

Luana dos Santos de Souza

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PRODUÇÃO DE
LIPÍDIOS E CAROTENÓIDES EM DIFERENTES CONDIÇÕES
DE CULTIVO DE DUAS MICROALGAS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Dr. Leonardo Rubi Rörig
Coorientador: Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

dos Santos de Souza, Luana
CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PRODUÇÃO DE
LIPÍDIOS E CAROTENÓIDES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO DE DUAS MICROALGAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
/ Luana dos Santos de Souza ; orientadora, Leonardo
Rubi Rorig ; coorientadora, Marcio José Rossi. -
Florianópolis, SC, 2016. 126 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Metabolismo. 3.
Ultraestrutura. 4. Carotenóides. 5. Lipídios. I. Rubi
Rorig, Leonardo . II. José Rossi, Marcio. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**"Caracterização Morfofisiológica, Produção de Lipídios e Carotenoides em
Diferentes Condições de Cultivo de Duas Microalgas com Potencial
Biotecnológico"**

Por

Luana dos Santos de Souza

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (34/PPGBT/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências


Banca examinadora:



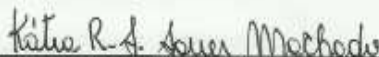
Dr(a) Leonardo Rubi Rorig (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Roberto Bonchini Derner (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ana Claudia Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Kátia Regina Sgrott Sauer Machado (Universidade do Vale do Itajaí)



Dr(a) Marcos Luiz Pessatti (Universidade do Vale do Itajaí)



Dr(a) Melina Guimarães (Universidade Católica de Brasília)

Florianópolis, 08 de Dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por cada realização de sonhos.

Um agradecimento especial ao meu orientador, prof. Dr. Leonardo Rorig pela orientação, amizade, carinho, dedicação e apoio em todas as etapas desse trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dr. Márcio Rossi pela orientação, contribuições e sugestões.

Aos professores Roberto Derner, Zenilda Bouzan, Rosana Schneider, Marcelo Maraschin pelo apoio e contribuições.

As minhas colegas Carmen Simioni e Fernanda Ramlov pela amizade e contribuições em várias etapas desse trabalho.

Aos meus colegas do Lafic e amigos que percorreram comigo essa batalha, em especial Nayara, Pablo, Cecília, Dudu, Elisa, Graziella, Rodrigo, Gabi, João, Camila e Juliane.

Aos funcionários do Lameb e Centro de Microscopia Eletrônica pelo apoio na condução de trabalhos.

A minha família e principalmente ao meu marido Jayme Eduardo por todo o apoio e compreensão proporcionados nas horas mais difíceis.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC, pelos conhecimentos transmitidos e pela cooperação.

Aos coordenadores do curso de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC, pela oportunidade.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma, para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As microalgas têm recebido atenção frequente devido a sua alta taxa de crescimento, alta eficiência fotossintética, capacidade de algumas espécies crescerem em diferentes metabolismos energéticos (mixotrófico e heretotrófico) e apresentarem abundância de lipídios e pigmentos. Os microrganismos extremófilos (ex. acidófilos), ganharam interesse devido à sua capacidade de acumular e produzir compostos de alto valor e crescerem em condições especiais, excludentes para eventuais contaminantes. O objetivo deste trabalho é caracterizar a morfologia e a ultraestrutura de *Chlamydomonas acidophila*, uma cepa isolada da drenagem ácida de minas (DAM) na região de Criciúma/SC e *Parachlorella kessleri*, isolada de uma estação experimental de tratamento de esgoto localizada na UFSC, nos sistemas fototrófico, mixotrófico e heterotrófico e avaliar o crescimento, produção de lipídios e carotenóides em diferentes condições de cultivo. Esse trabalho está dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo foi realizada uma revisão bibliográfica. No segundo capítulo foi avaliada a influência de quatro meios de cultivo (MAM, BBM, BG-11 e NPK) no crescimento, morfologia e na produção de lipídios e carotenóides das duas cepas. No terceiro e quarto capítulo foram avaliados o crescimento, a morfofisiologia, a ultraestrutura e a produção de lipídios e carotenóides em condições fototrófica, mixotrófica e heterotrófica das duas cepas. Foram utilizadas técnicas de Microscopia de Luz, Confocal, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Citometria de Fluxo e Cromatografia (HPLC e CG). O crescimento foi avaliado por contagem celular (câmara de Neubauer) e biomassa seca (método gravimétrico). A partir dos resultados foi possível concluir que: (a) *C. acidophila* possui um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biocombustíveis; (b) *C. acidophila* apresentou maior biomassa seca e produção de lipídios no meio MAM; (c) *C. acidophila* apresentou maior crescimento e produção de lipídios em sistema fototrófico; (d) A glicose e o acetato a 1% não resultaram em qualquer aumento significativo no crescimento e na produção de lipídios de *C. acidophila*, sendo o acetato tóxico para a cepa nas condições testadas (meio ácido); (e) *P. kessleri* apresentou maior biomassa seca, produção de lipídios e carotenóides no meio BBM; (f) *P. kessleri* apresentou crescimento em todos os sistemas de cultivo (fototrófico, mixotrófico e heterotrófico) com maior biomassa seca no sistema mixotrófico com glicose; (g) a maior produção de lipídios foi na condição mixotrófica com acetato (h). A luteína foi o carotenóide mais abundante

detectado em todos os tratamentos, com maior produção no sistema mixotrófico com glicose.

Palavras chaves: Heterotrófico. Mixotrófico. Ultraestrutura. Lipídios. Carotenóides.

ABSTRACT

Frequently, microalgae has received attention because of their high growth rate and photosynthetic efficiency, some species ability to grow in different energy metabolisms (mixotrophic and heretotrophic), and abundant lipids and pigments. Extremophiles microorganisms (eg. *Acidophilus*) gained interest due to their capacity to accumulate and produce high value compounds besides grow under special conditions, excluding contaminants. The main objective of this work was to characterize morphology and ultrastructure of *Chlamydomonas acidophila*, an isolated strain of acid mine drainage (AMD). This specie was isolated from the region of Criciúma / SC, and *Parachorella kessleri* from an experimental sewage treatment station located at UFSC. We have evaluated different culture conditions in phototrophic, mixotrophic and heterotrophic systems, estimating the growth, lipids and carotenoids production. This work was divided into four chapters. In the first chapter a bibliographical review was carried out addressing the topics of the thesis. The second chapter evaluated the influence of four culture media (MAM, BBM, BG-11 and NPK) on growth, morphology, lipid and carotenoid production of the two strains. The third and fourth chapters evaluated the growth, morphophysiology, ultrastructure and the lipids and carotenoids production under phototrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions of the strains. We have used Light Microscopy, Confocal, Transmission Electron Microscopy, Flow Cytometry and Chromatography (HPLC and GC) techniques. The growth was evaluated by cell counting (Neubauer hemocytometer), and yield dry biomass (gravimetric method). The results indicate that (A) *C. acidophila* has a fatty acid profile suitable for the production of biofuels; (B) *C. acidophila* showed higher dry biomass and lipid production in MAM medium; (C) *C. acidophila* demonstrated greater growth and production of lipids in the phototrophic system; (D) 1% glucose and acetate did not result in any significant increase in the growth and production of *C. acidophila* lipids; acetate was toxic to the strain under the conditions tested (acid medium); (E) *P. kessleri* presented higher dry biomass, production of lipids and carotenoids in BBM medium; (F) *P. kessleri* obtained growth in all cultivation systems (phototrophic, mixotrophic and heterotrophic) with higher dry biomass in the mixotrophic system with glucose; (G) the mixotrophic condition with acetate showed the highest lipid production (H) Lutein was the most abundant carotenoid detected in all treatments, with higher production in the myxotrophic system with glucose.

Keywords: Heterotrophic. Mixotrophic. Ultrastructure. Lipids. Carotenoids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Regimes de crescimento de microalgas sob diferentes condições ambientais. 30
- Figura 2 - Diagrama esquemático mostrando impacto das pressões ambientais sobre a produção de lipídios e carotenóides 42
- Figura 3- Biomassa seca (g.L^{-1}) da cepa *P. kessleri* LAFIC-006 **(a)** e *C. acidophila* LAFIC-004 **(b)**, nos diferentes tratamentos com meio de cultura. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 5$)..... 51
- Figura 4- Variação do pH ao longo do tempo de crescimento das duas cepas avaliadas nos diferentes tratamentos com meio de cultura. **(a)** *Parachlorella kessleri* LAFIC-006 e **(b)** *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. Valores médios \pm desvio padrão ($n = 5$)..... 52
- Figura 5- Aspecto das células *P. kessleri* LAFIC-006, sob diferentes meios de cultivo. Microscopia de Luz **(a-d)**; Confocal de varredura a laser da autofluorescência dos cloroplastos **(e-h)** e marcados com Vermelho do Nilo **(i-l)**. As células apresentaram intensa coloração verde, com regiões de vacúolo evidente no meio BBM **(a)** no meio NPK, as células apresentaram alterações na forma e uma coloração esverdeada fraca **(b)**. No meio BG-11 as células apresentaram uma cor esverdeada fraca, mas ainda com regiões vacuolizadas evidente **(c)**. No meio MAM as células apresentaram intensa coloração verde, com regiões de vacúolo evidente **(d)**. A autofluorescência dos cloroplastos (vermelho) nos meios BBM e MAM mostraram intensa fluorescência com a estrutura dos cloroplastos intactos **(e,f)**. Nos tratamentos BG-11, NPK as células mostraram pouca fluorescência **(g,h)**. Para a coloração com vermelho do Nilo (amarela), BBM **(i)**, NPK **(g,h)** e BG-11 **(k)** foram as células que apresentam pontuações amarela. No meio MAM **(l)** as células apresentaram poucas pontuações amarela e com baixa intensidade..... 53
- Figura 6- Aspecto das células *C. acidophila* LAFIC-004, sob diferentes meios de cultivo. Microscopia de Luz **(a-d)**; Confocal de varredura a laser da autofluorescência dos cloroplastos **(e-h)** e marcados com Vermelho do Nilo **(i-l)**. Nos meio MAM **(a)** e BBM **(b)**, as células apresentaram forma oval com intensa coloração verde e com regiões de vacúolo visível. No meio BG-11 **(c)** e NPK **(d)** as células apresentaram uma coloração esverdeada mais fraca. A autofluorescência dos cloroplastos (vermelho)

foram intensas nos meios MAM (e) e BBM (f). Nos meios BG-11 (g) e NPK (h) as células apresentaram pouca fluorescência. Para a coloração com vermelho do Nilo (amarela), os meios MAM (i), BBM (j) e BG-11 (k) foram as células que apresentam várias pontuações amarela (pontas de seta) com intensa coloração. No meio NPK (l) há uma diminuição dessas pontuações com baixa intensidade na coloração 54

Figura 7- Gráficos de Dispersão das populações celulares – FSC-A (tamanho celular) x SSC-A (complexidade celular) de *P. kessleri* e *C. acidophila* nos tratamentos com meio de cultura MAM, BBM, BG-11 e NPK..... 55

Figura 8- Parâmetros de citometria de fluxo de células de *P. kessleri* FSC, SSC (a,b) e *C. acidophila* FSC, SSC (c,d) - FSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se ao tamanho das células); SSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se à complexidade celular). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5)..... 55

Figura 9- Citometria de fluxo de células de *P. kessleri* (a,b) e *C. acidophila* (c,d) - PE-A vermelho do Nilo (VN) (células marcadas com o VN - sinal de fluorescência 580/30nm - referindo-se a lípidos neutros), PE-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 580 / 30nm), FITC-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 530 / 40nm); nos seguintes tratamentos: meio de cultura BBM, MAM, BG-11 e NPK. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5). 56

Figura 10 - Percentual de incremento das células de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 em condições fototrófica (Foto) e mixotrófica (Mix-Glu) com 1% de glicose, heterotróficas com 1% de glicose (Het-Glu) e no tratamento heterotrófico com 1% de acetato (Het -Acet). Letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (média \pm DP, n = 3)..... 71

Figura 11 - Perfis de ácidos graxos da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 na fase de crescimento exponencial (12 dias) e na fase de crescimento estacionária (30 dias), em condição fototrófica. Outro S = ácido graxos saturados não identificado (> 2%); Outros L = ácidos graxos insaturados não identificado (> 2%); S Total = Total de ácidos graxos saturados; U = ácidos graxos insaturados totais; teor de óleo = conteúdo

total de óleo. Percentagens são expressas como média \pm desvio padrão, n = 3. 72

Figura 12 - *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004, células em diferentes condições de cultivo. Microscopia de Luz (**a-d**), confocal de varredura a laser da autofluorescência dos cloroplastos (**e-h**) e marcados com Vermelho do Nilo (**i-l**). As Células apresentaram coloração esverdeada com as regiões do vacúolo evidente em condições fototrófica (Foto) (**a**) e mixotrófica com 1% de glicose (Mix-Glu) (**b**), enquanto na condição heterotrófica com 1% de glicose (Het-Glu), o número e o tamanho das células apresentaram-se reduzidos (**c**), juntamente com a ausência de pigmentação em células do tratamento heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet) (**d**). A autofluorescência dos cloroplastos (vermelho) em fototrófico (**e**) e células Mix-Glu (**f**) apresentaram intensa fluorescência com as estruturas dos cloroplastos intactos. No tratamento Het-Glu, os cloroplastos estavam granular com autofluorescência (**g**), enquanto que no tratamento Het-Acet, as células apresentaram pouca fluorescência (**h**). Através da coloração com o Vermelho do Nilo (amarelo) as células do tratamento fototrófico (**i**) e Mix-Glu (**j**), apresentaram pontuações amarela (pontas de seta), enquanto nos tratamentos Het-Glu (**k**) e Het-Acet (**l**) essas pontuações são reduzidas. 74

Figura 13 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. (**a**) O FSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se o tamanho das células); (**b**) SSC- A (intensidade de fluorescência, referindo-se à complexidade celular); de *C. acidophila* - LAFIC-004 células em condições fototrófica (Foto) e mixotrófica (Mix-Glu) com 1% de glicose, mixotrófica com 1% de acetato (Mix-Acet), heterotrófica com 1% de glicose (Het-Glu), e heterotrófica com 1% de acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 3). 75

Figura 14 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. Gráfico de dispersão - tamanho celular (FSC-A) vs. complexidade celular (SSC-A) de células de *C. acidophila* LAFIC-004 em condições fototrófica (Foto) e mixotrófica (Mix-Glu) com 1% de glicose, mixotrófica com 1% de acetato (Mix-Acet), heterotrófico com 1% de glicose (Het-Glu) e heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet).76

