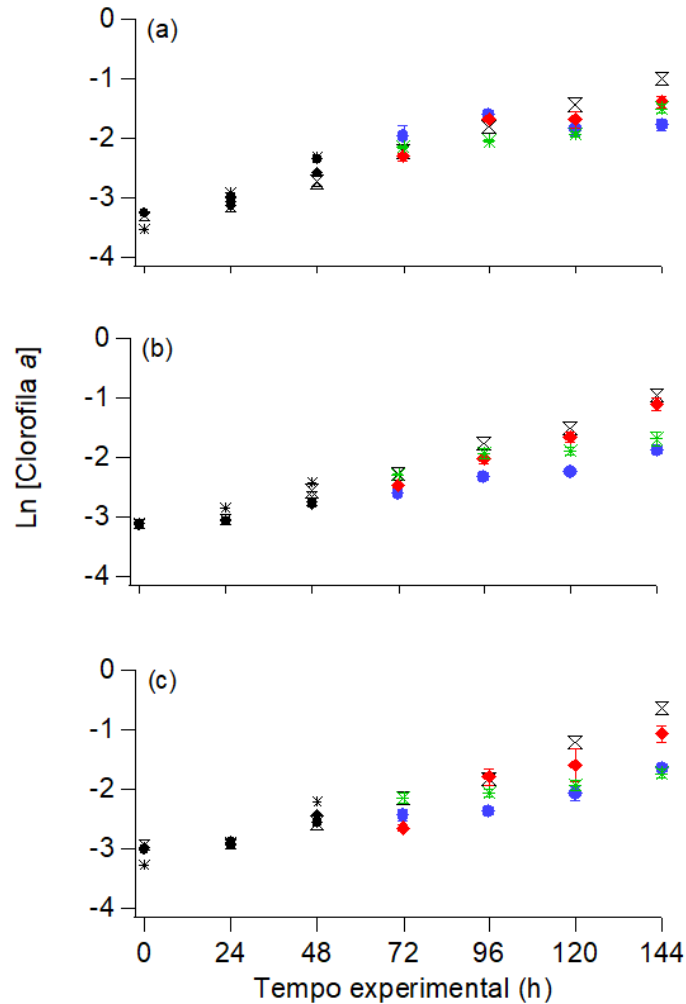


Figura 3. Logaritmo natural da concentração de clorofila *a in vivo* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Nostoc* sp. em função do tempo experimental. Em (a) cultivos em meio BG11 normal, (b) com adição de NaCl e em (c) com adição de cobre. Cores dos pontos representam as cores dos LEDs. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

As taxas de crescimento menores foram obtidas nos tratamentos com adição de NaCl e cobre, em comparação ao controle (ANOVA $p < 0.05$). A taxa de crescimento no controle (BG11-N) foi de $0,42 \text{ d}^{-1}$, enquanto que em BG11-Cu $0,30 \text{ d}^{-1}$ e BG11-NaCl $0,22 \text{ d}^{-1}$.

A biomassa seca de *Nostoc* sp. em 48h e 96h de cultivo é apresentada na figura 4. Nas 48h iniciais, houve um aumento de 2x na produção de biomassa seca no tratamento com adição de cobre quando comparado com o controle (BG11-N), mas nenhum efeito do NaCl foi observado. Apesar disso, ao final de 96h o maior rendimento de biomassa ($p < 0.05$) ocorreu na presença do NaCl. Exposição às cores de luz não ocasionou qualquer efeito em relação ao quantitativo de biomassa seca ($p > 0,057$).

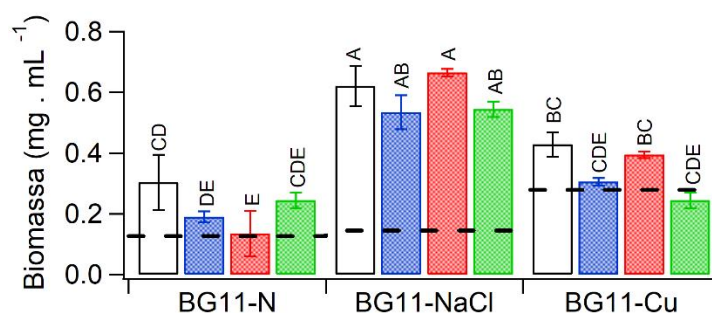


Figura 4. Biomassa seca (mg mL^{-1}) em 48h e 96 h em culturas da cianobactéria *Nostoc* sp. exposta a NaCl e cobre, e sob diferentes qualidades de LEDs. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de biomassa seca em 48h. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Composição bioquímica e atividade antioxidante

A produção de clorofila *a* e carotenoides por unidade de biomassa seca é mostrada na figura 5. Nas 48h iniciais de cultivo, *Nostoc* sp. apresentou aumento de 1,2x na produção de clorofila *a* por unidade de biomassa e de 1,35x de carotenoides nos tratamentos com cobre adicional. Por outro lado, a adição de NaCl no meio de cultivo, não refletiu em ganho na produção desses pigmentos em 48h.

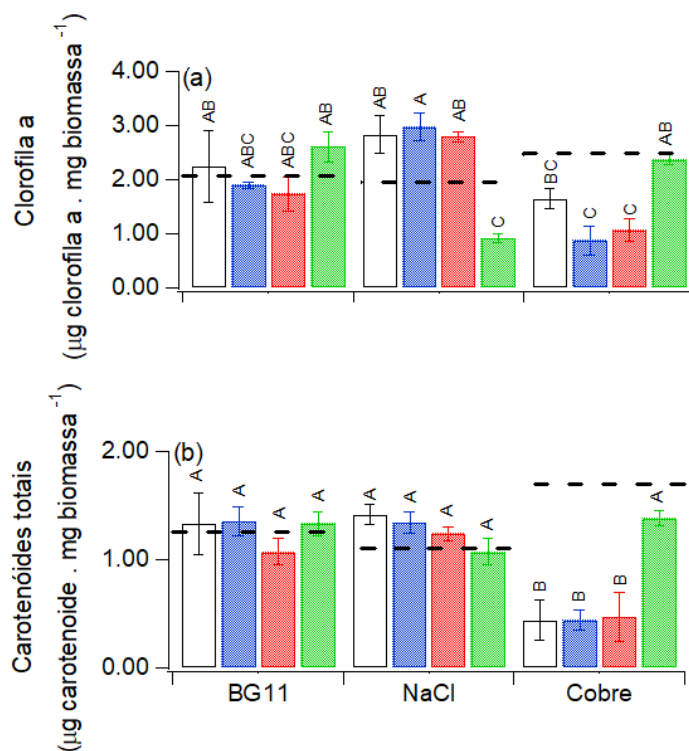


Figura 5. Produção de clorofila *a* e carotenóides em *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96h. Em (a) clorofila *a* e em (b) carotenóides. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a concentração média de pigmentos em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

A produção de clorofila *a* e carotenóides após exposição às luzes coloridas manteve-se estatisticamente similar dentro de cada condição de meio de cultivo, exceto pela luz verde no tratamento com cobre, revelando um efeito sinérgico. Entretanto, este deu-se sem ganho significativo frente ao controle (BG11-N e LED branco).

A figura 6 reporta a produção de ficobiliproteínas por unidade de biomassa seca em diferentes condições de cultivo.

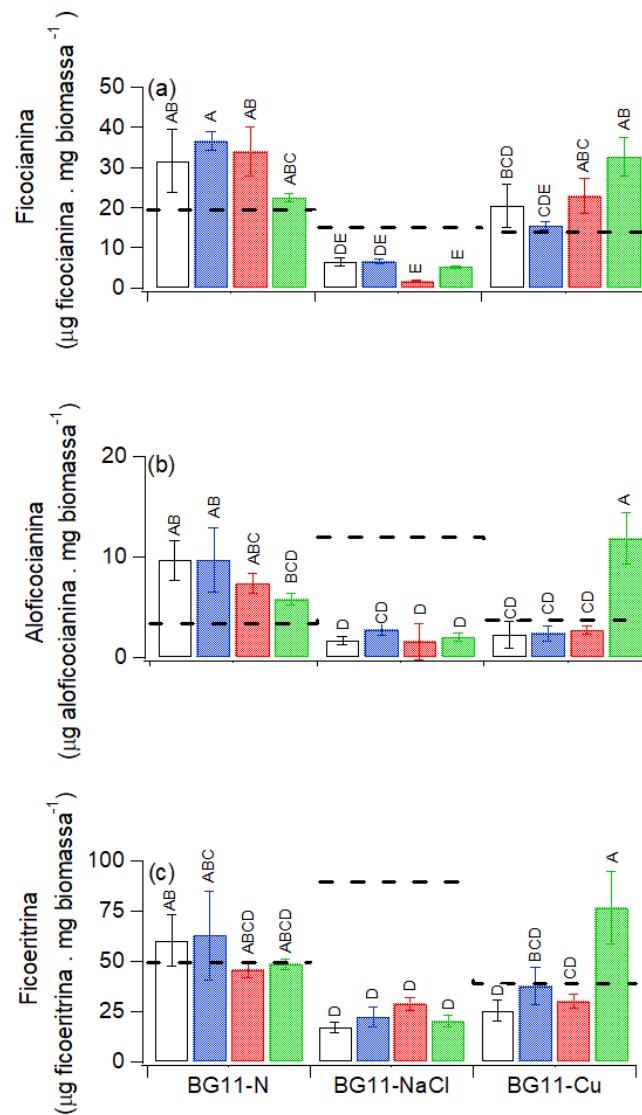


Figura 6. Ficobiliproteínas em *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96h de exposição. Em (a) ficocianina, (b) aloficocianina e em (c) ficoeritrina. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de ficobiliproteínas em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

O tratamento BG11-Cu não resultou em diferença significativa ($p = 0,3$) na produção de ficobiliproteínas em relação ao BG11-N em 48 h. Entretanto, exposta ao NaCl detectou-se um aumento significativo de 3,5x na produção de aloficocianina ($p = 0,02$) e de 1,8x na produção de ficoeritrina ($p = 0,04$) em comparação ao controle. Importante ressaltar que esse aumento não foi mantido ao final de 96 h de cultivo.

De forma geral, assim como para clorofila *a* e carotenoides, obtivemos que as diferentes qualidades da luz não resultaram em mudanças significativas ($p > 0,05$) na produção de ficobiliproteínas dentro de cada condição de estímulo químico. Novamente, a única exceção foi o sinergismo do LED cor verde com a adição de cobre, onde houve um aumento de aloficocianina e ficoeritrina, mas sem ganho real em relação ao BG11-N em luz branca.

Os resultados de proteínas, carboidratos e lipídios totais são mostrados na figura 7. Para proteínas, carboidratos e lipídios a produção por unidade de biomassa foi afetada negativamente nas 48h iniciais de cultivo. A redução da produção por unidade de biomassa foi mais pronunciada (~ 1,5x) quando *Nostoc* sp. foi exposta ao cobre. Ao final de 96 h os tratamentos BG11-N e BG11-Cu não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,27$), porém foram superiores ao obtido em BG11-NaCl ($p < 0.001$). Aqui novamente, não houve ganho entre as diferentes cores de LEDs.

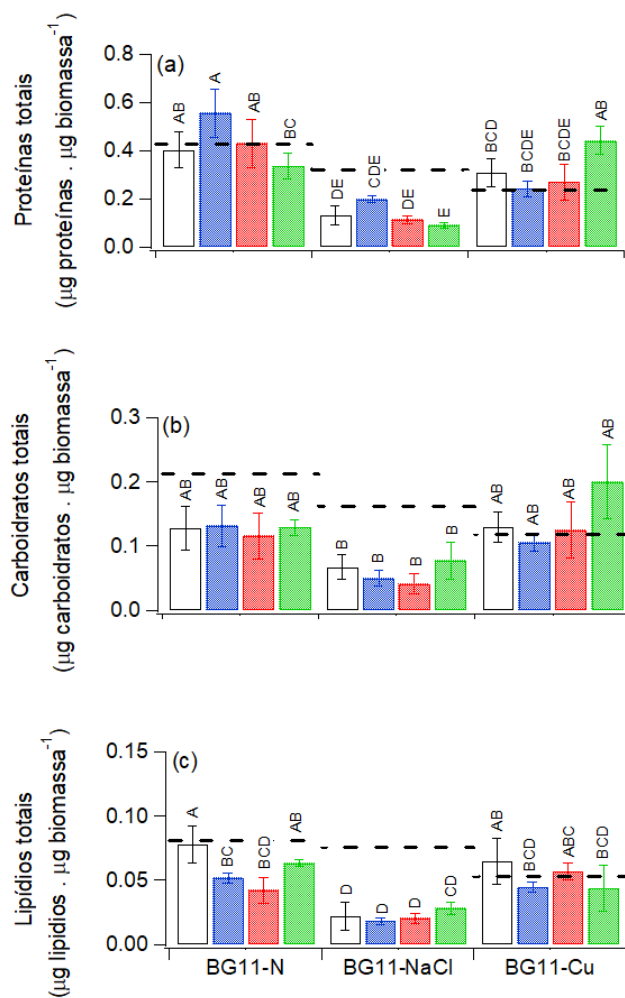


Figura 7. Proteínas totais (a), carboidratos totais (b) e lipídios totais (c) em *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96 h. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de biomoléculas em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

A tabela 2 apresenta os teores de PHA em porcentagem na biomassa de *Nostoc* sp. ao final do cultivo (144 h).

Tabela 2. Teor de polihidroxialcanoato como porcentagem em relação à biomassa seca em *Nostoc* sp. Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média (n = 3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Tratamento	LED Branco	LED Azul	LED Vermelho	LED Verde
BG11	2,21 (0,3) ^{BC}	1,85 (0,8) ^{BC}	2,49 (0,6) ^{ABC}	3,35 (0,6) ^{AB}
NaCl	0,84 (0,1) ^C	1,44 (0,3) ^{BC}	1,68 (0,5) ^{BC}	4,64 (0,7) ^A
Cobre	1,76 (0,4) ^{BC}	2,69 (0,0) ^{ABC}	2,29 (1,2) ^{BC}	2,90 (1,0) ^{ABC}

O teor de PHA na biomassa de *Nostoc* sp. não foi afetado pela adição de cobre ou de NaCl no meio de cultivo ($p = 0,46$), mas sim pelas diferentes cores de luz ($p < 0,001$). Os maiores valores de PHA foram observados em luz verde. Em comparação com o controle (BG11, luz branca) a luz verde promoveu um aumento de 1,5x em BG11-Cu e 1,9x em BG11-NaCl.

A figura 8 mostra os resultados da atividade antioxidante DPPH de *Nostoc* sp. nos diferentes tratamentos.

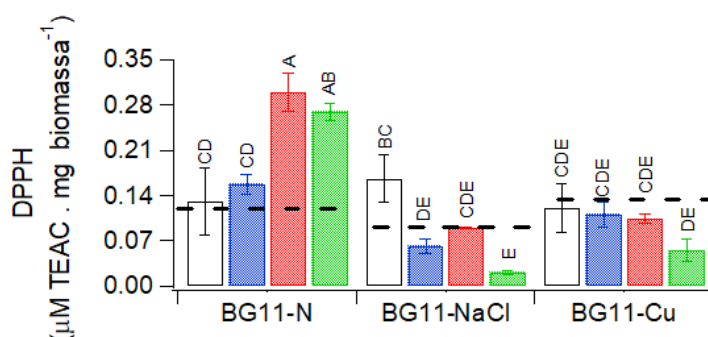


Figura 8. Atividade antioxidante (DPPH) de *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96 h. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média da atividade DPPH em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

A atividade DPPH não foi influenciada nem pelo cobre e nem pelo NaCl ($p = 0,13$) em 48h, mas em 96h de cultivo observamos em *Nostoc* sp. um aumento de 2x na atividade antioxidante em meio BG11-N (controle) em exposição aos LEDs vermelho ($p < 0,001$) e verde ($p < 0,001$).

O teor de fenóis totais para *Nostoc* sp. é mostrado na figura 9. Observamos que nas primeiras 48h de cultivo não houve variação significativa ($p = 0,81$) entre os tratamentos.

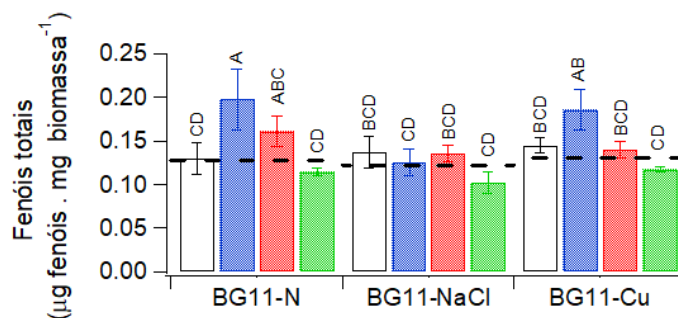


Figura 9. Conteúdo total de fenóis de *Nostoc* sp. para os diferentes tratamentos em 48h e 96h de exposição. As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a média de fenóis totais em 48h para cada condição de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Estatística: letras iguais indicam diferença não significativa.

Na presença de LED azul, *Nostoc* sp. apresentou aumento significativo no conteúdo total de fenóis, sendo 1,4x maior em meio BG11-N ($p < 0.001$) e BG11-Cu ($p = 0,009$) em comparação ao controle (BG11-N em exposição a LED branco).

A composição elementar de *Nostoc* sp. ao final dos cultivos é mostrada na tabela 3. Não se detectou diferença significativa na composição elementar mesmo considerando os vários tratamentos. As porcentagens obtidas foram: carbono 40%, hidrogênio 6%, nitrogênio 10% e enxofre 4%. De forma geral, a razão C/N não apresentou variação entre os diferentes tratamentos ao final do tempo experimental.

Tabela 3. Composição elementar (CHNS) em *Nostoc* sp. ao final de 144h de cultivo em exposição ao metal cobre ou cloreto de sódio, ambos em conjunto com diferentes qualidades de luz LED. Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média (n = 3). Estatística: para cada elemento químico letras iguais indicam diferença não significativa.

Tratamento	% C	% H	% N	% S	C/N
BG11-N					
Branco	39,8 (1,2) ^A	6,46 (0,47) ^{AB}	9,05 (0,66) ^A	4,65 (0,72) ^A	4,40 (0,19) ^{AB}
Azul	40,8 (0,77) ^A	6,45 (0,10) ^{AB}	9,94 (0,26) ^A	3,61 (0,42) ^A	4,11 (0,05) ^{ABCDE}
Vermelho	39,6 (0,41) ^A	6,13 (0,56) ^{AB}	9,11 (0,28) ^A	4,11 (0,53) ^A	4,35 (0,11) ^{ABCD}
Verde	39,6 (1,40) ^A	6,67 (0,42) ^{AB}	10,12 (0,23) ^A	5,56 (0,18) ^A	3,92 (0,07) ^E
BG11-NaCl					
Branco	40,0 (1,64) ^A	6,25 (0,51) ^{AB}	9,15 (0,34) ^A	3,40 (0,91) ^A	4,37 (0,12) ^{ABC}
Azul	39,9 (0,33) ^A	5,55 (0,56) ^B	9,92 (0,23) ^A	3,53 (0,48) ^A	4,02 (0,08) ^{DE}
Vermelho	39,5 (0,92) ^A	6,09 (0,15) ^{AB}	8,90 (0,16) ^A	3,62 (0,56) ^A	4,44 (0,04) ^A
Verde	39,1 (0,24) ^A	6,26 (0,15) ^{AB}	9,58 (0,31) ^A	5,44 (0,04) ^A	4,09 (0,15) ^{BCDE}
BG11-Cu					
Branco	41,5 (0,53) ^A	7,36 (0,07) ^A	10,21 (0,13) ^A	4,42 (0,75) ^A	4,07 (0,04) ^{CDE}
Azul	39,3 (1,24) ^A	5,80 (0,62) ^B	9,53 (0,33) ^A	3,29 (0,66) ^A	4,12 (0,02) ^{ABCDE}
Vermelho	42,2 (4,7) ^A	5,34 (0,06) ^B	10,08 (0,83) ^A	3,91 (1,59) ^A	4,18 (0,12) ^{ABCDE}
Verde	40,5 (0,9) ^A	6,31 (0,48) ^{AB}	9,81 (0,19) ^A	2,81 (1,16) ^A	4,13 (0,01) ^{ABCDE}

Parâmetros fotossintéticos

Na figura 10 são mostrados os resultados de rendimento quântico máximo e efetivo e dissipação fotoquímica em 48h e 96h. Em 48h de cultivo não houve diferença significativa dos tratamentos em comparação ao controle para os rendimentos fotossintéticos máximo (Φ_M) e operacional (Φ'_M). Entretanto, em 96h, analisando o efeito das luzes coloridas, observamos que a luz azul resultou em maiores Φ_M e Φ'_M . A dissipação fotoquímica não diferiu estatisticamente em 48h considerando os tratamentos e o controle (BG11-Cu $p = 0,241$; BG11-NaCl $p = 0,205$), mas BG11-Cu apresentou maior direcionamento para a etapa fotoquímica em comparação com o tratamento BG11-NaCl ($p = 0,02$). Apesar dos maiores rendimentos quânticos em 96h, isso não se refletiu na dissipação fotoquímica.

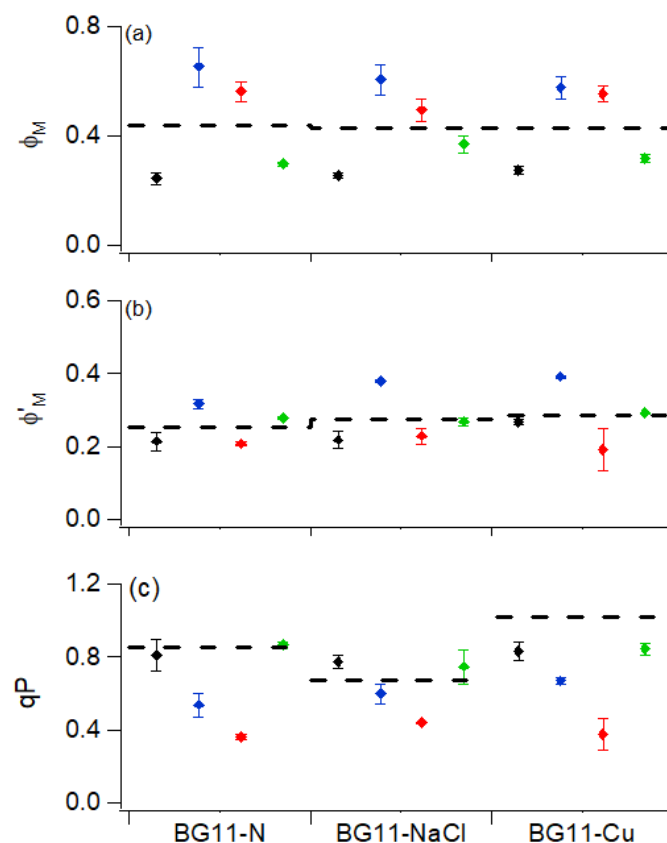


Figura 10. Rendimento quântico máximo (a), rendimento quântico efetivo (b) e dissipação fotoquímica (c) para todos os tratamentos de cobre e sal em 48 h e 96 h. Linha tracejada representa o valor médio em 48 h de tempo experimental. Pontos pretos indicam exposição ao LED branco, azul ao LED azul, vermelho ao LED vermelho e verde ao LED verde. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

A dissipação fotoquímica não diferiu estatisticamente em 48 h considerando os tratamentos e o controle (BG11-Cu $p = 0,241$; BG11-NaCl $p = 0,205$), mas BG11-Cu apresentou maior direcionamento para a etapa fotoquímica em comparação com o tratamento BG11-NaCl ($p = 0,02$). Apesar dos maiores rendimentos quânticos em 96 h, isso não se refletiu na dissipação fotoquímica. Em 96 h, estatisticamente o efeito em qP foi influenciado pelas diferentes qualidades de luz ($p = 0,018$) e não pela adição de cobre ou NaCl no meio de cultivo ($p = 0,3$). Menores valores de qP foram obtidos em exposição à luz azul e vermelha em todos os tratamentos.

As curvas rápidas de luz estão apresentadas na figura 11 (48 h) e figura 12 (96 h). Nas 48h iniciais de cultivo não houve diferença estatística nas RLC, todas seguindo padrão similar.

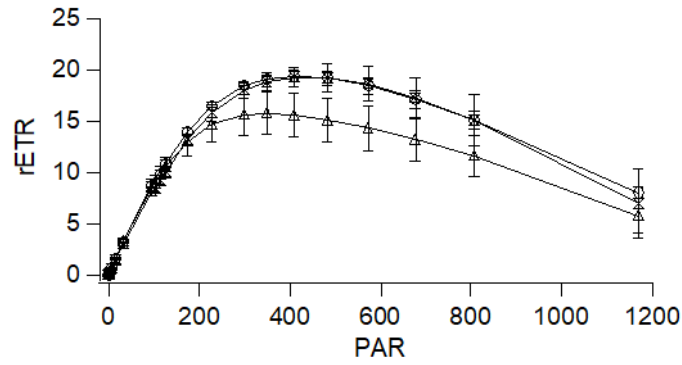


Figura 11. Curva r\u00e1pida de luz em 48 h representada como taxa relativa de transporte de el\u00e9trons (rETR, $\mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). C\u00edrculo: BG11-N; tri\u00e2ngulo: BG11-NaCl; ampulheta: BG11-Cu. Barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia (n = 3).