Figura 15 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. **(a)** FITC-A - VN (células marcada com Vermelho do Nilo - sinal de fluorescência 530 / 40nm), FITC-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 530 / 40nm); **(b)** PE-VN (células marcadas com Vermelho do Nilo - sinal de fluorescência 580 / 30nm-referindo-se aos lipídios neutros), PE-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 580 / 30nm), nos seguintes tratamentos: fototrófico (Foto), mixotrófico com 1% de glicose (Mix-Glu), heterotrófico com 1% de glicose (Het-Glu), e heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 3). 76

Figura 16 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 após 12 dias de cultivo no tratamento fototrófico **(a,f)**; As células apresentaram cloroplasto ocupando todo o volume citoplasmático **(a, b)** com presença de estigma **(c)** e pirenóide **(d)** cercado por grãos de amido e vários corpos lipídicos **(e)** com pontuações elétron-densas no interior das estruturas (setas) **(f)**. Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S), flagelo (F), Estigma (ST). 78

Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 após 12 dias de cultivo no tratamento mixotrófico com glicose (Mix-Glu) **(a, f)**. Células características com presença de grãos de amido no cloroplasto **(a, b)** pirenóide **(c)** e estigma **(d)**; Estrutura dos tilacóides com presença de grãos de amido **(e)**; Observa-se o aumento do número de corpos lipídicos com estruturas elétron-densas (setas) **(f)**. Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S), Estigma (E). 78

Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 cultivadas após 12 dias no tratamento heterotrófico com glicose (Het-Glu) **(a-d)**. Células com presença de cloroplasto ocupando menor volume celular, mas com tilacóides característicos **(a, b)**; Pirenóide com alguns grãos de amido e tilacóides visíveis **(c)**; Corpos lipídicos com aumento de pontuações elétron-densas **(d)**. Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S)..... 79

Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de *Chlamydomonas acidophila* estirpe LAFIC-004 após 12 dias em tratamento heterotrófico com acetato (Het-Acet) **(a-d)**. As células com estrutura alterada do

cloroplasto (**a, b**). Detalhe dos tilacóides desintegrados (**c**). Pirenóide com pontuações elétron-densas no interior (**d**). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S). 79

Figura 20 - Biomassa seca ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}$) de *P. kessleri* nos tratamentos fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 5$). 93

Figura 21 - Teor de lipídios de *P. kessleri* nos tratamentos fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 3$). 94

Figura 22 - Microscopia de luz (a-e), Confocal de varredura a laser (f-j) e de Fluorescência (k-o) de *P. kessleri*. As células apresentaram esverdeadas com regiões vacuolizadas no Foto (**a**) e no tratamento Mix-Glu (Mixotrófico- glicose) (**b**), no tratamento Mix-Acet (mixotrófico com acetato) as células apresentaram uma coloração esverdeada intensa (**c**), Het- Glu (Heterotrófico com glicose) as células apresentaram uma coloração esverdeada mais fraca, com células de menor tamanho (**d**), no tratamento Het-Acet (heterotrófico com acetato) as células apresentara uma coloração esverdeada mais intensa com vacúolo bem evidente (**e**). A autofluorescência dos cloroplastos (em vermelho), no tratamento Foto (**f**) e no Mix-glu (**g**) as células apresentaram baixa intensidade de fluorescência, mas com estrutura íntegra do cloroplasto. No tratamento Mix-Acet as células apresentaram alta intensidade de fluorescência com estrutura íntegra do cloroplasto (**h**), Het- Glu, o cloroplasto apresentou baixa fluorescência (**i**), sendo que no Het-acet as células apresentaram alta fluorescência (**j**). Para a marcação com Vermelho do Nilo (em amarelo), no Foto foram visualizados poucas pontuações amarela (**k**), assim como no tratamento Mix-Glu (**l**), no Mix-Acet as células apresentaram intensa fluorescência, com várias pontuações amarela (**m**), no Het-Glu foram visualizadas poucas pontuações amarela (**n**), e no tratamento Het-Acet as células apresentaram uma intensa fluorescência com várias pontuações amarela (**o**). 95

Figura 23 - Citometria de fluxo de células de *P. kessleri* cepa LAFIC 006 (a) FSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se o tamanho das células); (b) SSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se à complexidade celular) nos seguintes tratamentos: fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5). 96

Figura 24 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *P. kessleri* cepa LAFIC 006. Gráfico de dispersão - tamanho celular (FSC-A) vs. complexidade celular (SSC-A) em condições fototrófica (Foto), mixotrófica com 1% glicose (Mix-Glu), mixotrófica com 1% de acetato (Mix-Acet), heterotrófica com 1 % de glicose (Het-Glu) e heterotrófica com 1% de acetato (Het-Acet). 96

Figura 25 - Citometria de fluxo de células de *P.kessleri*. LAFIC 006 cepa LAFIC 006 (a) FITC-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 530 / 40nm); FITC-A VN (células marcada com o VN, sinal de fluorescência 530 / 40nm- referindo-se a carotenóides); (b) PE-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 580 / 30nm), PE-A VN (células marcadas com o VN - sinal de fluorescência 580/30nm - referindo-se a lipídios neutros), nos seguintes tratamentos: Fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5). 97

Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *P. kessleri* LAFIC 006 após sete dias de cultivo em condição fototrófica (Foto: a-d) com células típicas, parede celular bem visível, cloroplasto parietal em forma de taça e tilacóides duplos alongados penetrando no pirenóide (a, b), corpos lipídicos elétron-transparentes com pontuações elétron-densa periférica (c) pirenóide com uma bainha fina de amido (d); mixotrófica com acetato (Mix-Acet: e-h) células com grãos de amido dispersos em todo o citoplasma (e), tilacóides alongados entre os grãos de amido (f), vários corpos lipídicos com coloração densa (g) e pirenóide alongado (h); mixotrófica com glicose (Mix-Glu:i-l) células com pirenóide típico e vários corpos lipídicos dispersos no citoplasma (i), grãos de amido dispersos no cloroplasto (j), corpos lipídicos com coloração elétron-densa

(k), pirenóide com uma bainha fina de amido (l); heterotrófica com glicose (Het-Glu: m-p) células com muitos grãos de amido de diversos tamanhos dispersos pelo cloroplasto (m,n), corpos lipídicos elétron-transparentes, pontuações elétron-densa periférica (o), pirenóide coberto por grãos de amido (p); heterotrófica com acetato (Het-Acet: q-t) células com muitos grãos de amido (q,r), corpos lipídicos com coloração densa (s), tilacóides cobertos por grãos de amido (t). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S). 99

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Espécie, metabolismo/fonte de carbono e referências. 31
- Tabela 2- Moléculas bioativas, aplicações e referências de microalgas 38
- Tabela 3- Composição dos meios de cultura utilizados nos testes de crescimento das cepas *Chlamydomonas acidophila* LAFIC -004 e *Parachlorella kessleri* LAFIC 006. 46
- Tabela 4- Taxa de crescimento - μ (dia^{-1}), Tempo de duplicação (TD, dias) de *P. kessleri* LAFIC 006 e *C. acidophila* LAFIC 004, nos diferentes meios de cultura (14 dias de cultivo). Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n= 5$). As letras na mesma linha indicam tratamentos significativamente diferentes, segundo o teste de múltipla comparação de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes entre si com $p<0,05$). 51
- Tabela 5 - Carotenóides totais de *P. kessleri* e *C. acidophila*, nos diferentes tratamentos com meio de cultura (MAM; BBM; BG-11 e NPK) Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n= 4$). As letras na mesma linha indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de múltipla comparação de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes entre si com $p<0,05$). 57
- Tabela 6 - Dados de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 em meio ácido modificado, pH 3,6 em condição fototrófica. μ : taxa de crescimento em fase exponencial. EP: erro padrão da média. Todas os experimentos foram realizados em frascos de 150 mL com 3 a 5 repetições excepto n ° 13, que foi realizada em frascos de 5.000 mL para a produção de biomassa e determinação do teor de lipídios e o perfil de ácidos graxos..... 70
- Tabela 7 - Perfil de carotenóides ($\mu\text{.g}$) de *P. kessleri* LAFIC 006 nas condições fototrófica (Foto), Mixotrófica com glicose (Mix-Glu), mixotrófica com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes nas colunas de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P <0,05$) (média \pm DP, $n = 3$). 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP- Trifosfato de adenosina
BBM- Meio basal – do inglês Bold's Basal Medium
BG-11 – Blue Green Medium
C- Cloroplastos (C)
LB -corpos lipídicos
CCM-LAFIC- Coleção de Culturas de Microalgas do Laboratório de Ficologia da UFSC
cel.mL⁻¹ – Células por mL
C/N – Razão entre carbono e nitrogênio
DAG- diacilglicerol
CG-EM- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa
DAM- Drenagem ácida de mina
DMSO- Dimetil Sulfóxido
EDTA- Ácido Tetra-acético de Etilenodiamina, do inglês Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EPA - ácido eicosapentaenóico
ETE- Estação Experimental de Tratamento de Esgoto
F- Flagelo
FITC – Canal do citômetro, 530/40 nm, fluorescência verde;
FSC – parâmetro do citômetro (medidas de tamanho celular) – do inglês Forward Scatter
Foto – Tratamento autotrófico – em inglês Phototropic (Photo)
Het-Acet – Tratamento heterotrófico com acetato de sódio
Het-Glu – Tratamento heterotrófico com glicose
kJ.mol⁻¹ - quilojoule por mol (quantidade de energia)
LAFIC – Laboratório de Ficologia
LCME -Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
M- Mitocôndrias (M)
MAG- monoacilglicerol
MAM – Meio ácido – em inglês Modified Acid Medium
MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
Mix-Acet- Tratamento mixotrófico com acetato de sódio
Mix-Glu – Tratamento mixotrófico com glicose
MC- Microscopia confocal
ML- Microscopia de Luz
N- Núcleo
NPK – Meio hidropônico comercial na concentração 8:9:9, respectivamente.
P- Pirenóide
PE – Canal do citômetro - 580/30 nm, fluorescência laranja;
PUFA- Ácidos graxos poliinsaturados totais
PSI – Fotossistema I
PSII - Fotossistema II
RUBISCO- Ribulose 1,5 – bifosfato carboxilase/oxidase

S- Amido

ST- Estigma

SSC- Parâmetro do citômetro (complexidade celular), do inglês Side Scatter

TAG- triacilglicerol

VN - Vermelho do Nilo (Marcador de lipídios neutros) - inglês NR (Nile Red)

(9-dietilamino-5H benzo [a] fenoxazina-5-ona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	26
1.1	OBJETIVOS.....	27
1.1.1	Objetivo geral	27
1.1.2	Objetivos específicos.....	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1	MICROALGAS.....	28
2.2	CHLOROPHYTA	28
2.3	METABOLISMO E NUTRIÇÃO DAS MICROALGAS.....	29
2.4	METABOLISMO DA GLICOSE	32
2.5	METABOLISMO DO ACETATO	33
2.6	FATORES QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS	33
2.6.1	Luz	34
2.6.2	Temperatura	34
2.6.3	Nutrientes.....	35
2.6.4	pH.....	36
2.6.5	Substrato	36
2.6.6	Contaminação	37
2.7	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS ...	38
2.7.1	Lipídios e carotenóides.....	39
3	ARTIGO - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E CAROTENÓIDES DE DUAS MICROALGAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	44
3.1	INTRODUÇÃO.....	44
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.2.1	Microalgas e condições de cultivo	45
3.2.2	Cresecimento em diferentes meios de cultura.....	46
3.2.3	Taxa de cresecimento, biomassa seca e pH	47
3.2.4	Análises da morfologia celular	48
3.2.5	Detecção de lipídios neutros, tamanho e complexidade celular por citometria de fluxo	49
3.2.6	Carotenóides totais	49
3.2.7	Análise estatística.....	49
3.3	RESULTADOS	50
3.3.1	Taxa de cresecimento, biomassa seca e pH de <i>P. kessleri</i> LAFIC-006 e <i>C. acidophila</i> LAFIC-004	50
3.3.2	Análises da morfologia celular de <i>P. kessleri</i> LAFIC-006 e <i>C. acidophila</i> LAFIC-004	52

3.3.3	Detecção de lipídios e caracterização da população celular analisada por citometria de fluxo.....	54
3.3.4	Carotenóides totais	56
3.4	DISCUSSÃO	57
4	ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DA CEPA PRODUTORA DE LIPÍDIOS <i>CHLAMYDOMONAS ACIDOPHILA</i> LAFIC-004 (CHLOROPHYTA) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA.....	62
4.1	INTRODUÇÃO.....	62
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.2.1	Cepa de microalga e condições de cultura.....	65
4.2.2	Padrão de crescimento de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004 em diferentes condições de cultura	65
4.2.3	Crescimento de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004 em diferentes condições	66
4.2.4	Extração de lipídios e análise de ácidos graxos	67
4.2.5	Análise da morfologia celular	67
4.2.6	Detecção de lípidos, tamanho celular e complexidade por citometria de fluxo.....	68
4.2.7	Análise da ultra-estrutura das células.....	68
4.2.8	Análise estatística.....	69
4.3	RESULTADOS	69
4.3.1	Padrão de crescimento da cepa <i>C. acidophila</i> LAFIC-004. 69	
4.3.2	Crescimento de <i>C. acidophila</i> LAFIC-004 em diferentes condições	70
4.3.3	Teor de lipídios e perfil de ácidos graxos.....	71
4.3.4	Morfologia celular	72
4.3.5	Detecção de lipídios, tamanho da célula, e complexidade por citometria de fluxo.....	73
4.3.6	Ultra-estrutura celular	77
4.4	DISCUSSÃO	79
5	ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, ULTRAESTRUTURAL E PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E CAROTENÓIDES DA CEPA <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> LAFIC 006 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	86
5.1	INTRODUÇÃO.....	86
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
5.2.1	Cepa de microalga e condições de cultura.....	89
5.2.2	Crescimento de <i>P. kessleri</i> LAFIC-006 em diferentes condições	89

5.2.3	Extração de lipídios	90
5.2.4	Análise da morfologia celular	91
5.2.5	Deteção de lipídios, tamanho celular, e complexidade por citometria fluxo	91
5.2.6	Análise da ultra-estrutura das células	92
5.2.7	Perfil de carotenóides	92
5.2.8	Análise estatística	92
5.3	RESULTADOS	93
5.3.1	Biomassa seca de <i>P. kessleri</i> LAFIC-006 em diferentes condições de cultivo	93
5.3.2	Teor de lipídios	93
5.3.3	Morfologia celular	94
5.3.4	Deteção de lipídios, tamanho da célula, e complexidade por citometria de fluxo	95
5.3.5	Ultra-estrutura celular	97
5.3.6	Perfil de carotenóides	100
5.4	DISCUSSÃO	100
6	CONCLUSÕES GERAIS	108
	REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO GERAL

Sob a denominação microalgas estão incluídos os organismos fotossintéticos procarióticos (cianobactérias) ou eucarióticos (algas verdes, vermelhas, diatomáceas, dinoflagelados etc.). Constituem um grupo extremamente heterogêneo, sendo encontradas em todo o mundo, principalmente em ambientes aquáticos (água doce e salgada), mas também encontrados em diversos tipos de solo. Embora sejam organismos de vida livre, algumas espécies podem viver em associação simbiótica com outros organismos ou mesmo serem parasitas heterótrofos (RAVEN, 2001; TOMASSELLI, 2004).