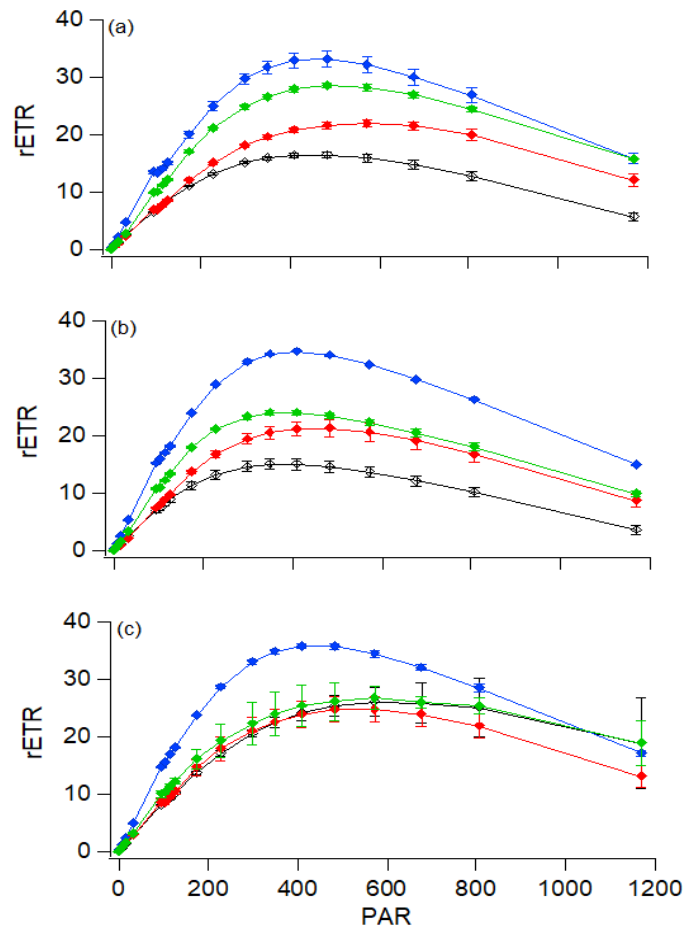


Figura 12. Curvas r\u00e1pidas de luz em 96 h: taxa relativa de transporte de el\u00e9trons (rETR, $\mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Em (a) BG11-N; (b) BG11-NaCl; (c) BG11-Cu. Linhas pretas, culturas expostas a LED branco; linhas azuis, LEDs azuis; linhas vermelhas, LEDs vermelhos; linhas verdes, LEDs verdes. Barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia (n = 3).

O efeito das cores de luz nas RLC nos mostra que ocorreram ajustes na taxa de transporte de elétrons, na eficiência de captura de luz e na sensibilidade quando as células foram submetidas às diferentes cores de luz. Em todas as condições de meio de cultura as curvas com maiores rETR para os diferentes pulsos PARs foram observadas em exposição a luz LED azul. Em meio BG11-N e BG11-NaCl observamos 4 perfis independentes de RLC referentes às diferentes cores de luz. Entretanto em meio BG11-Cu, observamos que o cobre diminuiu a capacidade de resposta de *Nostoc* nas diferentes qualidades de luz. Nesta situação observamos perfis de RLC diferentes em células expostas à LED azul e em comparação às RLCs para luz branca, vermelha e verde.

Os parâmetros extraídos das curvas RLC após tratamento matemático dos dados estão apresentados na figura 13.

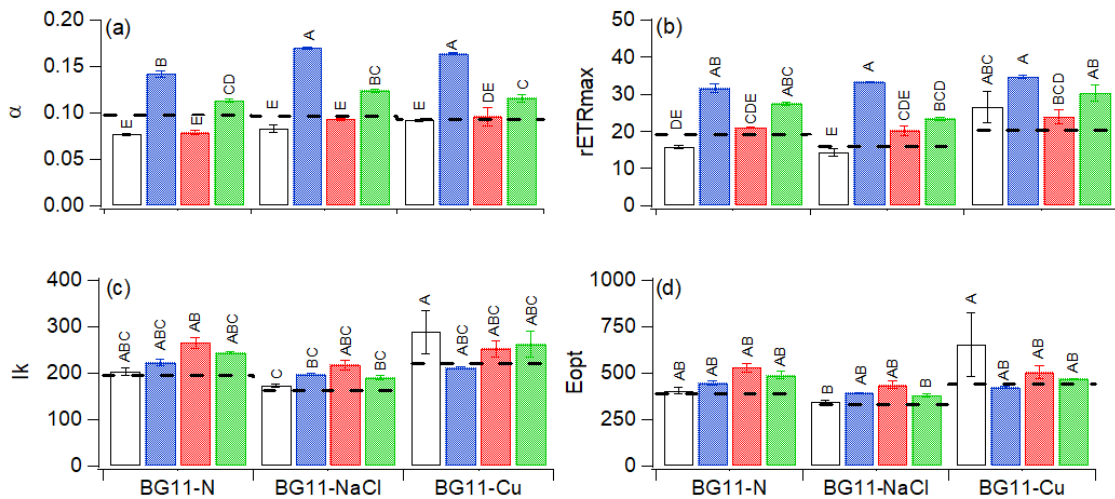


Figura 13. Par\u00e2metros obtidos ap\u00f3s o ajuste da RLC de acordo com Eilers e Peeters (1988). Em (a) α ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (b) rETR_{max} ($\mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (c) I_k ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em (d) E_{opt} ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As cores das barras representam as cores dos LEDs. Linha tracejada indica a m\u00e9dia em 48h para cada condi\u00e7\u00e3o de cultivo. Barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia (n = 3). Estat\u00edstica: letras iguais indicam diferen\u00e7a n\u00e3o significativa.

Durante as 48 h iniciais de cultivo n\u00e3o houve varia\u00e7\u00e3o significativa para qualquer um dos par\u00e2metros das RLC entre os diferentes tratamentos. Os valores de I_k e E_{opt} em 48h foram similares ao I_k (intensidade de luz de cultivo) em BG11-N e BG11-Cu, mas

menores em BG11-NaCl. Em 96h, sob luz colorida houve ajustes fotossintéticos significativos, a eficiência fotossintética (α) aumentou 1,8x ($p < 0,001$) em luz azul e 1,4x ($p < 0,001$) em luz verde em relação ao controle (BG11-N e luz branca). Também houve aumento de $rETR_{max}$ ($p < 0,001$) em exposição a LEDs azuis e verdes. De forma geral, diferentes qualidades de luz não tiveram influência significativa em I_k ($p = 0,12$) e em E_{opt} ($p = 0,40$) dentro de cada meio de cultura.

Para *Nostoc* sp. não houve correlação forte de F_o e nem de F_m com os pigmentos dos ficobilissomas (figura 14).

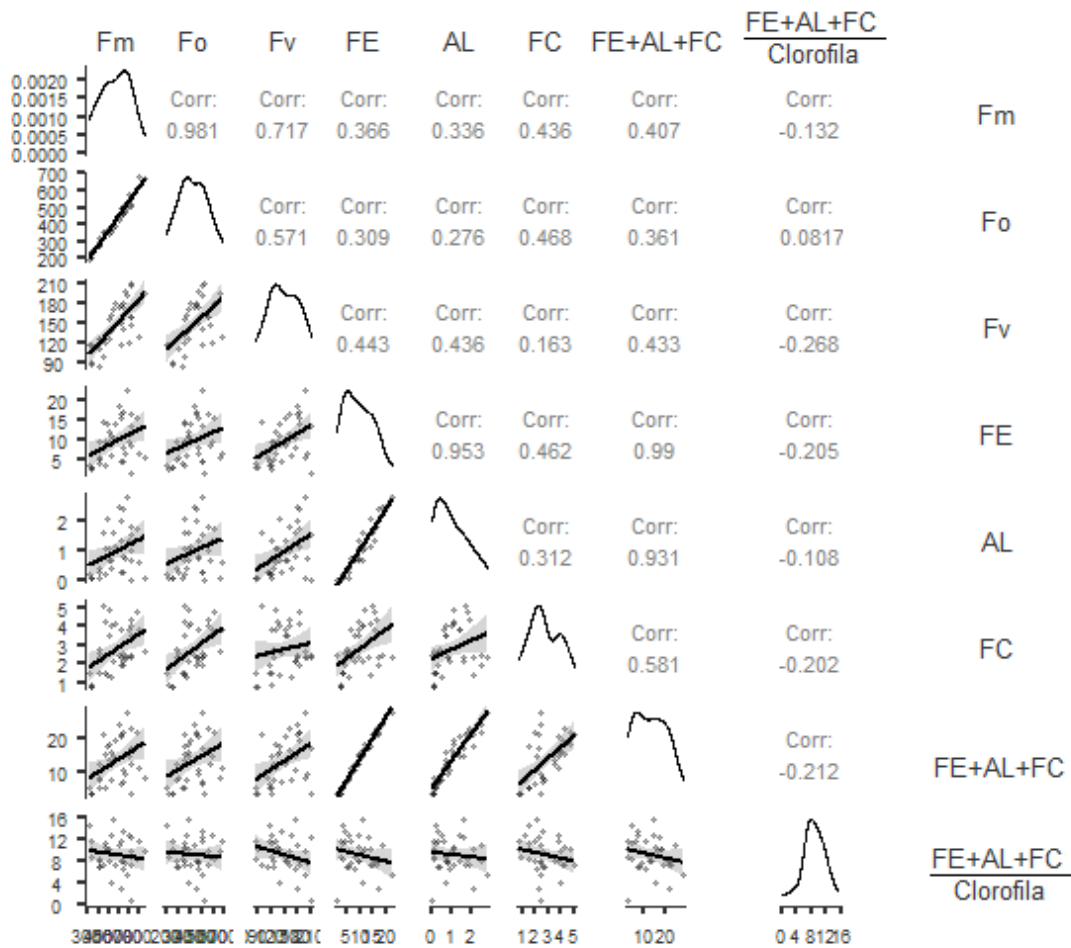


Figura 14. Matriz de correlação para informações do cultivo em fase exponencial de crescimento (48h). Símbolos- FC: Ficocianina; AL: Alocicocianina; FE: Ficoeritrina; FC+AL+FE = somatória das ficobiliproteínas; Fo: Fluorescência mínima em adaptação ao escuro; F_m: Fluorescência máxima em adaptação ao escuro; F_v: Fluorescência variável em amostras adaptadas ao escuro.

4. 4 DISCUSSÃO

4.4.1 Estudo preliminar: seleção de concentrações de NaCl e cobre para manipulação bioquímica

As tolerâncias distintas para as diferentes cepas de cianobactérias estudadas são esperadas, uma vez que se sabe que a sensibilidade para NaCl e cobre varia entre as espécies (KUMAR; SINGH; PRASAD, 2015; REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019) e que estressores ambientais, como excesso de cobre (Silva et al., 2018; Baracho et al., 2019) e variação de pH (KAAMOUSH et al., 2022) podem afetar o crescimento do fitoplâncton. Em um estudo com *Nostoc ellipsorum* e *Nostoc piscinale* em diferentes concentrações de cloreto de sódio, *N. ellipsorum* foi mais tolerante ao aumento da salinidade no meio de cultivo (REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019). Em um outro estudo com 7 espécies de cianobactérias, *Anabaena* sp. apresentou crescimento similar ao controle, suportando até 10 g L⁻¹ NaCl, porém a concentração máxima de NaCl tolerada por *Cylindrospermopsis* sp. foi 2 g L⁻¹ (MOISANDER; MCCLINTON; PAERL, 2002).

A literatura mostra que os efeitos deletérios do estresse salino são resultado do desequilíbrio na homeostase dos íons (BLUMWALD; TEL-OR, 1982), podendo-se esperar que o custo metabólico de adaptação ao cloreto de sódio pode resultar em redução das taxas de crescimento (MOISANDER; MCCLINTON; PAERL, 2002). O íon Na⁺ compete com o K⁺ pela absorção na membrana celular diminuindo a presença do potássio no citosol (KUMAR; SINGH; PRASAD, 2015), gerando problemas para o equilíbrio dos íons. Vale destacar que em alguns casos o aumento da concentração de NaCl no meio pode estimular o crescimento, como observado para *Synechococcus* sp. em concentração de sal de 0,6 g L⁻¹ (VERMA et al., 2019). A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse oxidativo, como resultado da exposição à salinidade pode ocasionar morte celular (PANDEY; CHATTERJEE, 1999; SINGH et al., 2014; VERMA et al., 2019).

Nossos resultados confirmam também a toxicidade do cobre em concentrações acima de 1,5x10⁻⁶ molL⁻¹, o que está de acordo com a literatura. Sabe-se que dependendo da concentração, o cobre é tóxico para cianobactérias (PANDEY; CHATTERJEE, 1999; WU; CHANG; CHEN, 1995), assim como para o fitoplâncton em geral (Lombardi e

Maldonado, 2011; Baracho et al, 2019). Entretanto, há relatos de que em baixas doses, esse metal pode estimular o crescimento, como o observado para *Spirulina platensis* (KAAMOUSH et al., 2022) e microalgas Chlorophyta (Silva et al., 2018; Baracho et al., 2019).

O cobre é um micronutriente essencial para o fitoplâncton em geral e, portanto também para o crescimento de cianobactérias (AHAD; SYIEM, 2018). Nas espécies estudadas, o EC20 para o metal cobre variou de 10^{-8} em *S. brasiliense* e *Nostoc* sp. até 10^{-7} em *Microcystis aeruginosa*. Esses valores estão dentro das concentrações ambientais encontradas nos ecossistemas naturais não perturbados (DEBELIUS et al., 2009; GARDNER; DIXON; COMBER, 2000). Assim como em nosso estudo, na cianobactéria *Anacystis nidulans* (WU; CHANG; CHEN, 1995) e em *Anabaena doliolum* (RAI et al., 1991) foi observado que a inibição da taxa de crescimento aumentava conforme o aumento da concentração de cobre no meio de cultivo. A toxicidade do cobre se deve à sua interferência em diversas rotas metabólicas. SUROSZ; PALINSKA (2004) mostraram mudanças nas membranas dos tilacóides em *Anabaena flosaquae* a partir de 5×10^{-5} mol L⁻¹ de cobre e DENIZ; SAYGIDEGER; KARAMAN (2011) mostraram peroxidação lipídica em *Spirulina* sp. em concentração de $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o que pode levar à degradação de pigmentos fotossintéticos (SEDER-COLOMINA et al., 2013).

Nossos resultados demonstram a especificidade de diferentes espécies à concentração do cobre e do NaCl no meio de cultivo. Com base nesses resultados, a cianobactéria *Nostoc* sp. foi selecionada para a etapa de manipulação bioquímica, pois além de suportar os produtos adicionados no meio, esta espécie é prática no momento de coleta da biomassa ao final do cultivo, pois forma grumos constituídos de densos filamentos. Isso resulta em fácil separação e coleta da biomassa por meio de decantação ou centrifugação.

4.4.2 Efeito da manipulação bioquímica no crescimento e composição de biomoléculas em *Nostoc* sp.

Em exposição ao Cu ($7,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e ao NaCl (3,5 g L⁻¹) a cianobactéria *Nostoc* sp. apresentou diminuição na taxa de crescimento em comparação ao controle.

Outros estudos relatam resultados similares quanto à redução da taxa de crescimento na presença tanto do NaCl como do cobre. *Plectonema boryanum*, *Hapalosiphon intricatus*, *Anabaena doliolum* e *Oscillatoria acuta* apresentaram redução (~25%) no crescimento populacional na presença de NaCl (SINGH et al., 2014). Uma redução de 45% foi obtida em *Synechococcus* sp. 7942 em concentrações elevadas de sal (VERMA et al., 2019). Segundo esses autores, o efeito foi proporcional à concentração salina no meio de cultura. O estresse por NaCl pode interferir na atividade da enzima nitrogenase e na fixação de CO₂, como observado para *Anabaena*, porém em concentração de NaCl 6x maiores do que a usada neste estudo (MOISANDER; MCCLINTON; PAERL, 2002). Nesse mesmo trabalho, *Cylindrospermopsis* apresentou redução na fixação de nitrogênio em concentração de NaCl apenas 1,4x maior do que o utilizado por nós. Reforçamos que a sensibilidade ao sal é espécie-específica.

A adição de cobre também afetou o crescimento de *Nostoc* sp., resultado que está de acordo com outros da literatura. Em um estudo com outra espécie de *Nostoc* AHAD; SYIEM (2018) observaram que o aumento da concentração de cobre resultou em diminuição do crescimento. Apesar disso, os autores descrevem que o crescimento de *Nostoc* foi possível graças a ajustes fisiológicos, como adsorção do cobre na parede celular e acúmulo interno. Sabe-se que frente ao estresse pelo aumento de cobre as cianobactérias podem produzir compostos orgânicos que reduzem a toxicidade do metal (KAAMOUSH et al., 2022).

Uma vez que usamos concentrações baixas (EC20) dos agentes químicos, NaCl e cobre, ajustes metabólicos podem ter ocorrido e, apesar de menores taxas de crescimento em culturas expostas aos agentes, o dobro de rendimento de biomassa seca foi obtido na presença do NaCl (independentemente da cor de luz). Isso sugere que as células possam ter acumulado produtos do metabolismo ou aumentado em tamanho. Em similaridade aos nossos resultados, REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI (2019) investigaram sobre os efeitos do aumento de salinidade até 250 mM (14 gL⁻¹) em *Nostoc ellipsoforum* e *Nostoc piscinale* e observaram, aumento na biomassa seca conforme aumentou a concentração salina. Entretanto, os autores não concluem sobre o motivo do aumento de biomassa e, de fato, isto não está claro na literatura. Sabe-se que além de mecanismos ativos de exportação de sais, em cianobactérias também pode ocorrer o acúmulo de compostos osmoprotetores correspondentes ao potencial osmótico do meio circundante (SCHUBERT; FULDA; HAGEMANN, 1993) e solutos hidrofílicos de baixa massa

molecular (ERDMANN; FULDA; HAGEMANN, 1992) podendo influenciar no aumento da biomassa. Diferente do encontrado em nosso estudo, *Nostoc muscorum* e *Phormidium foveolarum* apresentaram redução na biomassa seca produzida com o aumento até 90 mM ($5,2 \text{ gL}^{-1}$) de NaCl no meio de cultivo (KUMAR; SINGH; PRASAD, 2015).

Corroborando as curvas de crescimento, onde mostramos que *Nostoc* sp. foi capaz de crescer em qualquer uma das cores de luz usadas nesta pesquisa, após as 48h submetidas às luzes coloridas não houve diferença estatística ($p > 0,057$) na biomassa acumulada nos cultivos. Assim como em nosso estudo, KIM et al. (2014) mostrou que cianobactéria *Synechococcus* sp. foi capaz de crescer em luz branca, verde, vermelha e azul, entretanto diferentemente do que obtivemos, os autores encontraram diferença significativa na produção de biomassa em LED vermelho e verde.

Os pigmentos fotossintéticos estão relacionados com o crescimento populacional e mecanismos de defesa em cianobactérias (PAGELS et al., 2020a). O aumento que obtivemos de clorofila *a* e carotenoides em *Nostoc* sp. sob concentrações ambientais de cobre nas primeiras 48h do cultivo difere da literatura. AHAD; SYIEM (2018) mostraram uma redução de 35% no teor de clorofila *a* em *Nostoc muscorum* exposta à dose sub-letal de cobre. Os carotenoides funcionam como sinalizadores e reguladores de muitas vias biológicas (KAAMOUSH et al., 2022), atuando em situações de estresse como captadores de ROS e protegendo as células de danos oxidativos (KAAMOUSH et al., 2022). Assim, o aumento de carotenoides por unidade de biomassa que obtivemos em células expostas a concentrações ambientais de cobre pode ter sido ocasionado por um aumento de sensibilidade da célula à luz devido a um eventual dano oxidativo induzido pelo metal, ainda que a concentração fosse baixa, próxima do EC20. Portanto, expor cianobactérias a concentrações tão baixas de metal (cobre) a ponto de ocasionar um ajuste fisiológico pode ser uma ferramenta promissora para ganho de carotenoides.

Por outro lado, a adição de NaCl no meio de cultivo não refletiu em ganho na produção de clorofila *a* ou carotenoides em 48h. A mesma observação foi descrita no trabalho de BLUMWALD e TEL-OR (1982) para *N. muscorum* em baixas concentrações de NaCl. Sabe-se que cianobactérias modulam seus atributos fisiológicos e bioquímicos em busca de uma tolerância ao estresse salino (VERMA et al., 2019) e o aumento de biomoléculas é relatado na literatura, em geral, para salinidades mais elevadas (REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019). Em outros estudos, as espécies *Nostoc muscorum* e *Phormidium foveolarum* apresentaram redução na produção de clorofila *a* por unidade de biomassa com o aumento de cloreto de sódio (KUMAR; SINGH;

PRASAD, 2015); o mesmo foi observado para *Synechocystis* com o aumento da salinidade no meio (SCHUBERT; FULDA; HAGEMANN, 1993). Diferente do encontrado em nosso estudo, SINGH et al. (2014) mostrou redução drástica de carotenoides em 4 espécies de cianobactérias, porém em concentrações de NaCl 4x maiores que as utilizadas nesta pesquisa.

Processos de biomanipulação por adição de compostos químicos são uma área em expansão. Reforçamos que para a manipulação bioquímica por cobre já nas 48h iniciais (luz branca) pode ser uma ferramenta mais adequada em comparação ao NaCl para o aumento do rendimento de clorofila *a* e carotenoides por unidade de biomassa, uma vez que este metal resultou em ganho na produção dessas duas biomoléculas, funcionando como um estímulo.

Em 96h de cultivo, de forma geral nossos resultados indicam que modulação na concentração de clorofila *a* e carotenoide parece não ser um mecanismo de ajuste para mudanças na qualidade de luz para essa cepa de *Nostoc* sp., como é confirmado por outros estudos. TANDEAU DE MARSAC (1977) não observou diferença na produção de clorofila *a* em 44 cepas de cianobactérias expostas à luz verde, vermelha ou branca. Em luz branca e azul, *Arthrospira platensis* apresentou similar concentração de clorofila *a* (ZITTELLI et al., 2022). A resposta dos pigmentos a diferentes qualidades de luz vem sendo reportada como espécie-específica e relacionada com o tipo de pigmento presente no aparato fotossintético (BRYANT; COHEN-BAZIRE, 1981; TANDEAU DE MARSAC, 1977). Para *Synechococcus* sp., após 8 dias de exposição a diferentes qualidades de luz, houve um aumento da produção de clorofila *a* e ficobiliproteínas sob luz verde e azul em comparação com as cores branca e vermelha (KIM et al., 2014).

As ficobiliproteínas são pigmentos aderidos às lamelas fotossintéticas de cianobactérias e fazem parte dos ficobilissomas, que tem por função a captação de energia luminosa. Seus componentes mais importantes são a ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina (REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019). Neste estudo, a composição de pigmentos dos ficobilissomas em *Nostoc* sp. foi modificada frente aos diferentes estímulos aplicados. O aumento de aloficocianina ($p = 0,02$) e ficoeritrina ($p = 0,04$) em 48h de cultivo mediante adição de NaCl ($3,5 \text{ g L}^{-1}$) em comparação ao BG11-N e BG11-Cu está de acordo com outros estudos. REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, (2019) mostraram que em baixas concentrações de NaCl ($\sim 3 \text{ g L}^{-1}$), duas espécies de *Nostoc* apresentaram ganho significativo nos teores de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina. Em um estudo com *Synechocystis* a adição de cloreto de sódio resultou em

maior espectro de emissão em 660 nm referente ao pigmento aloficocianina (SCHUBERT; HAGEMANN, 1990). Sabe-se que a presença de NaCl pode resultar em aumento de espécies reativas de oxigênio em resposta ao estresse oxidativo e, como as ficobiliproteínas são um mecanismo de defesa frente a esse tipo de estresse (REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019; VERMA et al., 2019), sugerimos que o aumento das ficobiliproteínas possa ter funcionado como um mecanismo de defesa inicial para combater o estresse salino. Inicial pois foi uma resposta que não perdurou nas 96h de cultivo, mas sim em 48h. Em seu estudo, BLUMWALD e TEL-OR (1982) observaram também uma redução drástica de ficocianina em *Nostoc muscorum* e SCHUBERT; FULDA; HAGEMANN (1993) em *Synechocystis* sp., ambos com o aumento da salinidade.

Em meio BG11-Cu não houve diferença significativa ($p > 0,3$) na produção de ficobiliproteínas em comparação ao BG11-N nas primeiras 48 h. Nossos resultados sugerem que *Nostoc* sp. respondeu de maneira diferente ao estresse por cobre e sal. Frente ao aumento de cobre no meio de cultura clorofila *a* e carotenoides foram o mecanismo de defesa. Em contrapartida, com a adição de NaCl houve a manutenção da proporção de clorofila *a* e carotenoides e um aumento de ficoeritrina e aloficocianina, mesmo efeito observado em SCHUBERT e HAGEMANN (1990). Esses resultados reforçam a importância do conhecimento da finalidade da biomassa desejada, a fim de selecionar o melhor estímulo químico para a manipulação.