As microalgas representam um grupo altamente especializado com capacidade de biofixação de CO₂ através de sua atividade fotossintética e acumular biomassa rápida e eficientemente. Além disso, podem usar diferentes metabolismos energéticos (mixotrófico e heterotrófico) para manutenção de suas estruturas como a respiração e fixação/assimilação de nitrogênio, o que torna algumas espécies organismos únicos, com amplo espectro de aplicação tecnológica (PIENKOS & DARZINS, 2009; OLAIQZOLA, 2003).

Diversas substâncias sintetizadas pelas microalgas têm aumentado o interesse no seu potencial biotecnológico. Por isso, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa para diversas aplicabilidades, entre elas, para uso na alimentação bem como para obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial, produção de pigmentos, ficobiliproteínas e polímeros como polissacarídeos, os quais podem ser utilizados em diversos setores da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006).

A produção de lipídios a partir de microalgas para a produção de biodiesel e outros bicomustíveis, vem sendo muito estudada, devido à quantidade intracelular de lipídios em algumas espécies, facilidade de cultivo, entre outros fatores promissores (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Também podem ser utilizadas como biorremediadoras de ambientes aquáticos e terrestres. A biomassa obtida nessa biorremediação pode servir como fonte de matéria-prima para produção de diversos produtos (fertilizantes, ração, etc.) (EIBL *et al.*, 2014). Entretanto, para ter sucesso no cultivo de microalgas é necessário conhecer a morfofisiologia, o metabolismo e as condições ideais de cultivo para cada espécie, visando otimizar o cultivo (processo ou produto), determinando especialmente os fatores que controlam o crescimento e o metabolismo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar a morfofisiologia e a ultraestrutura de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 e *Parachlorella kessleri* LAFIC-006 em sistemas de cultivo fototrófico, mixotrófico e heterotrófico e determinar o crescimento, a produção de lipídios e carotenóides em diferentes condições de cultivo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência de diferentes meios de cultivo no crescimento, morfologia e na produção de lipídios e carotenóides de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 e *Parachlorella kessleri* LAFIC-006
- Caracterizar as possíveis alterações na morfologia, ultraestrutura e produção de lipídios e carotenóides de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 sob o efeito da glicose e do acetato no metabolismo.
- Caracterizar as possíveis alterações na morfologia, ultraestrutura e produção de lipídios e carotenóides de *Parachlorella kessleri* LAFIC-006 sob o efeito da glicose e do acetato no metabolismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

As microalgas são organismos microscópicos, coloniais ou filamentosos, fotoautotróficos, procarióticos (cianobactérias) ou eucarióticos (algas verdes, vermelhas, diatomáceas, dinoflagelados etc.). Apresentam como pigmento fotossintético primário a clorofila-a, entretanto, outros pigmentos tais como carotenóides (β -caroteno, fucoxantina e astaxantina) e ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina), podem estar presentes (RICHMOND, 2004; LEE *et al.*, 2008). Podem ter diferentes tipos de organização celular: unicelular, colonial e filamentosa; as espécies unicelulares podem ser móveis (presença de flagelo). A grande maioria é de vida livre, porém, certo número de microalgas vivem em associação simbiótica com uma variedade de outros organismos (RICHMOND, 2004).

Esses micro-organismos estão entre os seres vivos mais antigos do planeta e estão presentes em praticamente todos os ambientes, pela sua diversidade ecológica e adaptabilidade fisiológica, sobretudo em meios aquáticos (águas doces, salobras e salgadas), representando uma variedade grande de espécies que vivem em condições extremas, tais como a superfície úmida de rochas, nascentes quentes, o ar, neve e desertos (LEE *et al.*, 2008).

Estima-se que existem mais de 50.000 espécies de microalgas sendo aproximadamente 30.000 espécies descritas (RICHMOND, 2004). A cultura de microalgas em laboratório tem cerca de 140 anos de idade, e a agricultura comercial menos de 60 anos (BOROWITZKA *et al.*, 2013).

Nos primeiros estudos de cultivo de microalgas foram utilizadas espécies do gênero *Chlorella* que apresentavam bom crescimento em meios enriquecidos apenas com nutrientes minerais (nitrogênio, fósforo e sais minerais diversos). Esses resultados fizeram com que se acreditasse que todas as microalgas eram estritamente autotróficas. Entretanto, apesar de serem tipicamente autotróficas, algumas espécies de microalgas podem viver no escuro utilizando fontes orgânicas de carbono como energia, o que caracteriza o crescimento heterotrófico (BORZANI *et al.*, 2001; LOURENÇO, 2006; LIU *et al.*, 2014).

2.2 CHLOROPHYTA

As Chlorophytas (algas verdes) são diversificadas na estrutura e incluem aproximadamente 17.000 espécies (RAVEN *et al.*, 2001). A

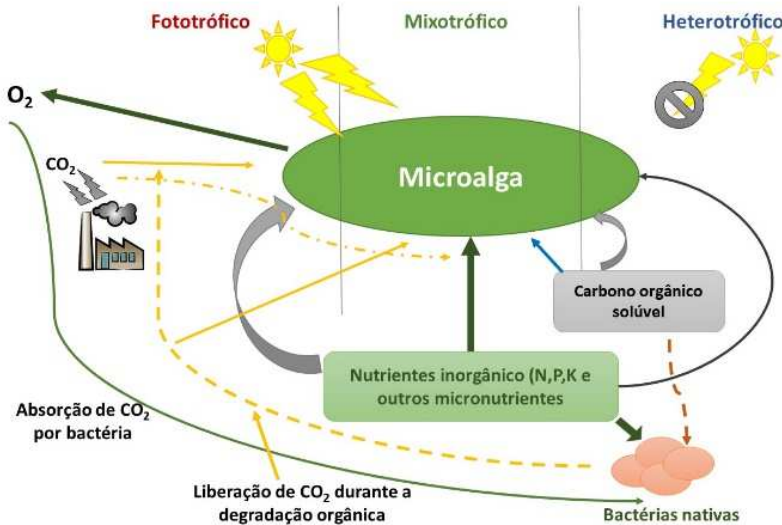
grande maioria é de habitat aquático, entretanto, existe uma variedade de outros locais onde as algas verdes se encontram como a superfície da neve, troncos de árvores, no solo em associação simbiótica com os fungos (constituindo os líquens), protozoários de água doce, esponjas, cnidária e celenterados (RICHMOND, 2004).

As algas verdes são as mais promissoras para a produção de biodiesel, sendo os gêneros *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Dunaliella* os mais amplamente utilizados (ROSENBERG *et al.*, 2008). Muitas algas verdes unicelulares são móveis, em virtude da presença de atividade flagelar. Os tipos coloniais mostram-se como esferas, filamentos ou placas. Possuem pigmentos fotossintéticos localizados em cromatócitos, que são verdes devido ao predomínio das clorofilas “a” e “b” sobre os carotenos e xantofilas. Há neles diferentes xantofilas, sendo geralmente a luteína a mais abundante. As reservas fotossintéticas são, em geral, constituídas por amido, cuja formação está intimamente associada ao pirenoide, uma pequena região do cromatócito (SMITH, 1955).

2.3 METABOLISMO E NUTRIÇÃO DAS MICROALGAS

As microalgas em geral, são consideradas organismos fotoautotróficos, isto é, a energia utilizada para o seu crescimento e manutenção do seu metabolismo provém da fotossíntese (ZASLAVSKAIA *et al.*, 2001). No entanto, algumas microalgas são capazes de crescer heterotróficamente (dependente de substrato) em ambientes escuros, e / ou mixotróficamente (autotrófico e heterotróficos) dependendo da disponibilidade do carbono orgânico (substrato), do CO₂, e da luz (Fig. 1).

Figura 1 - Regimes de crescimento de microalgas sob diferentes condições ambientais.



(Fonte: HAMMED *et al.*, 2016, modificado).

As microalgas contêm múltiplas vias metabólicas para diferentes condições de crescimento (fototrófico, mixotrófico e heterotrófico). A via metabólica da condição heterotrófica envolve três passos principais: (1) A absorção / Assimilação, (2) a ativação e transformação, e (3) armazenamento / utilização de metabólitos (MORALES-SÁNCHEZ *et al.*, 2015). Algumas microalgas podem alternar entre estes regimes de crescimento, ficando uma via ativa enquanto a outra via fica inativa por um período, dependendo das condições de cultivo. Outras microalgas são capazes de utilizar as vias simultaneamente (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Tem sido proposto que vias incompletas ou a ausência de uma reação enzimática no metabolismo do carbono central sejam as principais causas do crescimento fototrófico obrigatório (CHEN & CHEN, 2006). Pelo menos em alguns casos, verificou-se que a natureza fototrófica obrigatória das microalgas é devido à falta de uma absorção eficiente ou de um mecanismo de transporte para os carboidratos; quando os transportadores são introduzidos, as células são capazes de crescer heterotroficamente (CHEN & CHEN, 2006; DOEBBE *et al.*, 2007). As microalgas podem evoluir para se tornar fototróficas ou heterotróficas

especializadas através de mudanças de longo prazo nas condições de crescimento (LIANG *et al.*, 2009; BELL, 2013).

No metabolismo heterotrófico ou mixotrófico diversas fontes de carbono orgânico podem ser utilizadas pelas algas, incluindo açúcares, hidratos de carbono hidrolisados, melaço, acetato, glicerol, bem como carbonos orgânicos de efluentes (Tab. 1).

Estudos apontam maior produtividade em biomassa e produção de lipídios através do crescimento mixotrófico de microalgas, utilizando efluentes suplementada com várias fontes de carbono (BHATNAGAR *et al.*, 2011; HONGYANG *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; GIRARD *et al.*, 2014; CHANDRA *et al.*, 2014). No entanto, outras pesquisas demonstraram que as microalgas podem gerar maior biomassa e produção de lipídios em condições de crescimento heterotrófico (HONG E LEE, 2007; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; LIANG, 2013; LIU *et al.*, 2014).

Tabela 1- Espécie, metabolismo/fonte de carbono e referências.

Espécies	Metabolismo/ Fonte de carbono	Referências
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Heterotrófico/Acetato	Chen & Johns (1994, 1996); Zhang <i>et al.</i> , (1999a)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Mixotrófico, Heterotrófico/Acetato, glicose, sacarose, glicerol.	Moon. M, (2013)
<i>Chlorella</i> sp.	Heterotrófico/ Acetato	Ortega et al. (2004)
<i>Chlorella minutissima</i>	Heterotrófico/ Glicose, amido, sacarose, glicina, acetato, glicerina	Li <i>et al.</i> , (2011)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico/ Glicose, glicerol, carboidrato hidrolisado, melaço, águas residuais	Che & Walker, (2012); Cheng <i>et al.</i> ,(2009) ; Gao <i>et al.</i> , (2010) ; Li <i>et al.</i> , (2007) ; Miao & Wu (2006); Mião <i>et al.</i> , (2004); O'Grady & Morgan, (2011); Ruiz <i>et al.</i> , (2009); Zhang <i>et al.</i> , (1999b); Zhou <i>et al.</i> , (2012); Yan <i>et al.</i> , (2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Mixotrófico, Heterotrófico/ Glicose	Running <i>et al.</i> , (1994) ; Yang <i>et al.</i> , (2000)

<i>Chlorella regularis</i>	Heterotrófico/ Glicose, acetato	Sansawa & Endo (2004)
<i>Chlorella saccharophila</i>	Heterotrófico/ Glicose, acetato	Tan & Johns (1991); Isleten-Hosoglu <i>et al.</i> , (2012)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Heterotrófico/ Glicose	Chen & Johns (1991); Zheng <i>et al.</i> , (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mixotrófico, Heterotrófico/ Co-produtos agro-industrial, glicose, sacarose, acetato, glicerol	Arroyo <i>et al.</i> , (2011); El Sheekh, (2012); Liang <i>et al.</i> , (2009); Mitra <i>et al.</i> , (2012); O grandy & Morgan, (2011) ; Perez-Garcia <i>et al.</i> , (2011b); Rattanapoltee <i>et al.</i> , (2008); Scarsella <i>et al.</i> , (2009)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Heterotrófico/ Glicose, frutose, manose, sacarose, melação	Ip & Chen, (2005); Liu <i>et al.</i> , (2010, 2011b, 2012a)
<i>Haematococcus lacustris</i>	Heterotrófico/Glicose	Chen <i>et al.</i> , (1997)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Heterotrófico/Acetato	Kobayashi <i>et al.</i> , (1992)
<i>Micractinium pusillum</i>	Heterotrófico/Glicose, acetato	Bouarab <i>et al.</i> , (2004)
<i>Pseudococcomyxa chodatii</i>	Heterotrófico/Glicose	Kiseleva & Kotlova (2007)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Heterotrófico/ Glicose e acetato	Day & Tsavalos (1996); Azma <i>et al.</i> , (2011)

Fonte: Biofuels From Algae (2014), com modificações.

2.4 METABOLISMO DA GLICOSE

A glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada para a cultura de microalgas heterotróficas. Isto acontece porque a glicose tem mais energia em comparação com outros substratos orgânicos. Por exemplo, os rendimentos de glicose são de $\sim 2,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ de energia, em comparação com $\sim 0,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ do acetato (BOYLE & MORGAN, 2009). A assimilação da glicose oxidativa começa com a fosforilação de hexose, obtendo-se glicose-6-fosfato, que é prontamente disponível para o armazenamento, a síntese celular e da respiração. Entre as várias vias utilizadas pelos micro-organismos para a glicólise, aparentemente apenas

duas vias foram descritas em algas: a via de Embden Meyerhof-e a via da pentose fosfato (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Talvez a mais notável diferença no metabolismo da glicose de microalgas sob condições de cultura heterotrófica, em comparação com o metabolismo fototrófico é que, no escuro a glicose é metabolizada principalmente pela via de pentose-fosfato, enquanto no fototrófico a principal via é Embden- Meyerhof. Ambos os percursos são realizados no citosol e são funcionais em células de microalgas (YANG *et al.*, 2000; HONG & LEE, 2007). No entanto, algumas cepas de microalgas *Dunaliella tertiolecta* e *Prymnesium parvum* são incapazes de assimilar a glicose, apesar de terem as enzimas necessárias para o seu metabolismo (NEILSON & LEWIN, 1974).

2.5 METABOLISMO DO ACETATO

O acetato, uma vez no citosol, é assimilado por acetilação da coenzima A por acetil-CoA sintetase para formar acetil coenzima A (acetil-CoA), utilizando uma única molécula de ATP (BOYLE & MORGAN, 2009). O acetato (conduzido pela coenzima A) é geralmente oxidado por meio de duas maneiras: (a) pelo ciclo dos ácidos do glioxilato, para formar o malato em glioxissomos plastídios e (b) através do ciclo tricarbóxicos (TCA), para o citrato na mitocôndria, que fornece esqueletos carbônicos e energia (NEILSON & LEWIN, 1974; BOYLE & MORGAN, 2009; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Em geral, as microalgas que crescem pela assimilação de acetato devem possuir uma via do ciclo do glioxilato para incorporar eficientemente grupos acetilo de acetil-CoA em esqueletos de carbono. O ciclo do glioxilato requer síntese de isocitratoliase e malato sintetase. Ambas as enzimas são induzidas quando as células são transferidas para meio contendo acetato (NEILSON & LEWIN, 1974; BOYLE & MORGAN, 2009).

2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Existem vários fatores que influenciam o crescimento de microalgas: dentre eles, pode-se destacar a luz, a temperatura, os nutrientes, o pH, o oxigênio, o substrato nos cultivos heterotróficos e mixotróficos, problemas de contaminação por outras microalgas, fungos, bactérias e leveduras, principalmente nos cultivos heterotróficos. A resposta para um cultivo equilibrado pode estar relacionada a uma

combinação de fatores, sendo a espécie ou cepa de microalga o fator principal e as condições de cultivo fatores secundários (RICHMOND, 2004).

2.6.1 Luz

Nos cultivos autotróficos e mixotóxicos, a luz tem um papel importante sobre a composição bioquímica, sendo em grande parte controlada pela fotoaclimatação ou fotoadaptação. Nesse processo as células das algas sofrem alterações dinâmicas na composição celular, juntamente com alterações nas propriedades ultra-estruturais, biofísicas e fisiológicas para aumentar a fotossíntese e o crescimento (DUBINSKY *et al.*, 1995).

Uma tendência comum de resposta celular para a baixa intensidade da luz é aumentar o conteúdo de clorofila 'a' e outros pigmentos (como a clorofila b, clorofila c, ficobiliproteínas e carotenóides primários). Por outro lado, em resposta a alta intensidade de luz, os carotenóides secundários (por exemplo, zeaxantina, b-caroteno e astaxantina), servem como agentes fotoprotetores. A acumulação de carotenóides pode, em geral, resultar na alternância de carbono e fluxos de nitrogênio dentro das células sob condições estressantes, e altas intensidades de luz tendem a aumentar a produção de polissacarídeo em células algais. Estudos com microalgas sugerem que o teor de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados totais (PUFA), incluindo ácido eicosapentaenóico (EPA), está inversamente relacionada com a intensidade de luz e crescimento celular (RICHMOND, 2004; COHEN, 1999).

2.6.2 Temperatura

O efeito da temperatura sobre as reações bioquímicas torna este um dos mais importantes fatores ambientais que influenciam a composição bioquímica de algas (RICHMOND, 2004). A temperatura ideal para as culturas de fitoplâncton é geralmente entre 20 e 24 °C, embora possa variar de acordo com a composição do meio de cultura, a espécie ou cepa cultivada. São mais comumente cultivadas espécies de microalgas que toleram temperaturas entre os 16 e 27 °C. Temperaturas abaixo de 16 °C desaceleram o crescimento, enquanto os superiores a 35 °C são letais para algumas espécies. Para controle de temperatura as microalgas podem ser resfriadas por um fluxo de água sobre o meio em que estão sendo cultivadas ou com unidades de refrigeração de ar condicionado (COUTTEAU, 1996). Tem sido relatado que a diminuição da temperatura

pode resultar no aumento da produção de enzimas como um mecanismo adaptativo para a manutenção de taxas de fotossíntese e respiração (RICHMOND, 2004). Além disso, as baixas temperaturas induzem a acumulação de políeis e aminoácidos ou derivados de aminoácidos como solutos compatíveis, que podem contribuir para a sensibilidade ou tolerância de microalgas para refrigeração (RICHMOND, 2004).⁸

2.6.3 Nutrientes

Muitos meios de cultura são empregados nos cultivos de microalgas. De acordo com a espécie de microalga e sua finalidade, busca-se o meio apropriado para se desenvolver o cultivo. Os nutrientes presentes no meio de cultura podem estimular ou inibir o crescimento de acordo com a quantidade de nutriente adicionado (SHEEHAN *et al.*, 1998). Os principais elementos limitantes do crescimento são o carbono, o nitrogênio, o fósforo e o ferro (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004; SOARES, 2010). O carbono é considerado um dos elementos mais importantes, uma vez que constitui cerca de 50% da biomassa microalgal (SOARES, 2010). Já o nitrogênio, que geralmente representa cerca de 7-10% do peso seco da célula, é um constituinte essencial de todas as proteínas estruturais e funcionais em células de algas. A síntese de lipídios neutros ou hidratos de carbono em condições limitadas de nitrogênio é espécie-específico. Dentro do gênero *Chlorella*, por exemplo, algumas cepas acumularam grandes quantidades de amido, sob privação de nitrogênio, enquanto outras acumularam lipídios neutros (RICHMOND, 1986). A relação carbono-nitrogênio (C/N) também tem um impacto significativo sobre o crescimento de microalgas e biossíntese de lipídios (CHEN & CHEN, 2006). Normalmente, a razão C/N requerida para o desenvolvimento das microalgas é 20/1 ou 30/1 (FONTENOT *et al.*, 2007). Entretanto essa relação não descreve as condições das células individuais ou populações e a relação ótima varia entre as espécies. Outro macronutriente que desempenha um papel fundamental no metabolismo celular das microalgas é o fósforo, por estar presente em diversos componentes funcionais e estruturais requeridos ao crescimento normal e desenvolvimento das microalgas. Entre oligoelementos minerais essenciais, o ferro desempenha um papel importante na composição bioquímica celular por causa de suas propriedades redox e implicação em processos fundamentais, como a fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA (RICHMOND, 2004).

2.6.4 pH

O consumo das formas inorgânicas de carbono pelas algas eleva o pH, devido ao fato do aparato fotossintético desses organismos transportarem íons hidróxido para o exterior da célula, reação catalisada pela enzima anidrase carbônica, associado à captação de íons H^+ para o interior das membranas do tilacóide (CUARESMA *et al.*, 2006). Segundo NURDOGAN & OSWALD (1995), o pH influencia a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo através da volatilização da amônia pela reação: $NH_4^+ + OH^- \leftrightarrow NH_3 + H_2O$, além da precipitação de ortofosfato. Em cultivos mixotrófico ou heterotrófico onde é adicionado uma fonte de carbono orgânico, o substrato adicionado ao meio e sua concentração pode alterar o pH do meio de cultivo. Em cultivo de *Chlorella vulgaris* com adição de glicose no meio de cultura ocorreu a indução da alcalinização do meio, devido a um movimento de prótons na captação da glicose. Uma vez que outros açúcares podem ser usados, a velocidade e o aumento do pH depende da concentração e tipo de açúcar utilizado. Comumente, sob baixas concentrações de hexoses, ocorre uma diminuição no pH e no consumo de açúcar. Quando é utilizado o acetato de sódio como substrato, o pH aumenta, porque o restante do Na^+ ou K^+ se junta com íons hidroxila (OH^-) ou outros ânions, alcalinizando o meio de cultura (KOMOR & TANNER, 1974, 1976.; KOMOR *et al.*, 1985).

2.6.5 Substrato

Em cultivos autotróficos a única fonte de carbono disponibilizada é o CO_2 inorgânico. Nesse caso, o dióxido de carbono pode ser disponibilizado às células por difusão (do ar atmosférico) ou por borbulhamento de ar através de compressores diretamente no meio. No meio de cultura, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO_2 , ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) ou carbonato (CO_3^-) e suas proporções dependem do pH (CHEN & CHEN, 1996; RICHMOND, 2004).

Em cultivos heterotróficos, o metabolismo das microalgas utiliza uma rota específica na qual esses organismos crescem no escuro, suportados por uma fonte exógena de carbono orgânico, substituindo o tradicional aporte de dióxido de carbono e energia luminosa em condições fotossintéticas. Nessa condição, algumas espécies podem não ser capazes de consumir certos compostos orgânicos ou sofrerem inibição do crescimento pelo seu excesso (CHEN & JOHNS, 1995; CHEN & CHEN, 1996). A inibição pelo substrato é um dos principais problemas que

impedem elevadas densidades celulares de microalgas em culturas heterotróficas (CHEN & JOHNS, 1995). Portanto, é extremamente necessário conhecer qual o tipo de substrato e a concentração exata para levar a um aumento da taxa de crescimento e produtividade.

Com o gênero *Chlorella* diversos trabalhos tem demonstrado um aumento no crescimento utilizando glicose na concentração de 10 g.L⁻¹ (LI, 2007; LIANG *et al.*, 2009; CHENG, 2009; GAO, 2010; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Entretanto, a concentração ideal pode variar entre as espécies de *Chlorella*. Por exemplo, para o crescimento ideal de *C. saccharophila* uma concentração de glicose de 2,5 g.L⁻¹ é necessária. A inibição do crescimento ocorreu em concentrações > 25 g.L⁻¹. Já para *C. sorokiniana* a inibição ocorreu em concentrações > 5 g.L⁻¹ (TAN & JOHNS, 1991). A concentração ideal de acetato de sódio como substrato também pode variar entre as espécies. Para *Chlamydomonas reinhardtii* a concentração de acetato variou entre 0,2; 0,85 e 10 g.L⁻¹ (ZHANG *et al.*, 1991; MOON *et al.*, 2013). Em estudo com *C. vulgaris* o acetato de sódio na concentração de 10 g.L⁻¹ foi adicionado ao meio, apresentando crescimento satisfatório (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Contudo, é necessário estabelecer para cada espécie/cepa o substrato e a concentração ideal para obter sucesso no cultivo.

2.6.6 Contaminação

Um grande problema nos cultivos de microalgas é a contaminação com outros micro-organismos, principalmente nos cultivos heterotróficos onde é adicionado uma fonte de carbono orgânico. Os micro-organismos principalmente fungos e bactérias apresentam um crescimento rápido, podendo a produtividade da microalga ser afetada devido á contaminação não desejada (RICHMOND, 2004). Esse problema pode ser efetivamente superado pela rigorosa esterilização e operação asséptica. Além disso, a otimização das condições de crescimento para as microalgas podem ajudar a minimizar esse problema. Portanto, é necessário controlar e monitorar tais contaminantes para obter uma biomassa de microalgas livre de impurezas prejudiciais, ou para certos produtos, manter os contaminantes dentro de limites aceitáveis. O crescimento deve ser acompanhado por observações microscópicas (RICHMOND, 2004). Vários métodos têm sido propostos para o desenvolvimento de cepas axênicas de microalgas, tais como repicagem, diluição em série, micropipetagem, ultra-som, produtos químicos, radiação ultravioleta, pressão osmótica e antibióticos. O uso de antibióticos é o método mais comum para a iniciação e manutenção de culturas axênicas de microalgas.

Entretanto, é difícil obter a cultura axênica usando um único antibiótico. Portanto, uma combinação de antibióticos é frequentemente utilizada. Tais combinações são geralmente determinadas após longos experimentos e repicagem repetidas (CHO *et al.*, 2013).

2.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS

O cultivo em massa de microalgas começou quase que simultaneamente nos Estados Unidos, Alemanha e Japão no final de 1940 (BURLEW, 1953). A partir de então, os sistemas de cultivo de microalgas cada vez mais têm desenvolvido novas técnicas para melhorar o cultivo (LIU *et al.*, 2014). Hoje em dia, existem inúmeras aplicações comerciais de microalgas (Tab. 2).

Tabela 2- Moléculas bioativas, aplicações e referências de microalgas

Moléculas bioativas (tipos)	Aplicações	Referências
Proteínas	Nutrição humana (nutracêutico), nutrição animal (pecuária e aquíicultura), vacinas e benefícios diversos à saúde	Spolaore <i>et al.</i> , (2006) Vonshak (1997) Derner <i>et al.</i> , (2006) Lourenço (2006) Becker (2004)
Lipídeos, triacilgliceróis, ácidos graxos	Nutrição humana (nutracêuticos), nutrição animal (pecuária e aquíicultura), biodiesel/biocombustíveis, e benefícios diversos à saúde	Spolaore <i>et al.</i> , (2006) Cohen (1999) Derner <i>et al.</i> , (2006) USDOE (2010) Becker (2004)
Carotenóides	Pró-vitamínico, anti-câncer, ativação do sistema imune, corante alimentar e cosmético, anti-oxidante, fotoproteção, ação contra doenças degenerativas etc.	Richmond (2004) Cohen (1999)
Hidrocarbonetos	Biocombustíveis	Largeau & Metzger (2001)
Polissacarídeos	Agentes gelificantes, espessantes, emulsificantes, biocombustíveis	Cohen (1999)

Ficobiliproteínas	Marcador fluorescente em exames diagnósticos, microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e outras técnicas de fluorescência	Cohen (1999)
Poli-hidroxialcanoatos	Produção de bioplásticos	Cohen (1999)
Ficotoxinas	Atividade citotóxica, anticâncer/antitumoral, antibióticos, antivirais	Borowitzka (1999) Bakhuni & Rawat (2005) Botana (2007)
Halogenados aromáticos	Antibióticos	Borowitzka (1999)
Compostos fenólicos	Antibióticos	Borowitzka (1999)
Isótopos estáveis (diversos tipos de moléculas)	Estudos metabólicos e de síntese bioquímica	Spolaore <i>et al.</i> , (2006) Glazer (1994)

O procedimento mais comum para a cultura em massa de microalgas é o crescimento fototrófico em tanques abertos. No entanto, esses procedimentos apresentam vários problemas que restringem a sua utilização; por exemplo, a contaminação com espécies indesejadas e a capacidade da espécie/cepa de resistir a condições de cultivo adversas (GUEDES *et al.*, 2011). Tecnologias mais avançadas foram disponibilizadas em sistemas fechados; os biorreatores (fototrófico ou heterotrófico) fornecem melhores opções para o crescimento da maioria das cepas de microalgas, protegendo a cultura contra a contaminação e permitindo o controle abrangente e integrado das condições de processamento (GUEDES *et al.*, 2011). O cultivo em biorreatores permite a manipulação de vários parâmetros durante o processamento, visando a síntese máxima do produto desejado (lipídios ou pigmentos como luteína por exemplo) (GUEDES *et al.*, 2011).