Nosso estudo mostrou que cores de luz não resultaram em alterações significativas ($p > 0,05$) na produção de ficobiliproteínas em relação ao controle. Sabe-se que somente algumas cianobactérias podem realizar adaptação cromática complementar quando expostas a diferentes comprimentos de onda (BRYANT, 1981; DIAKOFF; SCHEIBE, 1973; GAN; BRYANT, 2015; TANDEAU DE MARSAC, 1977). TANDEAU DE MARSAC (1977) acompanhou a produção de ficobiliproteínas em 44 cepas de cianobactérias em exposição a luz verde, vermelha e branca. Destas, apenas 32 delas alteraram a composição das ficobiliproteínas com a mudança da qualidade da luz, sugerindo uma aclimatação cromática. ZITTELLI et al. (2022) mostraram que *Arthrospira maxima* teve mesma produção de ficocianina em diferentes qualidades de luz. É sabido que dentre as diferentes qualidades de luz de cultivo, a luz azul resulta em um desequilíbrio na absorção de energia entre o PSII e PSI (LUIMSTRA et al., 2018) e, aumento de ficocianina tem sido proposto como um mecanismo de defesa (ZITTELLI et al., 2022), o que não se comprovou com nossos resultados. Sugerimos que o aumento de

ficocianina pode ser um efeito espécie-específico sem descartar a possibilidade de que a manutenção da intensidade luminosa independentemente da cor de luz possa ter contribuído para a resposta que obtivemos.

Chama a atenção nesta pesquisa a drástica redução de todas as biomoléculas, lipídios, proteínas e carboidratos, na presença do NaCl, seja considerando as primeiras 48h de cultivo ou em 96h sob luz colorida. Tal redução de biomoléculas pode estar relacionada com redução na divisão celular, confirmada pela diminuição na taxa de crescimento em 48h. Similar ao nosso estudo, RAI et al. (1991) obtiveram redução do teor de proteínas e carboidratos em *Anabaena doliolum* exposta ao cobre em concentração de $7,6 \times 10^{-6}$ molL⁻¹. Investigando 4 cianobactérias em exposição ao NaCl em concentração de até 23 g L⁻¹, SINGH et al. (2014) também obtiveram redução na produção de proteínas. Sabe-se que o estresse salino resulta em maior concentração de ROS (KUMAR; SINGH; PRASAD, 2015) e ajustes da composição bioquímica como uma forma de proteção podem ser obtidos (DIAZ-MACADOO; MATA; RIQUELME, 2022). Diferentemente das proteínas, os carboidratos podem estar diretamente relacionados com alterações fotossintéticas, como reportado na literatura (PARK; DINH, 2019; YE; GAO, 2004). Isso teria impacto significativo na produção dessa biomolécula (carboidratos). Em adição, o estresse salino pode aumentar as taxas de respiração (ERDMANN; FULDA; HAGEMANN, 1992; SCHUBERT; HAGEMANN, 1990) reduzindo pela via catabólica a quantidade de carboidratos. Sugerimos, que durante o processo de adaptação frente ao estresse salino e por cobre *Nostoc* sp. investiu em biomoléculas específicas, no caso clorofila *a*, carotenoides e ficobiliproteínas. Diferentemente de nossos resultados, em exposição ao aumento de salinidade *Synechococcus* sp. apresentou aumento na produção de lipídios já a partir de 3 g L⁻¹ de NaCl. Entretanto, no geral, a redução de lipídios é um resultado esperado, pois sabe-se que o aumento de metal ou sal no meio de cultura pode resultar em aumento de ROS e promover a peroxidação lipídica em cianobactérias (KARIMI et al., 2017; SHAMIM et al., 2022).

Os efeitos de cores de luz na composição de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídios) em cianobactérias é ainda objeto de intensa pesquisa e não se tem total entendimento dos processos. Grande variação de respostas é observada (RAI et al., 1991; KARIMI et al., 2017; SHAMIM et al., 2022) o que pode ser devido ao fator espécie-específico, mas também às variações nas condições de cultivo, como intensidade e fonte de luz, condições nutritivas, dentre outras. Por exemplo, ora a literatura reporta nenhuma

ação da cor de luz em carboidratos (PRATES et al., 2018), ora o inverso (MARKOU, 2014; PAGELS et al., 2020b).

Em relação à produção de polihidroxialcanoatos (PHA) a variação que obtivemos para *Nostoc* sp., de 0,84% até 4,3%, sem efeitos em relação à exposição ao NaCl ou ao cobre, concorda com os poucos resultados no assunto que encontramos na literatura. Em um estudo de prospecção, em *Nostoc commune* não foi identificada produção de PHA, mas *Nostoc linckia* mostrou produção de 3% PHA ao final (BHATI et al., 2010). Não encontramos trabalhos de manipulação do teor de PHA em cianobactérias para metal, mas é sabido que estresse por NaCl tende a impactar os teores de PHA. A cianobactéria *Nostoc muscorum* apresentou redução na porcentagem de PHA em concentrações de NaCl acima de 1,5 g L⁻¹ (ANSARI; FATMA, 2016).

Sabe-se que cianobactérias são produtoras de PHA, que graças às propriedades termoplásticas similares ao polipropileno (LÖWE et al., 2017) podem ser utilizados para a produção de bioplásticos. Entretanto, a maior produção de PHA é registrada em bactérias heterotróficas (SUDESH; TAGUCHI; DOI, 2002). PHAs são poliésteres de reserva e acumulados em situações adversas (HONG et al., 2021; SHRIVASTAV; MISHRA; MISHRA, 2010), por isso a manipulação pode ser uma maneira de aumentar sua produção. A via metabólica desse biopolímero parece ser regulada pela irradiância do cultivo, como demonstrado para *Nostoc muscorum* de acordo com os resultados apresentados em ANSARI; FATMA (2016). Esses autores observaram que o regime de claro:escuro interfere na produção de PHA. Neste estudo, observamos que o comprimento de onda verde estimulou a produção de PHA, com quase o dobro em BG11-NaCl comparando-se ao controle. Com resultado promissor, este é o primeiro estudo de que temos conhecimento que mostra efeitos de manipulação por diferentes qualidades de luz na produção de PHA em cianobactéria. Nossa proposta de manipulação de PHA por diferentes qualidades de luz é ainda recente e carece de trabalhos na literatura para comparação. Grande parte dos trabalhos de manipulação bioquímica visando ganho no teor de PHA se utiliza de depleção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo (ANSARI; FATMA, 2016). Em depleção de nitrogênio em combinação com cloreto de sódio a cianobactéria *Spirulina subsalsa* apresentou aumento de ~1,3x (menor que o nosso) no teor de PHA (SHRIVASTAV; MISHRA; MISHRA, 2010). Sugerimos, que assim como ocorre em depleção de nitrogênio, a luz verde resultou em problemas nos processos de

divisão celular (menor crescimento) e consequente direcionamento de energia para a síntese de reserva energética (PHA).

Em situações de estresse oxidativo as cianobactérias podem expressar moléculas com capacidade antioxidante (REZAYIAN; NIKNAM; FARAMARZI, 2019). O destaque que obtivemos quanto à capacidade antioxidante para luz vermelha e verde em BG11-N (96h de cultivo) encontra-se em acordo com dados da literatura. Para a cianobactéria *Cyanobium* houve um aumento de 1,7x na capacidade antioxidante Trolox equivalente também em exposição à luz vermelha em extratos de acetona e aquoso (PAGELS et al., 2020a). Em geral, a literatura mostra que atividade antioxidante pode ser aumentada mediante indução de estresse, uma vez que ela se caracteriza como resposta à situação adversa (SINGH et al., 2014; BLAGOJEVIĆ et al., 2018; CHAKRABORTY; MISHRA, 2020; DIAZ-MACADOO; MATA; RIQUELME, 2022). SINGH et al. (2014) mostraram aumento de atividade antioxidante para 4 espécies de cianobactérias mantidas em concentrações NaCl 1,6x maiores do que a utilizada nesta pesquisa, mas às custas de drástica redução na taxa de crescimento, inviabilizando industrialmente o processo. Destacamos que variação na atividade antioxidante DPPH frente às variações ambientais são específicas de cada espécie, como mostrado em BLAGOJEVIĆ et al. (2018), no qual de 10 cepas investigadas (depleção de nitrogênio), apenas uma (*Nostoc* 2S9B) mostrou aumento de atividade DPPH.

Os compostos fenólicos são antioxidantes não-enzimáticos (KARIMI et al., 2017; SHAMIM et al., 2022) e sua produção é espécie-específica (BLAGOJEVIĆ et al., 2018). A manutenção de compostos fenólicos em 48h na presença do NaCl está de acordo com KARIMI et al. (2017). Esses autores mostraram que *Anabaena* sp. exposta ao cloreto de sódio não resultou em aumento de compostos fenólicos e mais, levou à redução da taxa de crescimento e proteínas. Segundo os autores em algumas cianobactérias a excreção de íons orgânicos do citosol seria a maneira de equilibrar o potencial osmótico promovido pelo aumento de NaCl e não o aumento de compostos antioxidantes. Não encontramos estudos sobre compostos fenólicos na presença de excesso de cobre, mas nossos resultados concordam com os de SHAMIM et al. (2022) quanto à presença de alumínio. Os autores mostraram que baixas concentrações do metal foram incapazes de qualquer estímulo na síntese/acúmulo de compostos fenólicos em *Nostoc muscorum*, *Scytonema* sp., *Cylindrospermum* sp. e *Anabaena* sp. Entretanto, CHAKRABORTY; MISHRA (2020) mostraram que concentrações elevadas de zinco aumentaram em 25% o teor de fenóis totais em *Anabaena doliolum* e 12,6% em *Anabaena oryzae*.

Sugerimos que a constância da atividade DPPH e dos compostos fenólicos frente ao aumento de cobre e sal, nas 48 h iniciais, se deve ao fato de termos selecionado concentrações relativamente baixas tanto do NaCl como do cobre para reduzir o impacto sobre a taxa de crescimento e assim gerar biomassa rica nesses produtos. Reside aqui a importância de uma segunda alteração das condições de cultivo, como a exposição a diferentes cores de luz.

Neste estudo, o aumento de atividade antioxidante e compostos fenólicos mediante exposição às diferentes cores de luz em BG11-N, sugere efeito decisivo do estímulo físico (e não químico). O aumento de compostos fenólicos (este estudo, luz azul) é de interesse farmacológico, pois essas moléculas apresentam função antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (KEPEKÇI; SAYGIDEGER, 2012) e, nas células combatem o estresse oxidativo. A luz tem um efeito particularmente forte no metabolismo fenólico (GRACE; LOGAN, 2000; MOLE; ROSS; WATERMAN, 1988). Em *S. platensis* maior atividade antioxidante e compostos fenólicos foram detectados em culturas cultivadas em $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e menor em $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (KEPEKÇI; SAYGIDEGER, 2012). Segundo os autores, o aumento de fenóis e atividade antioxidante ocorreu em decorrência do aumento de ROS observado em altas intensidades luminosas. É proposto que a síntese de compostos fenólicos pode aliviar o desbalanço energético em situação de desequilíbrio fotossintético, como problemas no transporte de elétrons (GRACE; LOGAN, 2000). Segundo esses autores os produtos fenólicos atuam como doadores de hidrogênio, combatendo o estresse oxidativo e dissipando energia fotoquímica. Sabe-se que no comprimento de onda azul pode ter ocorrido um desequilíbrio na excitação de PSII e PSI (LUIMSTRA et al., 2018), pois apesar de mantermos a intensidade similar ao Ik, os fótons de cor azul carregam mais energia do que os das outras cores. Trata-se de um comprimento de onda mais curto e, portanto, mais energético.

A composição elementar que obtivemos para *Nostoc* sp., está dentro do esperado para cianobactérias (XIA et al., 2016); SATPATI; PAL 2021), uma vez que de acordo com ARIF et al. (2021) ela pode ser variável. Destaca-se o elevado percentual de enxofre em *Nostoc* sp., cerca de 40x superior ao relatado em SATPATI; PAL (2021), que obteve 0,4% S analisando a composição elementar de *Leptolyngbya* sp. XIA et al. (2016) obteve valores ligeiramente maiores para *Arthrospira platensis* (%C 53,5; %H 7,3; %N 12,1), mas não reportou sobre enxofre. Sabe-se que o enxofre tem importância para a produção de compostos

orgânicos como proteínas, coenzima A e as vitaminas tiamina e biotina (RENDÓN-CASTRILLÓN et al., 2021). Em relação à %N, *Nostoc* sp. (10%, neste estudo) aproxima-se de *Arthrospira platensis*, com %N 12,1, sendo comercializada para finalidade alimentar devido, dentre outras coisas, ser rica fonte de proteínas veganas. Além disso, altas concentrações de nitrogênio indicam uma boa candidata para utilização como biofertilizante e suplemento alimentar (MAURYA et al., 2016).