2.7.1 Lipídios e carotenóides

As microalgas têm sido consideradas uma alternativa promissora como matéria-prima para a produção de biocombustíveis e pigmentos e seu potencial tem sido amplamente relatado por muitos pesquisadores nos últimos anos (CHISTI, 2007; HU *et al.* 2008; MATA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; GUEDES *et al.*, 2011; CAMPENNI *et al.*, 2013; D’ALESSANDRO *et al.*, 2016; MINHAS *et al.*, 2016), devido ao seu crescimento rápido e abundância de lipídios e carotenóides.

Os lipídios nas microalgas estão divididos em lipídios neutros (de armazenamento), triacilgliceróis (TAG) e lipídios polares (de membrana), fosfolipídios, glicolipídios e esteróis (NELSON & COX, 2002). A síntese de ácidos graxos pode ser dividida em três etapas principais: síntese de acetil coenzima A (acetil CoA) no citoplasma; síntese de ácido graxo saturado com 16-18 carbonos e posterior dessaturação, alongação da cadeia de carbonos e síntese dos acil gliceróis (triglicerídeos) (HUANG *et al.*, 2010).

A extração de lipídios e a determinação da percentagem de lipídios neutros são dois passos importantes para produção de biodiesel, além da triagem para melhores linhagens (LEE *et al.*, 1998). Portanto, a detecção rápida de produção *in situ* de lipídios neutros é um desafio atual na pesquisa de biocombustíveis. Uma alternativa rápida e fácil para rastrear os teores lipídicos das microalgas é a combinação da técnica de citometria de fluxo com o marcador Vermelho do Nilo. Vários grupos de pesquisa têm utilizado esta técnica para marcar os corpos lipídicos neutros em microalgas em combinação com diferentes solventes orgânicos, tais como acetona, glicerol e DMSO (MONTEIRO *et al.*, 2011; GUZMÁN *et al.*, 2012; CIRULIS, *et al.*, 2012; ROLEDA, *et al.*, 2013; SATPATI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Pelo menos três classes de pigmentos ocorrem em microalgas: ficobilinas, clorofilas e carotenóides (D’ALESSANDRO *et al.*, 2016). Os carotenóides constituem uma classe de pigmentos terpenóides de grande importância, com alto valor comercial e funções fisiológicas importantes, devido a suas propriedades antioxidantes, corante e provitaminica (MINHAS *et al.*, 2016).

Os pigmentos naturais têm um importante papel no metabolismo fotossintético e pigmentação das algas. Além disso, apresentam atividades biológicas benéficas para a saúde. Pigmentos extraídos de microalgas estão enfrentando uma forte demanda do mercado: o preço do β -caroteno atinge facilmente o valor de 700 € / kg (aproximadamente 2.450 reais /kg), enquanto o seu homólogo sintético não chega a metade desse valor. O β -caroteno natural é preferido pelo mercado do setor da saúde porque é uma mistura de isômeros trans e cis, com atividade anti-

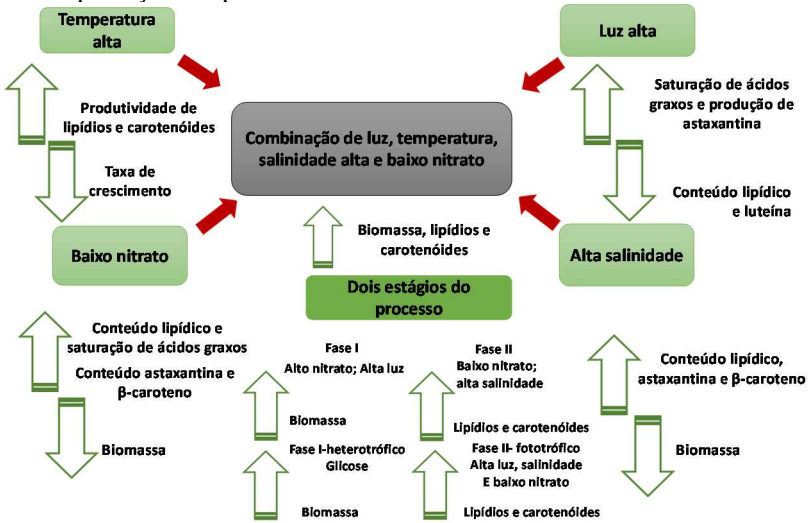
câncer (GUEDES *et al.*, 2011). Outro pigmento de alto valor é a luteína, muito utilizada em diversos setores da indústria, com destaque para a área da saúde, onde estudos mostram que a luteína protege moléculas de lipídios, membranas protéicas, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra o ataque dos radicais, tendo um papel essencial na proteção de doenças (GUEDES *et al.*, 2011).

Em plantas e algas os carotenóides são sintetizados nos cloroplastos e seu armazenamento ocorre somente quando elas são expostas a alguns fatores de estresse (LEMOINE & SCHOEFS, 2010). A estrutura de um carotenóide pode determinar, em parte, a função biológica do pigmento. Os carotenóides que contêm apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura são conhecidos como carotenos, já os derivados oxigenados são conhecidos como xantofilas (luteína, zeaxantina, violaxantina, etc.). Entre a grande diversidade de microalgas existentes, as espécies mais utilizadas como fonte de carotenóides são pertencentes aos gêneros *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Muriellopsis* e *Haematococcus* spp. todas dos quais pertencem à família Chlorophyceae (PULZ *et al.*, 2004). Elas tendem a acumular carotenóides como parte intrínseca da sua biomassa, oferecendo assim uma alternativa econômica à síntese química (BHOSALE *et al.*, 2005).

A produção de lipídios assim como a de carotenóides são influenciadas por diversos fatores ambientais (Fig. 2). O conhecimento e o controle dos fatores ambientais são extremamente necessários para o sucesso do cultivo e da produção de metabólitos de interesse.

Contudo, atualmente a biomassa microalgal não é viável economicamente para a produção de biocombustíveis, sendo necessário a valorização dessa biomassa. Compostos tais como os PUFA, carotenóides, antioxidantes entre outros poderiam valorizar a biomassa algal por serem bem cotados para os setores de alimentos, rações, cosméticos e indústrias médicas e, conseqüentemente, poderiam tornar o processo economicamente factível (VAN WAGENEN *et al.*, 2012).

Figura 2 - Diagrama esquemático mostrando impacto das pressões ambientais sobre a produção de lipídios e carotenóides



Fonte: MINHAS *et al.*, 2016, com modificações.

3 ARTIGO - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E CAROTENÓIDES DE DUAS MICROALGAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Este estudo foi desenvolvido com as cepas *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 e *Parachlorella kessleri* LAFIC-006 ambas isoladas de efluentes. Para o cultivo destas cepas, foram empregados quatro meios de cultura BBM, MAM, BG-11 e uma solução hidropônica comercial (NPK + micronutrientes). O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito dos meios de cultura no crescimento, na morfologia e na produção de lipídios neutros e carotenóides das duas espécies. A cepa *P. kessleri* apresentou maior produção de biomassa e lipídios neutros no meio BBM, o maior teor de carotenóides foi encontrado no meio alternativo NPK. A cepa *C. acidophila* apresentou maior produção de biomassa nos meios MAM e NPK, a maior produção de lipídios neutros e carotenóides foram verificados no meio MAM. Baseado na morfologia celular (por citometria de fluxo e microscopia de luz), as duas espécies apresentaram populações heterogêneas, apresentando diferenças entre os tratamentos em relação ao tamanho (SSC-A) e a complexidade (FSC-A) celular. O marcador Vermelho do Nilo foi eficiente para ambas as cepas para monitorar os lipídios neutros in vivo. Diante dos resultados, pode-se concluir que a solução hidropônica NPK pode ser utilizada como meio alternativo para produção de biomassa da cepa *C. acidophila* e para a produção de carotenóides da cepa *P. kessleri*.

3.1 INTRODUÇÃO

O potencial biotecnológico que algumas microalgas apresentam têm estimulado o interesse no conhecimento do seu metaboloma. Fontes de energia renovável como o biodiesel tem sido extensivamente investigada nos últimos anos (CHRISTI, 2007). Em relação aos lipídios, as microalgas têm uma série de características atraentes para apoiar o seu desenvolvimento como cultura, incluindo alta produtividade, curto ciclo de crescimento, utilização de terras não cultiváveis e a possibilidade de uso de fontes alternativas de água, incluindo água salgada e efluentes (WU *et al.*, 2012).

Um dos principais obstáculos do cultivo laboratorial e em massa de microalgas é o custo dos reagentes químicos necessários à preparação dos meios de cultivo. Assim, meios alternativos de baixo custo podem viabilizar a produção em larga escala (KOMOLAFE *et al.*, 2014).

A utilização de espécies com potencial para biorremediação pode ser um fator chave para reduzir os custos de produção. A possibilidade de associar o tratamento de efluentes com a obtenção de produtos com alto valor agregado como pigmentos, ácidos graxos, produção de biomassa para fins de bioenergia como biodiesel, entre outros, pode tornar a produção de microalgas em larga escala viável (CHISTI, 2007; DE JESUS TORRES *et al.*, 2014).

Para obter estratégias de produção adequada, o comportamento das espécies de microalgas particulares deve ser bem caracterizado sob diferentes condições de cultura. Estas características podem ser vantajosamente analisadas por métodos de citometria de fluxo (FCM) (COLLIER, 2000; SOSIK & OLSON, 2007; YENTSCH & YENTSCH, 2008). A detecção da produção de lipídios neutros é um desafio na pesquisa de biocombustível (LEE *et al.*, 1998). No entanto, a combinação de citometria de fluxo com um corante fluorescente como o Vermelho do Nilo é altamente eficaz para selecionar e isolar cepas de microalgas produtoras de lipídios neutros, requerendo pequenas quantidades de biomassa, além de ser uma análise rápida (MONTERO *et al.*, 2011; GUZMAN *et al.*, 2012; CIRULIS *et al.*, 2012; ROLEDA *et al.*, 2013; VELMURUGAN *et al.*, 2013; SATPATI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Cada espécie ou cepa pode apresentar requisitos nutricionais diferentes para o seu crescimento e produção de compostos, o que requer uma série de avaliações antes de escalonar os cultivos. Diante disso, neste trabalho foram avaliados o crescimento, a produção de biomassa seca, a morfologia e a produção de lipídios neutros e carotenóides totais de duas cepas *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 e *Parachlorella kessleri* LAFIC-006 em diferentes meios de cultura. As cepas foram isoladas de efluentes, indicando potencial adicional como biorremediadoras.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Microalgas e condições de cultivo

A cepa de *P. kessleri* foi isolada de um tanque de aeração da Estação Experimental de Tratamento de Esgoto (ETE) localizada na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). A cepa de *C. acidophila* foi isolada de uma lagoa de drenagem ácida de minas (DAM), localizado na região de Criciúma, Estado de Santa Catarina, região Sul do Brasil (Latitude 28°35'40.73"S, Longitude 49°27'37.98"W). Após o isolamento as cepas foram mantidas em laboratório sob condições controladas (irradiância de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

(lâmpada fluorescente), fotoperíodo de 12-12 h e temperatura de 22 ± 2 °C. A cepa *P. kessleri* LAFIC 006 foi mantida em meio BBM, com pH 6,5 e a cepa *C. acidophila* LAFIC 004 foi mantida em meio MAM, com pH 3,6. As cepas foram incluídas na coleção de microalgas do laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAFIC/UFSC).

3.2.2 Crescimento em diferentes meios de cultura

Foram avaliados quatro meios de cultura, sendo três deles comumente utilizados para cultivos laboratoriais de microalgas (Modified Acid Medium – MAM, Bold’s Basal Medium – BBM e Allen’s Blue-Green Algal Medium – BG-11) e um confeccionado com uma solução hidropônica comercial (NPK 8:9:9 - mais micronutrientes) (0,5g.L diluído em água destilada). Na tabela 1 é apresentada a composição de cada meio de cultura. Todos os meios foram preparados com água destilada, filtrados (filtro de fibra de vidro 0,4 μm de porosidade) em câmara de fluxo laminar sob radiação ultravioleta, tendo o pH ajustado para 7. Antes de iniciar os experimentos as cepas foram aclimatadas nos respectivos meios e condições de cultura por um período de 15 dias. Os testes foram realizados em cinco repetições para cada tratamento. O experimento foi realizado em frascos de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultura estéril e as culturas foram inoculadas com 20 mL de inóculo com aproximadamente (4×10^6 cel.mL⁻¹). Os cultivos foram desenvolvidos em frascos e mantidos em Shaker (120 rpm) com temperatura (22 ± 2 °C) e fotoperíodo (12:12h) controlados. Amostras de cada tratamento foram coletadas ao final do experimento (t14) para as análises morfológicas utilizando as técnicas de microscopia de luz (ML) confocal (MC), e citometria de fluxo. Também foram realizadas as quantificações dos carotenóides totais.

Tabela 3- Composição dos meios de cultura utilizados nos testes de crescimento das cepas *Chlamydomonas acidophila* LAFIC -004 e *Parachlorella kessleri* LAFIC 006.

Sal/elemento	BBM ^A (g.L ⁻¹)	MAM ^B (g.L ⁻¹)	BG-11 ^C (g.L ⁻¹)	NPK ^D (%)
Nitrogênio total	-	-	-	8
NaNO ₃	0,25	-	1,5	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,5	-	-
NaHCO ₃	-	-	0,4	-
CaCl ₂	0,025	0,01	0,144	-

Ca	-	-	-	3
MgSO ₄	0,075	0,5	0,3	-
Mg	-	-	-	1
K ₂ HPO	0,075	-	0,16	-
KH ₂ PO ₄	0,175	0,3	-	-
K ₂ O	-	-	-	9
P ₂ O ₅	-	-	-	9
NaCl	0,025	0,03	-	-
Na ₂ CO ₃	-	-	0,08	-
S	-	-	-	2
EDTA	-	0,4	0,002	-
Titriplex III	0,05	-	-	-
KOH	0,03	-	-	-
FeSO ₄	0,00498	0,00498	-	-
Citrato férrico	-	-	0,024	-
H ₃ BO ₃	0,01142	0,00286	0,00286	-
B	-	-	-	0,03
ZnSO ₄	8x10 ⁻⁶	0,00022	0,00022	-
MnCl ₂	1x10 ⁻⁶	0,00181	-	-
MoO ₃	7x10 ⁻⁷	-	-	-
CuSO ₄	1x10 ⁻⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁵	-
Cu	-	-	-	0,2
Co (NO ₃) ₂	4x10 ⁻⁷	4x10 ⁶	-	-
Co	-	-	-	0,005
CoCl ₂	-	-	-	-
Relação N:P	1,7:1	3,4:1	77:1	2:1
Forma do Nitrogênio	N-NO₃⁻	N-NH₄⁺	N-NO₃⁻	N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺
Concentração do N (µM)	2940	5878	17650	5714
Forma do Fósforo	P-PO₄⁻³	P-PO₄⁻³	P-PO₄⁻³	P-P₂O₅
Concentração do P (µM)	1718	1724	229	2903

Fonte: conforme ^ABISCHOFF, H. W & BOLD, H. C,1963, conforme ^BOLAVENSON, M.; STOKE, P. M, 1989. conforme ^CRIPPKA, 1979.

^DInformação fornecida pelo fabricante.

3.2.3 Taxa de crescimento, biomassa seca e pH

A biomassa algal e o pH foram estimados nos dias inicial, 1, 2, 3, 6, 10, e 14. O pH foi determinado por um pHmetro, a contagem celular dos cultivos foram realizadas em câmara de Neubauer utilizando

microscópio óptico (Leica DM 500), a taxa de crescimento exponencial (μ) foi calculada de acordo com a Eq. 1, onde De_0 é a densidade celular (células.mL⁻¹) o início da fase exponencial, De_f é a densidade celular no final da fase exponencial, e t é o tempo decorrido (dias) entre De_0 e De_f . Tempo de duplicação populacional (TD) foi calculado de acordo com a equação 2.

$$\mu = \frac{(\ln De_f - \ln De_0)}{t} \quad (1)$$

$$TD = t_f - t_0 \quad (2)$$

A estimativa da biomassa seca foi realizada no início e ao final de cada tratamento. A biomassa seca foi determinada por gravimetria, onde alíquotas de 30 mL no início (t_0) e final (t_{14}) do experimento foram filtradas através de filtros de fibra de vidro (Whatman® GF/C, 47 mm de diâmetro) previamente calcinados e pesados. Após a filtração os filtros foram secos em estufa a 60°C até obtenção de peso constante. O cálculo da biomassa seca ($P_{m\acute{a}x}$, g.L⁻¹.dia⁻¹) obtida segundo a equação (3) onde X_t é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t (dia), e X_0 a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t_0 (dia) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$P = (X_t - X_0)/(t) \quad (3)$$

3.2.4 Análises da morfologia celular

A morfologia celular foi analisada *in vivo* com auxílio de microscópio de epifluorescência (Olympus BX 41) e as células foram fotografadas com um sistema de captura de imagem (QCapture Pro Software 5.1). Para a visualização dos lipídios neutros, as amostras foram incubadas com Vermelho do Nilo - VN (9-dietilamino-5H benzo [α] fenoxazina-5-ona; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em DMSO (0,25 mg mL⁻¹). Dez μ L da solução estoque foram adicionados a 2 mL de suspensão celular e posteriormente agitados em vórtex e mantidos no escuro durante 30 min. A fluorescência do VN foi observada por microscopia de varredura a laser confocal (Leica DMI 6000 B), excitação laser de 470 nm com espectro de emissão 530-630 nm (SALTPATI & PAL, 2014). A autofluorescência do cloroplasto foi observada a 488 nm do laser de excitação com espectro de emissão de 650-750 nm (ZITTA *et al.*, 2013).

3.2.5 Detecção de lipídios neutros, tamanho e complexidade celular por citometria de fluxo

Suspensões de células dos diferentes tratamentos contendo 10^6 cel mL⁻¹ foram coradas com uma solução VN como descrito acima. A fluorescência foi lida usando uma excitação de 488 nm com um laser de Argon. O sinal de emissão foi medido em dois canais: fluorescência frontal (FSC Forward Scatter) e lateral (SSC Side Scatter), através do detector FITC (fluorescência verde; 530/40 nm) e PE (fluorescência laranja; 580/30 nm), indicativos de pigmentos (clorofila-a) e lipídios neutros, respectivamente, nas células coradas com VN. Uma amostra de suspensão de células, sem a adição do corante foi também analisada por citometria de fluxo para a identificação e caracterização das populações de células através de medidas de tamanho FSC (Forward Scatter) e complexidade SSC (Side Scatter) celular. A intensidade de fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias (u.a) e as imagens foram analisadas utilizando o software Flowing.

3.2.6 Carotenóides totais

As amostras (0,1g – massa seca liofilizada) foram homogeneizadas em 20 mL de metanol (100% P.A) e mantidas em repouso (30min) no escuro. Após foi colhido o sobrenadante e adicionado 20 ml de metanol sendo as amostras mantidas em repouso por 1 hora. Esse processo foi repetido por mais 2 vezes com repousos de uma hora cada até extrair o máximo de pigmentos da biomassa. O sobrenadante recolhido foi centrifugado por 10 min a 4,0 rpm, com esferas de vidro para auxiliar no rompimento da parede celular. Em pré-testes foram avaliados diferentes solventes para a extração, sendo que o metanol (P.A) mostrou o melhor rendimento para as duas cepas. Os carotenóides foram determinados por espectrofotometria UV-visível (SF200ADV, Bel), por medição da absorvância em 450nm (três leitura por amostra) (Multireader infinite M200, TECAN). A quantificação foi baseado na curva padrão de β -caroteno (Sigma) ($1-50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}; y-0,055x; r^2- 0,999$).

3.2.7 Análise estatística

Os testes de crescimento foram realizados com cinco repetições para cada tratamento. As médias e desvios-padrões foram calculados para todos os tratamentos. A comparação entre os tratamentos foram realizadas

por teste ANOVA ($p < 0,05$) e as diferenças significativas foram determinadas por uma análise de variância de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Taxa de crescimento, biomassa seca e pH de *P. kessleri* LAFIC-006 e *C. acidophila* LAFIC-004

A cepa de *P. kessleri* apresentou crescimento em todos os meios de cultura (Tab. 4). A taxa de crescimento e o tempo de duplicação não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos BBM, MAM e BG-11 (Tab. 4). A maior biomassa seca foi encontrada no tratamento com meio BBM (Fig.3a). Os meios BG-11 e MAM não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre si. O meio NPK foi o que apresentou a menor produção de biomassa seca. Em relação a variação do pH todos os meios de cultura apresentaram modificações ao final do experimento. Os meios BBM e BG-11 apresentaram um pH alcalino (10.2 e 8.3, respectivamente), o meio MAM chegou ao final do experimento com pH ácido de 3.2, e o meio NPK baixou o pH chegando ao final do experimento com pH 6.2 (Fig. 4a).

A cepa de *C. acidophila* apresentou crescimento em todos os tratamentos (Tab. 4). O maior crescimento foi observado nos meios de cultura MAM e NPK, já nos meios BBM e BG-11 a cepa apresentou baixo crescimento celular (Tab. 4). Em relação à taxa de crescimento e o tempo de duplicação os tratamentos MAM e NPK não apresentaram diferenças significativas entre si (Tab. 4). A maior produção de biomassa seca foi verificada nos meios MAM e NPK, não havendo diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) (Fig. 3b). O meio BG11 foi o que apresentou a menor biomassa seca (Fig. 3b). O pH apresentou mudanças em todos os tratamentos ao longo do experimento. Os meios BBM e BG-11 apresentaram pH alcalino ao final do experimento (9 e 8.1, respectivamente) e os meios MAM e NPK apresentaram pH ácido ao final do experimento (3.3 e 5.8, respectivamente) (Fig. 4b).

Tabela 4- Taxa de crescimento - μ (dia^{-1}), Tempo de duplicação (TD, dias) de *P. kessleri* LAFIC 006 e *C. acidophila* LAFIC 004, nos diferentes meios de cultura (14 dias de cultivo). Cada valor corresponde à média +- desvio padrão (n= 5). As letras na mesma linha indicam tratamentos significativamente diferentes, segundo o teste de múltipla comparação de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes entre si com $p < 0,05$).

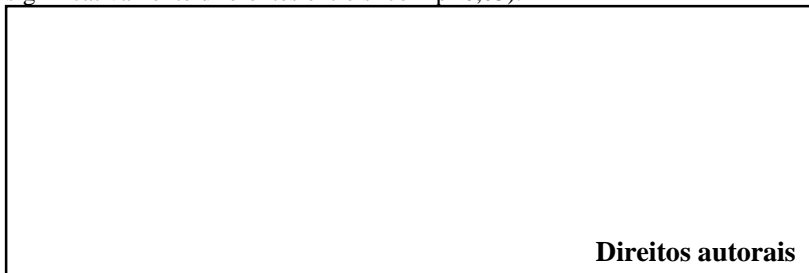


Figura 3- Biomassa seca (g.L^{-1}) da cepa *P. kessleri* LAFIC-006 (**a**) e *C. acidophila* LAFIC-004 (**b**), nos diferentes tratamentos com meio de cultura. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5).

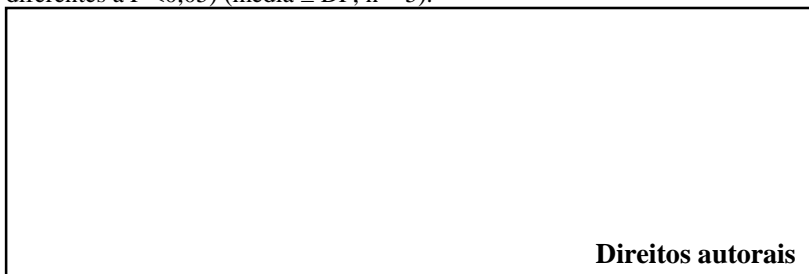
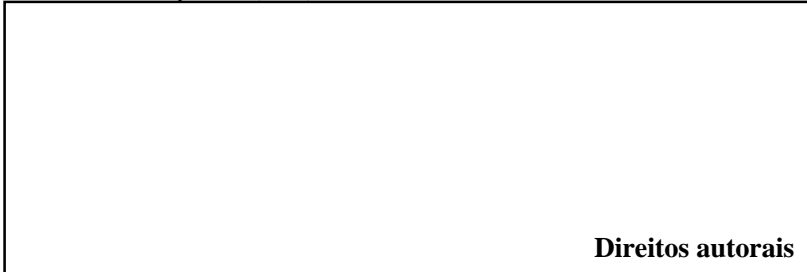


Figura 4- Variação do pH ao longo do tempo de crescimento das duas cepas avaliadas nos diferentes tratamentos com meio de cultura. (a) *Parachlorella kessleri* LAFIC-006 e (b) *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. Valores médios \pm desvio padrão (n= 5).



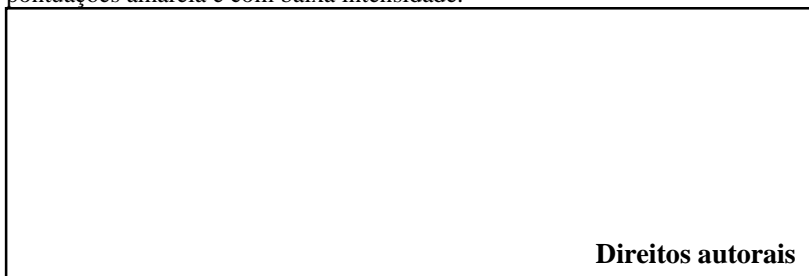
3.3.2 Análises da morfologia celular de *P. kessleri* LAFIC-006 e *C. acidophila* LAFIC-004

Quando analisadas por microscopia de luz, as células de *P. kessleri* apresentaram formas esféricas, com intensa coloração verde e regiões de vacúolo evidente no meio BBM (Fig. 5a). No tratamento com meio NPK, as células apresentaram alterações na forma e uma coloração esverdeada fraca (Fig. 5b). No tratamento BG-11, as células apresentaram uma cor esverdeada fraca, mas ainda com regiões vacuolizadas (Fig. 5c). Características semelhantes ao tratamento BBM também foram encontradas nas células tratadas com o meio MAM (Fig. 5d).

Em relação a autofluorescência dos cloroplastos é possível observar uma coloração vermelha intensa nas células crescidas no meio BBM, com estruturas dos cloroplastos intactos (Fig. 5e). No meio NPK (Fig. 5f), e BG-11 (Fig. 5g) as células mostraram pouca fluorescência. No meio MAM, a autofluorescência do cloroplasto foi intensa.

A fluorescência de coloração amarela marcado pelo corante Vermelho do Nilo foram visualizados no meio BBM com várias pontuações nas células (i), no meio NPK (j) e no meio BG-11 (k). No meio MAM houve uma diminuição dessas pontuações (l).

Figura 5- Aspecto das células *P. kessleri* LAFIC-006, sob diferentes meios de cultivo. Microscopia de Luz (**a-d**); Confocal de varredura a laser da autofluorescência dos cloroplastos (**e-h**) e marcados com Vermelho do Nilo (**i-l**). As células apresentaram intensa coloração verde, com regiões de vacúolo evidente no meio BBM (**a**) no meio NPK, as células apresentaram alterações na forma e uma coloração esverdeada fraca (**b**). No meio BG-11 as células apresentaram uma cor esverdeada fraca, mas ainda com regiões vacuolizadas evidente (**c**). No meio MAM as células apresentaram intensa coloração verde, com regiões de vacúolo evidente (**d**). A autofluorescência dos cloroplastos (vermelho) nos meios BBM e MAM mostraram intensa fluorescência com a estrutura dos cloroplastos intactos (**e,f**). Nos tratamentos BG-11, NPK as células mostraram pouca fluorescência (**g,h**). Para a coloração com vermelho do Nilo (amarela), BBM (**i**), NPK (**j**) e BG-11 (**k**) foram as células que apresentam pontuações amarela. No meio MAM (**l**) as células apresentaram poucas pontuações amarela e com baixa intensidade.