A fixação de CO₂ e de nitrogênio estão interligadas e a manutenção da homeostase C/N é essencial para o bom funcionamento de organismos autotróficos (FORCHHAMMER; SELIM, 2019). A constância da relação C/N para *Nostoc* sp. neste estudo sugere o equilíbrio homeostático mesmo frente ao NaCl, cobre e luzes coloridas. Sabe-se que mudanças na razão C/N indicam situações de estresse, como relatado na literatura para *Chlorella* sp. (RENDÓN-CASTRILLÓN et al., 2021).

Deste estudo de manipulação bioquímica, no qual usamos valores de EC20 NaCl (3,5 g L⁻¹) e EC20 cobre (7,6x10⁻⁸ mol L⁻¹), além de exposição às luzes de cor azul, vermelha e verde, mostramos grande plasticidade fisiológica da cianobactéria *Nostoc* sp. Obtivemos que *Nostoc* sp. possui como principal mecanismo de defesa ao NaCl e ao cobre, a produção de pigmentos com capacidade antioxidante. Destacamos que em concentrações de cobre tão baixas quanto 7,6x10⁻⁸ mol L⁻¹ já foi possível o ganho no rendimento de clorofila *a* e carotenoides e, em 3,5 g L⁻¹ de NaCl o ganho no teor de ficobiliproteínas. Entretanto, a presença do cloreto de sódio levou à redução de carboidratos totais, proteínas totais e lipídios totais em *Nostoc* sp. Na presença dos agentes químicos no meio de cultivo, cobre e NaCl, as diferentes cores de luz não exerceram efeito no acúmulo dessas biomoléculas. Entretanto, as diferentes cores de luz foram importantes no tratamento controle, resultando em aumento na atividade antioxidante e produção de compostos fenólicos. Luz vermelha e verde promoveram maior atividade antioxidante DPPH e luz azul maior produção de compostos fenólicos por unidade de biomassa. Assim, esta pesquisa vem agregar informações à Ecofisiologia de cianobactérias, contribuindo também com a biotecnologia.

4.4.3 Efeito da manipulação bioquímica na fotossíntese em *Nostoc* sp. com enfoque em curvas rápidas de luz

Sabe-se que fatores ambientais como temperatura, irradiância, qualidade de luz, salinidade e metais podem afetar a fotossíntese em cianobactérias e outros organismos do fitoplâncton (KIM et al., 2014; SUDHIR et al., 2005). O uso da fluorescência da clorofila *a* para inferir sobre as respostas dos organismos fotossintéticos frente a estresse ambiental é uma ferramenta de ampla utilização (VONSHAK; TORZILLO; TOMASELI, 1994) e é não invasiva, refletindo a distribuição da energia luminosa entre processos fotoquímicos e não fotoquímicos (CASTRO-VARELA et al., 2021).

Os valores de Φ_M obtidos neste estudo estão dentro dos encontrados para *Spirulina* (0,35 – 0,55) como reportado em VONSHAK, TORZILLO e TOMASELI (1994). Esses valores são menores do que os relatados para microalgas verdes saudáveis (MASOJÍDEK; VONSHAK; TORZILLO, 2010). Isso é consequência do acoplamento entre a cadeia de transporte de elétrons fotossintética e respiratória, que resulta em oxidação parcial (não totalmente oxidados) dos centros de reação no escuro (ACUÑA et al., 2015; DOMINY; WILLIAMS, 1987), além da influência das ficobiliproteínas nas fluorescências fotossintéticas de cianobactérias (ACUÑA et al., 2015; CAMPBELL et al., 1998; LU; VONSHAK, 2002).

A similaridade dos valores entre tratamentos e controle obtidos neste estudo nas 48h iniciais sugere que os rendimentos quânticos não são os primeiros parâmetros a serem afetados, mas sim a composição bioquímica e a taxa de crescimento. De fato, resultado similar foi mostrado para outros grupos de microalgas (LOMBARDI; MALDONADO, 2011; BARACHO; SILVA; LOMBARDI, 2019). A redução de rendimentos quânticos, principalmente os rendimentos máximos, exige estresse ambiental mais intenso para serem detectados (PARK; DINH, 2019) do que os que foram usados neste estudo, ainda que no caso do cobre, a taxa de crescimento tenha sofrido uma redução de 29% e no caso do NaCl de 48%. A manutenção do rendimento quântico máximo é resultado de ajustes de algumas vias metabólicas e, em estresse salino sabe-se que pode ocorrer um aumento da atividade do PSI e do número de centros de reação com P700 devido à necessidade da manutenção do pool de ATP via fosforilação cíclica para extrusão de Na^+ do citoplasma (SUDHIR et al., 2005). Além disso, em nosso estudo, em BG11-NaCl houve um estímulo na produção de ficobiliproteínas nas 48 h iniciais de cultivo. Desse modo, podemos sugerir que a manutenção de Φ_M em exposição ao NaCl pode ter sido resultado desse ajuste fisiológico, já que esses pigmentos participam da coleta de luz e transferência de energia absorvida, sendo essencial para o transporte de elétrons (SUDHIR et al., 2005).

Considerando as diferentes cores de luz, diferentes respostas de Φ_M e Φ'_M foram obtidas. Os maiores valores que detectamos de Φ_M deram-se em exposição à luz azul e vermelha, o que pode indicar maior eficiência de utilização de luz e maior capacidade de adaptação às condições de pouca luz (PARK; DINH, 2019). Portanto, esse maior valor em luz azul pode estar relacionado com uma compensação do desbalanço energético causado entre o PSII e PSI nesse comprimento de onda (LUIMSTRA et al., 2018). Em similaridade com este estudo, *Arthrospira platensis* apresentou maior rendimento quântico máximo em exposição à luz azul (ZITTELLI et al., 2022). *Arthrospira máxima* cultivada em $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em luz azul, verde, vermelha e branca também apresentou maiores valores de Φ_M e Φ'_M em exposição a luz azul (PARK; DINH, 2019). Por ser considerado um mecanismo compensatório do desbalanço energético entre o PSII e PSI, o aumento de rendimento quântico máximo e efetivo em luz azul não se refletiu em maior produção de biomassa, como seria esperado. A ausência de correlação entre ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina nas condições estudadas e nem da razão ficobiliproteínas/clorofila *a* com as fluorescências F_0 e F_M sugere que os menores valores de rendimentos quânticos possam ter sido influenciados pelo compartilhamento do *pool* da plastoquinona e do complexo do citocromo *b6/f* como proposto em VERMAAS (2015).

As respostas fisiológicas não dependem apenas da irradiância incidente, mas sim da capacidade de absorção e utilização dessa energia (CELIS-PLÁ et al., 2021). Apesar de maiores rendimentos quânticos fotossintéticos terem sido encontrados em luz azul, observamos que não houve um maior direcionamento para a etapa fotoquímica nesses tratamentos. Sob luz azul e vermelha houve uma redução de 1,3x e 2x, respectivamente, em qP em relação ao controle. Sabe-se que qP está relacionada com o estado redox do Q_A e sua diminuição é um sinal de mal funcionamento do PSII. Segundo LUIMSTRA et al. (2018), cianobactérias em exposição a luz azul absorvem energia em proporção semelhante aos comprimentos de onda longos, entretanto usa essa energia absorvida de forma menos eficiente para a fotossíntese e crescimento.

Segundo ZITTELLI et al. (2022), a luz azul cria um desequilíbrio entre os fotossistemas e, como o PSI contém mais clorofila *a* do que PSII, a maior absorção de fótons azul ocorre no PSI, resultando em uma deficiência no PSII (LUIMSTRA et al., 2018; ZITTELLI et al., 2022). Esse desbalanço acaba por suprimir o transporte linear de elétrons do PSII ao PSI (LUIMSTRA et al., 2018).

As curvas rápidas de luz permitem avaliar ajustes no funcionamento do aparato fotossintético com o aumento da intensidade luminosa. São bastante sensíveis às variações ambientais e envolvem mecanismos de fotoproteção e fotoinibição (SCHREIBER et al., 1997). A falta de influência do cobre e do NaCl nas RLC em 48h sugere que as concentrações usadas não ocasionaram danos no aparato fotossintético, como corroborado por Φ_M , Φ'_M , qP e RLC. Porém, quando os cultivos foram expostos às luzes coloridas, foram obtidas diferentes respostas indicando ajustes do aparato fotossintético, exceto na presença do cobre. No cultivo BG11-Cu parece ter havido uma redução da capacidade de resposta de *Nostoc* sp. em relação à taxa de transporte de elétrons para as cores verde e vermelha. Nessas condições *Nostoc* sp. não foi capaz de realizar ajustes no aparato fotossintético para lidar com o efeito dessas luzes.

A maior taxa de transporte de elétrons relativa máxima ($rETR_{max}$) obtida nos cultivos de *Nostoc* sp expostos à cor azul está de acordo com o que se tem na literatura. Nossos resultados são corroborados pelos observados para *Arthrospira maxima* em PARK e DINH (2019). Esses autores mostraram valores significativamente maiores da $rETR_{max}$ sob luz azul em comparação à luz vermelha e branca, enquanto a luz verde produziu $rETR_{max}$ intermediária. Destacamos que no estudo de PARK e DINH (2019), o aumento da $rETR_{max}$ pode ter sido um reflexo do aumento do tamanho da antena do PSII já que os autores observaram um aumento da produção de ficobiliproteínas em exposição a LED azul. Entretanto, em nosso estudo não observamos esse aumento e, portanto, não foi necessário *Nostoc* sp. aumentar a produção de ficobiliproteínas para resultar em maior $rETR_{max}$. Nosso FBR é iluminado internamente e a irradiância de cultivo (I_k), ajustada diariamente, não sofreu alteração com o aumento da densidade populacional como em cultivos tradicionais. Assim, as ficobiliproteínas presentes em *Nostoc* sp. já estavam expostas a intensidade luminosa que fornecesse energia suficiente para aumentar a taxa de transporte de elétrons. Aqui novamente, o aumento desses parâmetros fotossintéticos não se refletiu em maior crescimento e acúmulo de biomassa, indicando que o metabolismo fotossintético poderia estar comprometido nesse comprimento de onda. Além disso, destacamos que a fotossíntese é apenas um dos processos que afetam as taxas de crescimento, podendo outros processos serem limitantes (PARK; DINH, 2019). Sob luz azul *Nostoc* sp. parece priorizar moléculas relacionadas com atividade antioxidante ao invés de moléculas relacionadas com a divisão celular.

A maior eficiência de absorção de luz, representada pelo α , em exposição à luz azul, seguida da luz verde, reflete aclimação do aparato fotossintético (MASOJÍDEK; VONSHAK; TORZILLO, 2010). KIM et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes qualidades de luz na expressão de genes relacionados à fotossíntese, como os que codificam proteínas envolvidas na síntese de ficobiliproteínas e componentes do PSII e PSI. Eles demonstraram que comprimentos de onda curtos (azul e verde) estimulam a produção de genes da biossíntese de ficobiliproteínas e PSII em *Synechococcus* sp. Essa maior expressão pode ter influenciado em maiores $rETR_{max}$ e α .

Os valores de I_k estão relacionados com a dissipação de energia, onde qP domina abaixo e no entorno de I_k (HENLEY, 1993). A redução do valor de I_k obtida na presença do NaCl indica que as células de *Nostoc* se tornaram mais sensíveis ao aumento da intensidade luminosa, o que pode justificar o menor crescimento populacional observado nessa condição. A maior redução no crescimento populacional foi justamente em exposição ao NaCl. Células expostas ao NaCl apresentaram I_k de $160 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor abaixo daquele usado no cultivo, podendo ter resultado em fotoinibição.

Com comportamento similar ao I_k , E_{opt} sem variação mesmo em exposição às diferentes cores de luz sugere que não houve indução de fotossensibilidade. Na literatura não encontramos trabalhos que avaliem o efeito de diferentes qualidades de luz nos valores de I_k e E_{opt} em cianobactérias. Porém, sabe-se que frente às modificações ambientais ocorrem adaptações nesses parâmetros. Em um estudo com microalgas verdes e cianobactérias foram observadas mudanças em E_{opt} em resposta a variação de temperatura (TALBOT et al., 1991). Temperatura também resultou em ajustes de E_{opt} em *Cosmarium subprotumidum*, *Selenastrum minutum* e *Coelastrum microporum* f. *astroidea* (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2002). Pontuamos que segundo RITCHIE (2008), algumas cianobactérias são capazes de minimizar a fotoinibição em altas intensidades luminosas, o que pode justificar a manutenção de I_k e E_{opt} mesmo com alterações em $rETR_{max}$ e α .

Deste estudo podemos concluir que os parâmetros fotossintéticos foram seletivamente afetados pela manipulação bioquímica. O rendimento quântico máximo e efetivo, eficiência de captura de luz e $rETR_{max}$ mantiveram-se constantes entre os diferentes tratamentos em 48 h de cultivo. Em relação aos parâmetros da RLC, somente I_k e E_{opt} foram menores com a adição de NaCl. Frente a diferentes qualidades de luz a

resposta fotossintética apresentou ajustes. Luz azul e verde resultaram em maiores rendimentos quânticos máximo e efetivo e maior eficiência de captura de luz e rETRmax.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção realizada neste trabalho evidenciou as diferenças fisiológicas, na composição bioquímica e fotossintética, entre diferentes espécies de cianobactérias. Nossos resultados confirmam que as respostas são em sua maioria espécie-específicas mesmo em condições de cultivo similares. Além disso, demonstramos a importância de se definir a finalidade da biomassa desejada para selecionar o organismo ideal para o cultivo.

Espécies como *Geitlerinema unigranulatum* apresentaram altos teores de proteínas, *Microcystis navacekii* de carboidratos e *Phormidium* sp. de lipídios. Outras cepas se destacaram na produção de PHA, como *Nostoc* sp., ou atividade antioxidante, *Aphanocapsa holsatica*.

Além disso, demonstramos que é possível manipular a composição bioquímica de cianobactérias a partir de alterações químicas e físicas do meio de cultura. *Nostoc* sp. apresentou, por exemplo, aumento na produção de ficobiliproteínas em adição de NaCl e aumento de clorofila *a* e carotenoides em exposição ao excesso de cobre. Para estresse químico pontuamos que para maior rendimento de biomoléculas talvez sejam necessárias concentrações mais altas de cloreto de sódio e cobre, pois as cianobactérias parecem ter mecanismos robustos de resiliência à variação nas condições ambientais.

O efeito da cor de luz para *Nostoc* sp. foi mais evidenciado nos parâmetros fotossintéticos, na produção de compostos fenólicos e atividade antioxidante DPPH, e não em pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídios.

Estes resultados ressaltam o valor da prospecção para o entendimento fisiológico e fotossintético de cianobactérias, tanto para a ecologia quanto para a biotecnologia. Contribuímos aqui para aumentar a diversidade de espécies que possam ser utilizadas em cultivos voltados para escala industrial e em sincronia com o combate às mudanças climáticas por meio da assimilação do carbono atmosférico.

6 REFERÊNCIAS

ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–12, 2009.

ACUÑA, A. M. et al. Resolving the contribution of the uncoupled phycobilisomes to cyanobacterial pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometry signals. **Photosynthesis Research**, v. 127, n. 1, p. 91–102, 2015.

AHAD, R. I. A.; SYIEM, M. B. Copper-induced morphological, physiological and biochemical responses in the cyanobacterium *Nostoc muscorum* Meg 1. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 17, n. 4, p. 1077–1086, 2018.

AIGNER, S. et al. Epilithic Chamaesiphon (Synechococcales , Cyanobacteria) species in mountain streams of the Alps — interspecific differences in photo-physiological traits. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1125–1134, 2017.

ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.

ANSARI, S.; FATMA, T. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–20, 2016.

AYDAŞ, S. B.; OZTURK, S.; ASLIM, B. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 164–169, 2013.

BABIĆ, O. et al. Evaluation of antioxidant activity and phenolic profile of filamentous terrestrial cyanobacterial strains isolated from forest ecosystem. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 4, p. 2333–2342, 2016.

BAILEY, S.; GROSSMAN, A. Photoprotection in cyanobacteria: Regulation of light harvesting. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 6, p. 1410–1420, 2008.

BANO, S. et al. Removal efficiency of marine filamentous Cyanobacteria for Pyrethroids and their effects on the biochemical parameters and growth. **Algal Research**, v. 60, n. October, p. 102546, 2021.

BHATI, R. et al. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 11, p. 1181–1185, 2010.

- BHATTACHARYA, S.; SHIVAPRAKASH, M. K. Evaluation of three *Spirulina* species grown under similar conditions for their growth and biochemicals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 336, n. November 2004, p. 333–336, 2005.
- BILLER, P.; ROSS, A. B. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 215–225, 2011.
- BLAGOJEVIĆ, D. et al. Antioxidant activity and phenolic profile in filamentous cyanobacteria: the impact of nitrogen. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2337–2346, 2018.
- BLUMWALD, E.; TEL-OR, E. Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*. **Archives of Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 168–172, 1982.
- BOROWITZKA, M. A. Patents on cyanobacteria and cyanobacterial products and uses. **Cyanobacteria: An Economic Perspective**, p. 329–338, 2013.
- BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. **Hydrobiologia**, v. 489, n. 1, p. 207–217, 2002.
- BRYANT, D. A. The Photoregulated Expression of Multiple Phycocyanin Species: A General Mechanism for the Control of Phycocyanin Synthesis is Chromatically Adapting Cyanobacteria. **European Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 425–429, 1981.
- BRYANT, D. A.; COHEN-BAZIRE, G. Effects of Chromatic Illumination on Cyanobacterial Phycobilisomes: Evidence for the Specific Induction of a Second Pair of Phycocyanin Subunits in *Pseudanabaena* 7409 Grown in Red Light. **European Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 415–424, 1981.
- CAMPBELL, D. et al. Two forms of the Photosystem II D1 protein alter energy dissipation and state transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. p. 131–144, 1996.
- CAMPBELL, D. et al. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. **Microbiol. Mol. Bio. Rev**, v. 62, n. 3, p. 667–683, 1998.
- CAMPBELL, D.; ÖQUIST, G. Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence, which reflects state transitions in these organisms. **Plant Physiol**, v. 111, p. 1293–1298, 1996.
- CASTRO-VARELA, P. A. et al. Photobiological Effects on Biochemical Composition in

Porphyridium cruentum (Rhodophyta) with a Biotechnological Application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 97, n. 5, p. 1032–1042, 2021.

CELIS-PLÁ, P. S. M. et al. Short-term ecophysiological and biochemical responses of *Cystoseira tamariscifolia* and *Ellisolandia elongata* to environmental changes. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 227–243, 2014.

CELIS-PLÁ, P. S. M. et al. A new approach for cultivating the cyanobacterium *Nostoc calcicola* (MACC-612) to produce biomass and bioactive compounds using a thin-layer raceway pond. **Algal Research**, p. 102421, 2021.

CHAKRABORTY, S. et al. Differential physiological, oxidative and antioxidative responses of cyanobacterium *Anabaena sphaerica* to attenuate malathion pesticide toxicity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 56–63, 2017.

CHAKRABORTY, S.; MISHRA, A. K. Mitigation of zinc toxicity through differential strategies in two species of the cyanobacterium *Anabaena* isolated from zinc polluted paddy field. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114375, 2020.

CHIA, M. A. et al. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 87–95, 2015.

CORDEIRO, R. S. et al. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, p. 1–11, 2017.

CORRÊA, P. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L. Polyhydroxyalkanoates and pigments coproduction by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivated in crude glycerol. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, p. 1487–1500, 2021.

COSTA, S. S. et al. Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. **Algal Research**, v. 33, n. December 2017, p. 231–238, 2018a.

COSTA, S. S. et al. Influence of nitrogen on growth , biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552–562, 2018b.

COULOMBIER, N. et al. Impact of light intensity on antioxidant activity of tropical microalgae. **Marine Drugs**, v. 18, n. 2, 2020.

- DEBELIUS, B. et al. Toxicity of copper in natural marine picoplankton populations. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 8, p. 1095–1103, 2009.
- DEVI, M. A. et al. Studies on the Proteins of Mass-Cultivated, Blue-Green Alga (*Spirulina platensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 522–525, 1981.
- DEVI, N. D. et al. Co-cultivation of microalgae-cyanobacterium under various nitrogen and phosphorus regimes to concurrently improve biomass, lipid accumulation and easy harvesting. **Biochemical Engineering Journal**, v. 188, n. July, p. 108706, 2022.
- DIAKOFF, S.; SCHEIBE, J. Action Spectra for Chromatic Adaptation in *Tolypothrix tenuis*. **Plant Physiology**, v. 51, n. 2, p. 382–385, 1973.
- DIAZ-MACADOO, D.; MATA, M. T.; RIQUELME, C. Activity and Carotenoids Accumulation in *Muriellopsis* sp. Isolated from the Antofagasta Coastal Desert. 2022.
- DOMINY, P. J.; WILLIAMS, W. P. The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 892, n. 3, p. 264–274, 1987.
- DOWNING, T. G. et al. Medium N:P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M. aeruginosa* UV027. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 3, p. 468–473, 2005.
- EILERS, P. H. C.; PEETERS, J. C. H. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. **Ecological Modelling**, v. 42, n. 3–4, p. 199–215, 1988.
- EL-ATY, A. M. A.; MOHAMED, A. A.; SAMHAN, F. A. In vitro antioxidant and antibacterial activities of two fresh water Cyanobacterial species, *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena sphaerica*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 7, p. 69–75, 2014.
- ELSHOBARY, M. E. et al. Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*. **Food Bioscience**, v. 35, n. 301, p. 100567, 2020.
- ERDMANN, N.; FULDA, S.; HAGEMANN, M. Glucosylglycerol accumulation during salt acclimation of two unicellular cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 2, p. 363–368, 1992.
- FARROKH, P. et al. Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 5, 2019.
- FONTES, A. G. et al. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green

alga in outdoor culture. **Biomass**, v. 13, n. 1, p. 33–43, 1987.

FORCHHAMMER, K.; SELIM, K. A. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 33–53, 2019.

FRANSCSCHINI, I. M. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. [s.l.: s.n.].

FU, F. et al. Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 496, p. 485–496, 2007.

GALETOVIC, A. et al. Use of phycobiliproteins from atacama cyanobacteria as food colorants in a dairy beverage prototype. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 1–13, 2020.

GAMA, W. A. et al. New insights into *Chroococcus* (Cyanobacteria) and two related genera: *Cryptococcum* gen. nov. and *Inacoccus* gen. nov. **European Journal of Phycology**, v. 54, n. 3, p. 315–325, 2019.

GAN, F.; BRYANT, D. A. Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far-red light. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 3450–3465, 2015.

GARDNER, M.; DIXON, E.; COMBER, S. Copper complexation in English Rivers. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2000.

GARG, R.; MALDENER, I. The Dual Role of the Glycolipid Envelope in Different Cell Types of the Multicellular Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, p. 1–12, 2021.

GONÇALVES, A. L. et al. The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. **Algal Research**, v. 14, p. 127–136, 2016.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. Biotechnological potential of *Synechocystis* salina co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 279–286, 2016.

GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verh. Int. Verein. Limnol.**, v. 15, n. 2, p. 796–804, 1964.

GRACE, S. G.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological**

Sciences, v. 355, n. 1402, p. 1499–1510, 2000.

HALL, D. O. et al. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. **Photosynthesis Research**, v. 46, p. 159–167, 1995.

HONDA, R. Y.; AZEVEDO, M. T. P. Estudos taxonômicos em culturas de Cyanobacteria provenientes de um reservatório oligotrófico no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), Sao Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 31, n. 2, p. 151–169, 2004.

HONG, K. et al. Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene PhaC in cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 57(3_), p. 754–765, 2021.

JOHNSEN, G.; SAKSHAUG, E. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulseamplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 6, p. 1236–1251, 2007.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002.

KAAMOUSH, M. et al. Monitoring effect of nickel, copper, and zinc on growth and photosynthetic pigments of *Spirulina platensis* with suitability investigation in Idku Lake. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022.

KARIMI, R. et al. Toxicity assessment of *Anabaena* sp. Following exposure to copper oxide nanoparticles and sodium chloride. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 15, n. 4, p. 2045–2059, 2017.

KEPEKÇI, R. A.; SAYGIDEGER, S. D. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 897–905, 2012.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

KHAZI, M. I.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 1513–1523, 2018.