Direitos autorais

Quando analisadas por microscopia de luz, as células de *C. acidophila* apresentaram formato oval e intensa coloração verde, com regiões do vácuolo evidente no meio MAM (Fig. 6a) e no meio BBM (Fig. 6b). No no meio BG-11 (Fig. 6c) e NPK (Fig. 6d) as células apresentaram uma coloração esverdeada mais fraca.

A autofluorescência dos cloroplastos visualizados em coloração vermelha foram intensas nos meios MAM (Fig.6e) e BBM (Fig.6f) com estruturas dos cloroplastos intactos. Nos meios BG-11 (Fig.6g) e NPK (Fig.6h) as células apresentam pouca fluorescência, mas com estruturas dos cloroplastos visíveis. A fluorescência de coloração amarela marcado pelo corante Vermelho do Nilo foi visualizado no meio MAM (Fig. 6i), BBM (Fig.6j) e BG-11 (Fig. 6k) com várias pontuações de coloração intensa. No meio NPK (Fig. 6l) houve uma diminuição das pontuações com baixa intensidade na fluorescência.

Figura 6- Aspecto das células *C. acidophila* LAFIC-004, sob diferentes meios de cultivo. Microscopia de Luz (a-d); Confocal de varredura a laser da autofluorescência dos cloroplastos (e-h) e marcados com Vermelho do Nilo (i-l). Nos meio MAM (a) e BBM (b), as células apresentaram forma oval com intensa coloração verde e com regiões de vacúolo visível. No meio BG-11 (c) e NPK (d) as células apresentaram uma coloração esverdeada mais fraca. A autofluorescência dos cloroplastos (vermelho) foram intensas nos meios MAM (e) e BBM (f). Nos meios BG-11 (g) e NPK (h) as células apresentaram pouca fluorescência. Para a coloração com vermelho do Nilo (amarela), os meios MAM (i), BBM (j) e BG-11 (k) foram as células que apresentam várias pontuações amarela (pontas de seta) com intensa coloração. No meio NPK (l) há uma diminuição dessas pontuações com baixa intensidade na coloração .

Direitos autorais

3.3.3 Detecção de lipídios e caracterização da população celular analisada por citometria de fluxo

Medidas de dispersão de luz FSC-A (tamanho) vs. SSC-A (complexidade) de células de *P. kessleri* LAFIC-006 e *C. acidophila* LAFIC-004 nos diferentes meios de cultivo são apresentadas nas Figuras 7 e 8. As populações de ambas as cepas apresentaram características heterogêneas em todos os meios de cultura, com células de diversos tamanhos (Fig. 7). Em relação aos parâmetros avaliados, houve diferença entre os meios de cultura (Fig. 8). Para a cepa *P. kessleri*, o FSC-A e SSC-A no meio MAM apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparado aos demais meios de cultura, apresentando maior quantidade de células de tamanho maior e com alta complexidade (Fig. 8 a, b). Para a cepa *C. acidophila* no parâmetro FSC-A a maior intensidade de fluorescência foi detectada no meio MAM (Fig.8c). Em relação ao parâmetro SSC-A a cepa apresentou maior intensidade de fluorescência no meio NPK (Fig.8d).

Figura 7- Gráficos de Dispersão das populações celulares – FSC-A (tamanho celular) x SSC-A (complexidade celular) de *P. kessleri* e *C. acidophila* nos tratamentos com meio de cultura MAM, BBM, BG-11 e NPK.



Figura 8- Parâmetros de citometria de fluxo de células de *P. kessleri* FSC, SSC (a,b) e *C. acidophila* FSC, SSC (c,d) - FSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se ao tamanho das células); SSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se à complexidade celular). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 5$).



O marcador VN foi eficiente para marcar os lipídios neutros (canal PE-A -580/30 nm) nas duas cepas. Para *P. kessleri* houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos em relação aos lipídios neutros (Fig. 9a), no tratamento BBM a cepa apresentou maior intensidade de fluorescência, já nos tratamentos MAM e BG-11 a cepa apresentou a menor intensidade de fluorescência. A maior autofluorescência da cepa foi apresentado no meio MAM (Fig.9b).

Para *C. acidophila* também houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos em relação aos lipídios neutros, no meio MAM a cepa apresentou maior intensidade de fluorescência, já no tratamento NPK a cepa apresentou a menor intensidade de fluorescência (Fig. 9c). A

autofluorescência da cepa foi maior nos tratamentos BBM e MAM não havendo diferença significativa entre si ($P < 0,05$) (Fig.9d).

Figura 9- Citometria de fluxo de células de *P. kessleri* (a,b) e *C. acidophila* (c,d) - PE-A vermelho do Nilo (VN) (células marcadas com o VN - sinal de fluorescência 580/30nm - referindo-se a lípidos neutros), PE-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 580 / 30nm), FITC-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 530 / 40nm); nos seguintes tratamentos: meio de cultura BBM, MAM, BG-11 e NPK. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5).

Direitos autorais

3.3.4 Carotenóides totais

As duas cepas apresentaram diferenças significativas no teor de carotenóides totais em todos os tratamentos. A cepa *P. kessleri* apresentou maior teor de carotenóides no meio NPK. A cepa *C. acidophila* apresentou maior teor de carotenóides no meio MAM (Tabela 5). Ambas as cepas apresentaram o menor teor de carotenóides no meio BG-11 (Tabela 5).

Tabela 5 - Carotenóides totais de *P. kessleri* e *C. acidophila*, nos diferentes tratamentos com meio de cultura (MAM; BBM; BG-11 e NPK) Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n= 4). As letras na mesma linha indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de múltipla comparação de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes entre si com $p < 0,05$).

Direitos autorais

3.4 DISCUSSÃO

Existem diversos meios de cultura elaborados para se adaptar às necessidades nutricionais das microalgas, entretanto, a taxa de crescimento, produtividade e a produção de metabólitos são influenciadas pela adaptação da espécie/cepa e das condições ambientais (temperatura, pH, luz, etc) no meio de cultivo. No presente estudo parâmetros morfológicos, de crescimento e produção de lipídios neutros e carotenóides das cepas *Parachlorella kessleri* e *Chlamydomonas acidophila* foram avaliados em quatro diferentes meios de cultura.

A cepa *P. kessleri* LAFIC 006 apresentou maior produção de biomassa e de lipídios neutros no meio BBM, que se caracteriza por apresentar alta concentração molar de P em relação a N (razão molar N:P = 1,7:1). A explicação mais provável para esse resultado deve ser o fato de a cepa estar há muito tempo aclimatada a este meio de cultura, o que demandaria tempo equivalente para a mesma mostrar maior crescimento com outros meios, mesmo que estes apresentassem composição mais adequada. Muitos trabalhos apontam que a melhor condição para o armazenamento de um composto nem sempre está relacionado a melhor condição de crescimento (MINHAS *et al.*, 2016). Às vezes é necessário um fator de estresse para aumentar a produção de compostos como lipídios ou carotenóides, no entanto, esse estresse pode afetar o crescimento da cepa. Para contornar esse problema, cultivo em dois estágios tem sido realizado como estratégia para obtenção de maiores teores de lipídios e carotenóides, onde em um primeiro momento é priorizado a produção de biomassa utilizando meio de cultivo com

nitrogênio. Em um segundo momento é reduzido ou retirado o nitrogênio do meio de cultura para estimular a produção de lipídios e/ou carotenóides (MARKOU *et al.*, 2013; MINHAS *et al.*, 2016). A deficiência do nitrogênio no meio de cultura faz com que ocorra maior acúmulo de substâncias de reserva como lipídios, carotenóides ou carboidratos dependendo da espécie/cepa (MINHAS *et al.*, 2016). Neste estudo nenhum dos outros meios testados apresentam concentrações relativa de N menor que o meio BBM, inclusive, em termos de concentração total de N o BBM é o mais pobre deles. Uma possibilidade a ser testada com a cepa *P. kessleri* seria o cultivo em dois estágios, utilizando na fase de estresse o meio BBM com redução ou mesmo eliminação do N. O momento de fazer essa mudança de estágio poderia ser definida em função do pH, que chegou a 10 no décimo dia de cultivo coincidindo com a estabilização do crescimento da cepa ($0,472 \text{ dias}^{-1}$). No meio BG-11 a cepa *P. kessleri* LAFIC 006 apresentou a menor produção de carotenóides e lipídios neutros. Esse resultado pode ser explicado pelas características desse meio de cultura, que possui uma baixa concentração absoluta de P e uma alta concentração de N em sua fórmula (razão molar N: P = 77:1), sendo um meio indicado para produção de biomassa para diversas microalgas. Um crescimento balanceado e acelerado de biomassa não favorece o armazenamento de lipídios e carotenóides, que tendem a se acumular mais em condição de carência de alguns nutrientes (MINHAS *et al.*, 2016). LI *et al.*, (2013) verificaram que *P. kessleri* aumentou significativamente o teor de lipídios (de 10% para 60% de biomassa seca) quando cultivadas na ausência ou redução da concentração de nitrogênio ou fósforo ou enxofre no meio de cultura. Resultados semelhantes foram verificados para a cepa *Chlorella minutissima* que aumentou o teor de lipídios com a redução do nitrogênio no meio de cultura (ÖRDÖG *et al.*, 2012).

No meio MAM *P. kessleri* LAFIC 006 apresentou taxa de crescimento, produção de biomassa seca, carotenóides e lipídios neutros semelhante ao meio BG-11. Esses meios apresentam características nutricionais bem diferentes, mostrando que a cepa possui a capacidade de se desenvolver frente às diferentes condições nutricionais e em uma ampla faixa de pHs. Essa plasticidade que a cepa apresenta é uma característica importante quando se pensa em utilizar diferentes estratégias para otimizar a produção de metabólitos. O meio MAM possui como única fonte de N, o amônio (N-NH_4^+), que tem como característica acidificar o meio de cultura mesmo com o crescimento ativo da microalga. Essa característica tem sido utilizada como medida de controle de possíveis competidores. O amônio no meio de cultura é importante não

só por ser o elemento primário na síntese metabólica da alga, como também, apresenta vantagem sobre o nitrato e o nitrito, não precisando de redução para sua assimilação, sendo portanto, energeticamente mais econômico (ILLMAN *et al.*, 2000). A acidificação que ocorreu no cultivo durante o experimento com meio MAM, poderia ter limitado a sobrevivência da cepa, induzindo o armazenamento de maiores teores de lipídios e/ou carotenóides. Entretanto, não foi o que aconteceu, indicando que a cepa se adaptou bem e desenvolveu crescimento balanceado e sem limitações severas, direcionando a maior parte de sua energia para o crescimento.

No meio elaborado com a solução hidropônica NPK a cepa *P. kessleri* LAFIC 006 apresentou baixo crescimento e produção de biomassa seca quando comparado aos demais meios de cultura, entretanto, apresentou o maior teor de carotenóides totais. O teor de carotenóides encontrado neste meio está de acordo com o conteúdo encontrado para microalgas (0,1 a 0,2 % da biomassa seca) (SPOLAORE *et al.*, 2006). Dentro do gênero *Chlorella* o conteúdo de carotenóides é bem variado entre as espécies, *Chlorella pyrenoidosa* (0,051% - 0,35%), *Chlorella sp* (0,02% - 0,2%), *Chlorella minutissima* (0,3%) (BAI *et al.*, 2011). Os nutrientes que compõem o meio NPK não apresentam alto grau de pureza como nos demais meios de cultura testados. Além disso, apresenta deficiência em alguns nutrientes como o ferro que é um nutriente importante por atuar como cofator enzimático (GAYLARDE *et al.*, 2005). Essas características do meio podem ter contribuído para o maior armazenamento de carotenóides da cepa *P. kessleri*.

Em relação à cepa *C. acidophila* o melhor crescimento, produção de biomassa seca, lipídios neutros e carotenóides foram verificados no meio MAM, que também é o meio onde a cepa estava aclimatada a longo tempo. O teor de carotenóides também está dentro da faixa encontrada pelas microalgas, contudo, para a espécie *C. acidophila* já foi reportado 1,56% de carotenóides (CUARESMA *et al.*, 2006). O pH do meio MAM foi reduzido significativamente, de pH 7 (inicial) para pH 3 (final). O sulfato de amônio presente nesse meio como única fonte de nitrogênio pode ter corroborado com a redução do pH. Como foi verificado nos resultados, trata-se de um meio que, mesmo manipulado, tende a acidificar-se com o tempo, apesar do crescimento algal, pois foi justamente desenvolvido para microalgas acidofílicas.

No meio com a solução hidropônica NPK a cepa *C. acidophila* apresentou taxa de crescimento e produção de biomassa seca semelhante ao meio MAM, mostrando versatilidade para crescimento em meios alternativos e com grau de pureza baixo. O pH desse meio chegou ao final

do experimento próximo à neutralidade, indicando boa tolerância da cepa a uma ampla faixa de pHs.

Nos meios BBM e BG-11 a cepa *C. acidophila* apresentou taxa de crescimento inferior aos demais meios de cultura. A produção de lipídios neutros assim como carotenóides também foi inferior, mostrando que esses meios não são os mais adequados entre os demais meios testados para produção de biomassa e dos compostos analisados. Provavelmente a forma diferente do N e o pH mais alcalino sejam fatores determinantes desse resultado negativo.

A observação dos parâmetros citométricos SSC-A (tamanho) e FSC-A (complexidade) relacionados a morfologia das células, evidenciou uma clara heterogeneidade das populações celulares para ambas as cepas em todos os tratamentos. Essa heterogeneidade pode estar relacionada à fase de crescimento exponencial que ambas as cepas se encontravam, esta fase é marcada por intensa divisão celular, com células em diferentes estágios de desenvolvimento. É comum a ocorrência de células de diversos tamanhos e tipos (células adultas, autósporos) em populações de *Chlorella* spp. e *Parachlorella* spp., ambas representantes da classe Trebouxiophyceae, assim como a formação de aglomerados com até mais de 60 células (SAFI *et al.*, 2014). Similarmente, em *C. acidophila*, a provável explicação da heterogeneidade morfológica refere-se ao ciclo de vida do gênero, relativamente complexo, com ocorrência simultânea de células adultas, gametas, zigotos, zoósporos etc. na mesma população (HARRIS, 2009). Esta heterogeneidade já foi reportada para esta cepa (SOUZA *et al.*, 2016). Adicionalmente percebe-se uma influência dos meios de cultura sobre esses parâmetros, o que indica por um lado a eficiência da técnica de citometria para detectar variações morfológicas e por outro lado o grau de sensibilidade que a variação nutricional proporcionou às populações celulares na morfofisiologia.