- KIM, N. N. et al. Profiles of photosynthetic pigment accumulation and expression of photosynthesis-related genes in the marine cyanobacteria *Synechococcus* sp.: Effects of LED wavelengths. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 2, p. 250–256, 2014.
- KOCH, M. et al. Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator PirC. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2020.
- KOCH, M.; FORCHHAMMER, K. Cyanobacterial Biopolymes. In: **Cyanobacteria Biotechnology**. [s.l: s.n.]. p. 301–330.
- KOKSHAROVA, O. A.; BABYKIN, M. M. Cyanobacterial cell division: Genetics and comparative genomics of cyanobacterial cell division. **Russian Journal of Genetics**, v. 47, n. 3, p. 255–261, 2011.
- KOMÁREK, J. Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In: **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. [s.l: s.n.]. p. 59–116.
- KUMAR, J.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. NaCl-induced physiological and biochemical changes in two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* acclimatized to different photosynthetically active radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 221–232, 2015.
- LI, M. et al. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 565–572, 2006.
- LI, X. et al. Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 555–561, 2018.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011.
- LÖWE, H. et al. Biotechnology for Biofuels Photoautotrophic production of polyhydroxyalkanoates in a synthetic mixed culture of *Synechococcus elongatus* cscB and *Pseudomonas putida* cscAB. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 1–11, 2017.
- LU, C.; VONSHAK, A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. **Physiologia plantarum**, v. 114, p. 405–413, 2002.

LU, C.; ZHANG, J. Role of light in the response of PSII photochemistry to salt stress in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 346, p. 911–917, 2000.

LUIMSTRA, V. M. et al. Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. **Photosynthesis Research**, v. 138, n. 2, p. 177–189, 2018.

MAADANE, A. et al. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

MACINTYRE, H. L. et al. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 38, n. November 2001, p. 17–38, 2002.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-m- ethane production through anaerobic digestion. **FUEL**, n. April, 2013.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389–3401, 2011.

MASOJÍDEK, J.; VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Chlorophyll a Fluorescence Applications in Microalgal Mass Cultures. In: **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications**. [s.l.: s.n.].

MATHARASI, A.; ANAHAS, P.; MURALITHARAN, G. **Isolation and screening of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Formulation of low-cost seawater medium for high cell density and high lipid content of *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 using central composite design in biodiesel perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 575–586, 2018.

MAURYA, R. et al. Hydrolysate of lipid extracted microalgal biomass residue: An algal growth promoter and enhancer. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 197–204, 2016.

MENDEZ, L. et al. *Chlorella vulgaris* vs cyanobacterial biomasses : Comparison in terms of biomass productivity and biogas yield. **Energy Conversion and Management**, v. 92, p. 137–142, 2015.

- MOISANDER, P. H.; MCCLINTON, E.; PAERL, H. W. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. **Microbial Ecology**, v. 43, n. 4, p. 432–442, 2002.
- MOLE, S.; ROSS, J. A. M.; WATERMAN, P. G. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants - I. Chemical changes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 1988.
- MORONE, J. et al. Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. **Algal Research**, v. 41, n. April, p. 101541, 2019.
- MORONE, J. et al. Exploitation of filamentous and picoplanktonic cyanobacteria for cosmetic applications: potential to improve skin structure and preserve dermal matrix components. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020.
- NAINANGU, P. et al. In vitro screening of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities, and characterization of bioactive substances from freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* sp. SSCM01 and *Phormidium* sp. SSCM02. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, n. April, p. 101772, 2020.
- OLIVEIRA, D. T. DE et al. Lipid profile analysis of three new Amazonian cyanobacteria as potential sources of biodiesel. **Fuel**, v. 234, n. April, p. 785–788, 2018.
- PAGELS, F. et al. White and red LEDs as two-phase batch for cyanobacterial pigments production. **Bioresource Technology**, v. 307, n. February, p. 123105, 2020a.
- PAGELS, F. et al. Light quality triggers biochemical modulation of *Cyanobium* sp.— photobiology as tool for biotechnological optimization. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 5, p. 2851–2861, 2020b.
- PAGELS, F. et al. Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria—a review on current methodologies. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2021.
- PALIWAL, C. et al. Bioresource Technology Selective carotenoid accumulation by varying nutrient media and salinity in *Synechocystis* sp. CCNM 2501. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 363–368, 2015.
- PANDEY, U.; CHATTERJEE, C. Response of two strains of *Nostoc muscorum* to metal stress and salinity. **Ann. appl. Biol.**, v. 134, n. January, p. 259–263, 1999.
- PANDEY, U.; PANDEY, J. Enhanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of

a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4520–4523, 2008.

PARK, J.; DINH, T. B. Contrasting effects of monochromatic LED lighting on growth, pigments and photosynthesis in the commercially important cyanobacterium *Arthrospira maxima*. **Bioresource Technology**, v. 291, n. July, p. 121846, 2019.

PARMAR, A. et al. Bioresource Technology Cyanobacteria and microalgae : A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10163–10172, 2011.

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 2–6, 2017.

PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. **Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton**Instituto del Mar de Peru Boletin, 1980.

PRATES, D. DA F. et al. Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 38–43, 2018.

RAI, L. C. et al. Physiological and Biochemical Characteristics of a Copper Tolerant and a Wild Type Strain of *Anabaena doliolum* Under Copper Stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 138, n. 1, p. 68–74, 1991.

RAJANIEMI, P. et al. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 11–26, 2005.

RAJESHWARI, K. R.; RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 849–857, 2011.

RATNER, B. The correlation coefficient: Its values range between 1/1, or do they. **Journal of Targeting, Measurement and Analysis for Marketing**, v. 17, n. 2, p. 139–142, 2009.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, p. 111–149, 1999.

REED, R. H.; STEWART, W. D. P. Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. **Marine Biology**, v. 88, n. 1, p. 1–9, 1985.

RENDÓN-CASTRILLÓN, L. et al. Evaluation of the operational conditions in the production and morphology of chlorella sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 1, p. 202–209, 2021.

RENUGADEVI, K. et al. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. March, p. 237–242, 2018.

REZAYIAN, M.; NIKNAM, V.; FARAMARZI, M. A. Antioxidative responses of *Nostoc ellipsosporum* and *Nostoc piscinale* to salt stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 157–169, 2019.

RIPPKA, R. Isolation and purification of Cyanobacteria. **Methods**, v. 167, p. 3–27, 1988.

RITCHIE, R. J. Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. **Photosynthesis Research**, v. 96, p. 201–215, 2008.

ROJA, K. et al. Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101358, 2019.

SAFAFAR, H. et al. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.

SAHU, A. et al. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53–58, 2013.

SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, n. April, p. 616–624, 2018.

SÁNCHEZ-ALEJANDRO, F.; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. Characterization of the growth, biochemical composition, and nutrient utilization of the cyanobacterium *Geitlerinema lemmermannii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1177–1184, 2015.

SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria : Effect of Operating Conditions on Growth and Biomass Composition. **Molecules**, v. 25, p. 1–17, 2020.

SANT'ANNA, C. L. et al. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 213–227, 2004.

SANTOYO, S. et al. Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 1, p. 75–81, 2006.

SATO, N.; WADA, H. Lipid Biosynthesis and its Regulation in Cyanobacteria. In: WADA, H.;

MURATA, N. (Eds.). . **Lipids in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration.** Dordrecht: Springer, 2009. p. 322.

SCHAGERL, M.; MÜLLER, B. Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 7, p. 709–716, 2006.

SCHREIBER, U. et al. Assessment of photosynthetic performance of Prochloron in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 8, p. 945–951, 1997.

SCHUBERT, H.; FULDA, S.; HAGEMANN, M. Effects of Adaptation to Different Salt Concentrations on Photosynthesis and Pigmentation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 291–295, 1993.

SCHUBERT, H.; HAGEMANN, M. Salt effects on 77K fluorescence and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, n. 1–2, p. 169–172, 1990.

SCHUURMANS, R. M. et al. Comparison of the photosynthetic yield of Cyanobacteria and Green Algae : Different Methods Give Different Answers. p. 1–17, 2015.

SEDER-COLOMINA, M. et al. The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined in vivo and at cellular level by confocal laser microscopy. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 1, p. 199–205, 2013.

SENOUSY, H. H.; ABD ELLATIF, S.; ALI, S. Assessment of the antioxidant and anticancer potential of different isolated strains of cyanobacteria and microalgae from soil and agriculture drain water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 15, p. 18463–18474, 2020.

SHAMIM, A. et al. Effect of pH on aluminum uptake and differential aluminum tolerance in cyanobacterial strains: A bioresource for agricultural and environmental sustainability. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, n. March, p. 100999, 2022.

SHANMUGAM, S. et al. Cell density , Lipidomic profile , and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 304, n. December 2019, p. 123061, 2020.

SHARMA, L. et al. Process optimization for poly- β -hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 5, p. 987–993, 2007.

- SHESTAKOV, S. V.; KARBYSHEVA, E. A. The origin and evolution of cyanobacteria. **Biology Bulletin Reviews**, v. 7, n. 4, p. 259–272, 2017.
- SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255–260, 2010.
- SINETOVA, M. A. et al. On the dynamics and constraints of batch culture growth of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 148–155, 2012.
- SINGH, A. K. et al. Evidence for a role for L-proline as a salinity protectant in the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, n. 4, p. 490–494, 1996.
- SINGH, D. P. et al. Induced Accumulation of Polyphenolics and Flavonoids in Cyanobacteria under Salt Stress Protects Organisms through Enhanced Antioxidant Activity. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 05, p. 726–735, 2014.
- SLOCOMBE, S. P. et al. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 51–57, 2013.
- SOBIECHOWSKA-SASIM, M.; STOŃ-EGIERT, J.; KOSAKOWSKA, A. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 2065–2074, 2014.
- SUDES, K.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. Effect of increased PHA synthase activity on polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Synechocystis* sp . PCC6803. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 97–104, 2002.
- SUDHIR, P. R. et al. The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 481–485, 2005.
- SUROSZ, W.; PALINSKA, K. A. Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 40–48, 2004.
- TALBOT, P. et al. A comparative study and mathematical modeling of temperature, light and growth of three microalgae potentially useful for wastewater treatment. **Water Research**, v. 25, n. 4, p. 465–472, 1991.
- TANDEAU DE MARSAC, N. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria.

Journal of Bacteriology, v. 130, n. 1, p. 82–91, 1977.

TANG, D. et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.

TORIBIO, A. J. et al. Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. 1–8, 2020.

TORZILLO, G. et al. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. **Biomass**, v. 11, p. 61–74, 1986.

TSOLCHA, O. N. et al. Utilization of biomass derived from cyanobacteria-based agro-industrial wastewater treatment and raisin residue extract for bioethanol production. **Water (Switzerland)**, v. 13, n. 4, 2021.

UDAYAN, A.; ARUMUGAM, M.; PANDEY, A. Nutraceuticals from Algae and Cyanobacteria. In: **Algal Green Chemistry**. [s.l: s.n.]. p. 65–89.

USLU, L. et al. The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 386–389, 2013.

VARGAS, M. A et al. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 812–817, 1998.

VERMA, E. et al. Salinity-induced oxidative stress-mediated change in fatty acids composition of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 875–886, 2019.

VERMAAS, W. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. [s.l: s.n.]. p. 1–7.

VONSHAK, A.; TORZILLO, G.; TOMASELI, L. Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 31–34, 1994.

WANG, J.; YIN, Y. Fermentative hydrogen production using pretreated microalgal biomass as feedstock. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2018.

WELLBURN, A. R. 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**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

- WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological Analyses**. [s.l: s.n.]. v. 7
- WHITTON, B. A. Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**, v. 9789400738553, p. 1–760, 2012.
- WU, J.; CHANG, S.; CHEN, K. Enhancement of intracellular proline level in cells of *Anacystis nidulans* (Cyanobacteria) exposed to deleterious concentrations of copper. **Journal of Phycology**, v. 379, n. March 1994, p. 376–379, 1995.
- WU, Z. et al. Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales , Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. **Harmful Algae**, v. 15, p. 53–58, 2012.
- XUE, F. et al. A new strategy for lipid production by mix cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 498–503, 2010.
- YADAV, G. et al. Lipid content, biomass density, fatty acid as selection markers for evaluating the suitability of four fast growing cyanobacterial strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 325, n. November 2020, p. 124654, 2021.
- YAN, R. et al. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp . PCC 7942 under mixotrophic conditions : comparison with photoautotrophic condition. **Journal of applied phycologyapplied phycology**, v. 24, p. 657–668, 2012.
- YASHAVANTH, P. R.; DAS, M.; MAITI, S. K. Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105379, 2021.
- YE, C.; GAO, K. Photosynthetic response to salt of aquatic-living colonies of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 6, p. 477–481, 2004.
- YÉPRÉMIAN, C. et al. Phycocyanin Extraction and Determination. **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**, p. 335–338, 2017.
- ZHANG, M. et al. The acclimative changes in photochemistry after colony formation of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Phycology**, v. 532, p. 524–532, 2011.
- ZHOU, T. et al. Characterization of additional zinc ions on the growth , biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 269, n. September, p. 285–291, 2018.

ZITTELLI, C. G. et al. Effects of blue, orange and white lights on growth, chlorophyll fluorescence, and phycocyanin production of *Arthrospira platensis* cultures. **Algal Research**, v. 61, n. September 2021, p. 102583, 2022.