A técnica de citometria de fluxo somada ao marcador Vermelho do Nilo (VN) para detecção preliminar de lipídios neutros foi eficiente para as duas cepas, permeando todas as estruturas dentro das células, emitindo uma fluorescência amarelo-ouro na presença de lipídios neutros. O corante VN associado à citometria de fluxo permitiu monitorar o teor de lipídios neutros das células nos diferentes tratamentos. A técnica permitiu ainda identificar células individuais com diferentes características (tamanho, granulidade) e monitorar o estado fisiológico, a homogeneidade das culturas celulares. A técnica de citometria de fluxo mostrou vantagens nítidas comparativamente com as técnicas tradicionais, principalmente por possibilitar o processamento de um número elevado de amostras.

Conclui-se que os meios de cultura interferem na taxa de crescimento, produção da biomassa seca, lipídios neutros e carotenóides de *P. kessleri* e *C. acidophila*. Ambas as cepas apresentam tolerância a uma ampla faixa de pHs. A cepa *P. kessleri* apresentou a melhor produção de biomassa seca e intensidade de fluorescência de lipídios neutros no meio BBM, a produção de carotenóides foi maior no meio NPK. Os meios MAM e NPK proporcionaram a maior produção de biomassa seca para a cepa *C. acidophila*, entretanto, foi no meio MAM que a cepa apresentou a maior intensidade de fluorescência de lipídios neutros e teor de carotenóides totais. As populações celulares das duas cepas apresentaram características heterogêneas com células de vários tamanhos e complexidade. A técnica de citometria de fluxo associada ao corante VN para avaliar indiretamente o conteúdo celular de lipídios neutros das duas cepas mostrou-se eficaz, podendo ser uma metodologia utilizada para selecionar populações hiper-produtoras, minimizando, assim, os custos prospecção. Por fim, as duas cepas apresentaram características importantes no ponto de vista biotecnológico, apresentando rusticidade (baixa exigência) e plasticidade para crescer em meio de cultivo alternativo.

4 ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DA CEPA PRODUTORA DE LIPÍDIOS *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 (CHLOROPHYTA) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA.

Chlamydomonas acidophila LAFIC-004 é uma microalga verde acidófila isolada a partir do efluente de mineração de carvão. No presente trabalho, esta cepa foi cultivada em meio ácido (pH 3,6), sob condições fototrófica, mixotrófica, e heterotrófica para determinar a melhor condição de crescimento e produção de lipídios, simultaneamente, avaliar as possíveis alterações morfológicas e ultra-estruturais nas células. Nos tratamentos heterotrófico e mixotrófico, duas fontes de carbono orgânico foram testados: 1% de glicose e 1% de acetato de sódio. O teor de lipídios e o perfil de ácidos graxos foram determinados apenas em condição fototrófica. A maior taxa de crescimento foi verificada em condição fototrófica, variando 0,18-0,82 dia⁻¹. A glicose não resultou em aumento significativo nas condições de crescimento mixotrófica ou heterotrófica e o acetato mostrou ser tóxico para a cepa em ambas as condições. O teor de óleo sob condição fototrófica foi de 15,9% em fase de crescimento exponencial aumentando para 54,63%, na fase estacionária. Baseado na morfologia celular (por citometria de fluxo e microscopia de luz) e ultraestrutura (Microscopia Eletrônica de Transmissão), características semelhantes foram observadas entre as condições fototrófica e mixotrófica com glicose, evidenciando muitos corpos lipídicos, grânulos de amido e intensa fluorescência. De acordo com as condições testadas, os regimes mixotrófico e heterotrófico não resultaram em aumento da fluorescência de lipídios neutros. Pode-se concluir que a cepa é uma promissora produtora de lipídios quando crescida até a fase estacionária, em meio ácido e sob condição fototrófica, apresentando um perfil de ácidos graxos adequados para a produção de biodiesel. A capacidade de crescer esta cepa em resíduos de mineração ácidas sugere um potencial de biorremediação com a produção de biomassa útil.

4.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são microorganismos fotossintéticos de rápido crescimento, capaz de gerar biomassa rica em vários metabólitos primários, tais como proteínas e lipídios, bem como metabólitos secundários, com uma ampla gama de aplicações. A elevada quantidade e a qualidade de algumas destas moléculas têm estimulado a produção de

produtos de alto valor, incluindo saúde alimentar humana, alimentos para animais, biocombustíveis, produtos de química fina e produtos farmacêuticos (SPOLAORE *et al.*, 2006; BUX, 2013; RICHMOND & HU, 2013).

Um dos mais promissores usos de biomassa de microalgas é a produção de biocombustíveis. Isto pode ser conseguido de três maneiras gerais: (1) produção direta de microalgas para recuperar moléculas de combustível (por exemplo, etanol, hidrogênio e alcanos), sem a necessidade de extração, (2) processo total da biomassa de microalgas para a produção de combustível, e (3) a produção de extratos de microalgas para gerar moléculas de combustível (USDOE, 2010). No terceiro caso, os lipídios são o tipo principal de moléculas de prospecção, e podem ser utilizados como biodiesel por meio de transesterificação (CHISTI, 2007). Os grupos de microalgas mais importantes como fonte de lipídios são as clorofíceas e as diatomáceas (SHEEHAN *et al.*, 1998). Os níveis de lipídios dessas microalgas são cerca de 30%, mas o rendimento pode ser aumentado em algumas espécies por meio da manipulação de condições ambientais, especialmente através da imposição de estresse, tais como a restrição de nutrientes, mudanças na temperatura (baixa, alta), na salinidade e pH, luz ou radiação UV (baixa, alta), entre outros (SHARMA *et al.*, 2012).

A produção em massa de biomassa de microalgas é, em parte, limitada pela sensibilidade de diversas espécies às variações ambientais e competição com espécies invasoras, que diminui a produtividade de processamento de algas comerciais. Dentro deste sentido, as microalgas extremófilas (por exemplo, acidófilas) têm ganhado interesse devido à sua capacidade de crescer em condições extremas, excluindo eventuais contaminantes, produzindo compostos de alto valor, enquanto age como remediadora de efluentes (por exemplo, na absorção / adsorção de metais pesados) (INTHORN, 2001; EIBL *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2015; VARSHNEY *et al.*, 2015).

Os grupos de microalgas são caracterizados pela alta diversidade morfofisiológica e bioquímica. Apesar de serem preferencialmente fototróficas, algumas espécies de microalgas são capazes de crescer na ausência de luz, consumindo moléculas orgânicas solúveis, tais como açúcares, ácidos orgânicos, e acetato (heterotrofia). No regime mixotrófico, CO₂ e carbono orgânico são assimilados, e ambos os metabolismos, heterotrófico e fotossintético, operam simultaneamente (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

De fato, vários autores relataram recentemente um aumento significativo na biomassa, nos carboidratos e no teor de lipídios de

algumas espécies de microalgas sob condições mixotrófica e heterotróficas quando comparado com a condição fototrófica (por exemplo, LIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; GIOVANARDI *et al.*, 2013; LIANG, 2013; LIU *et al.*, 2014; RATTANAPOLTEE & KAEWKANNETRA, 2014). Nesse caso, a maior produção de lipídios não está relacionada ao estresse, mas ao efeito da fonte de carbono orgânico (por exemplo, glicose) no Ciclo de Calvin, levando a um consumo menor de co-factores (por exemplo, ATP) e a uma formação mais econômica de acetil-CoA, o precursor dos ácidos graxos (XIONG *et al.*, 2010). Portanto, a capacidade para as microalgas crescerem em condições extremas e sob condições heterotrófica ou mixotrófica representa uma linha de pesquisa estratégica.

Em algas e plantas, a síntese de novo de lipídios utiliza moléculas de carbono fotossinteticamente fixo como substrato (ex., 3-fosfoglicerato). Dois grandes grupos de lipídios são sintetizados nas células: polares e neutros. Os lipídios polares são os principais componentes de membranas biológicas, e os lipídios neutros são compostos ricos em energia, muitas vezes armazenados em corpos lipídicos citosólicas que consistem em triacilglicerídeos (TAG), esteróis, ésteres, monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG) (HARWOOD & JONES, 1989; LI *et al.*, 2010; RADA KOVITS *et al.*, 2010).

A detecção da produção de lipídios neutros é um desafio em pesquisas de biocombustível (LEE *et al.*, 1998). No entanto, a combinação da citometria fluxo com um corante fluorescente é altamente eficaz para selecionar e isolar rapidamente cepas de microalgas altamente produtoras de lipídios neutros com pequenas quantidades de biomassa requerida (MONTERO *et al.*, 2011; GUZMAN *et al.*, 2012; CIRULIS *et al.*, 2012; ROLEDA *et al.*, 2013; VELMURUGAN *et al.*, 2013; SALTPATI & PAL, 2014; WU *et al.*, 2014).

Conhecer o metabolismo das espécies e cepas de microalgas é fundamental para o êxito do desenvolvimento do cultivo e processos de produção (TRAINOR, 2009). Contudo, dados sobre a formação e mobilização de corpos lipídicos ao nível subcelular e regulação desses processos ainda são escassos (PŘIBYL *et al.*, 2012). Portanto, para expandir esse conhecimento no presente estudo, microscopia de luz, confocal, e eletrônica de transmissão, bem como a citometria de fluxo foram utilizados para caracterizar as respostas fisiológicas e morfológicas da cepa produtora de lipídios *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 cultivada sob condições fototrófica, mixotrófica e heterotrófica. Com base de dados da literatura, nossa hipótese é que esta cepa acidófila pode

crescer melhor nas condições mixotrófica e heterotrófica do que em condição fototrófica, aumentando seu conteúdo de lipídios.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Cepa de microalga e condições de cultura

A cepa acidofílica *C. acidophila* LAFIC-004 foi isolada a partir da drenagem ácida de Minas (DAM), na região de Criciúma do Estado de Santa Catarina no Sul do Brasil (Latitude 28 ° 35'40.73 "S, longitude 49 ° 27'37.98" W) e mantida na Coleção de Culturas de Microalgas do Laboratório de Ficologia (CCM-LAFIC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A cepa foi cultivada em meio ácido modificado (MAM, Olavenson e Stoke 1989), pH 3,6, irradiância de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes), fotoperíodo (12-12h), e temperatura de 22 ± 2 ° C.

A formulação do MAM foi (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.3, NaCl 0.03, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.01, (em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.98, H_3BO_3 2.86, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81, $\text{ZnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.22, $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0494, biotina 1.0, B_{12} 10.0, e tiamina 20.0. O pH foi ajustado para 3,6 com ácido sulfúrico. Estas condições de cultivo foram definidas como a condição padrão de cultura para a cepa.

4.2.2 Padrão de crescimento de *C. acidophila* LAFIC-004 em diferentes condições de cultura

Diversos experimentos de crescimento foram realizados com *C. acidophila* LAFIC-004 para avaliar o tempo das fases de crescimento (exponencial e estacionária, bem como a taxa de crescimento exponencial) sob condições fototróficas padrão, e para gerar biomassa para as análises de lipídios. Esses experimentos foram conduzidos em três a cinco repetições, em frascos de 250 ml ou 5000 ml com 10% v / v de inóculo em fase de crescimento exponencial da cultura da cepa. Durante o período de crescimento, a partir dos frascos, amostras foram recolhidos a cada 1 a 3 dias para contagem de células em câmara de Neubauer. As fases exponencial e estacionária foram definidas visualmente pela curva de crescimento. A taxa de crescimento exponencial (μ) foi calculada de acordo com a Eq. 1, onde De_0 é a densidade celular (células. mL^{-1}) no início da fase exponencial, Def é a densidade celular no final da fase exponencial, e t é o tempo decorrido (dias) entre De_0 and Def .

$$\mu = \frac{(\ln D_{e_f} - \ln D_{e_0})}{t} \quad (1)$$

4.2.3 Crescimento de *C. acidophila* LAFIC-004 em diferentes condições

Foram realizados experimentos para avaliar os cultivo e comparar as características de crescimento da cepa sob condições fototrófica, mixotrófica e heterotrófica. As condições de cultivo foram: (a) fototrófico (Foto), condição padrão descrito acima; (b) mixotrófico com 1% de glicose (Mix-Glu); (c) mixotrófico com 1% de acetato (Mix-Acet); (d) heterotrófico com 1% de glicose (Het-Glu); e (e) heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet). Os testes foram realizados em triplicata usando frascos de 250 mL contendo 150 ml de meio de cultura estéril e 10 mL de inóculo axênico com densidade celular de aproximadamente 4×10^6 cel.mL⁻¹. Os frascos do tratamento mixotrófico foram expostos ao mesmo fotoperíodo e irradiância descrita na condição fototrófica. Frascos do tratamento heterotrófico foram selados com papel alumínio. Todos os cultivos foram iguais a condição padrão já descrita. As concentrações de glicose e de acetato foram utilizadas segundo MOON *et al.*, (2013).

Em cada frasco, foi determinada a densidade celular em camara de Neubauer no tempo (D_0) e ao final da suposta fase exponencial (D_f), tal como definido nos experimentos iniciais de crescimento sob condição fototrófica (veja acima). A relativa taxa de crescimento foi gerada pelo aumento da porcentagem da densidade celular

(Cel.mL⁻¹) ao longo do tempo de incubação, de acordo com a Eq. 2, onde D_0 é a densidade de células no momento inicial, D_f é a densidade celular ao final e T_e é o tempo decorrido (dias). Esta equação foi modificado por KAIN (1987) e é normalmente usada em estimativa das taxas de crescimento de macroalgas utilizando o peso seco, mas foi aqui adotada para a utilização da densidade celular de microalgas, substituindo a equação de crescimento exponencial, essencialmente porque os dados de densidade de células estavam disponíveis apenas no início e no fim da experiência. Gerar uma curva de crescimento com dados diários é difícil em culturas axênicas por causa da exigência de remoção diária para amostragem que poderia causar contaminação.

$$\% \text{ incremento} = 100[(D_f/D_0)^{1/t} - 1] \quad (2)$$

Amostras dos tratamentos Foto, Mix-Glu, Het-Acet, e Het-Glu foram coletadas no final do experimento para as análises morfológicas

por citometria de fluxo (tamanho, complexidade, e a presença de lipídios neutros), microscopia de luz (ML), microscopia confocal (MC), e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O tratamento Mix- Acet não apresentou crescimento, tornando impossível a realização dessas análises.

4.2.4 Extração de lipídios e análise de ácidos graxos

O teor de óleo e o perfil de ácidos graxos foram determinados na condição fototrófica padrão descrito acima. As análises foram realizadas na fase de crescimento exponencial e estacionária, tal como definido de acordo com as curvas descritas na seção “Padrão de crescimento de *C. acidophila* LAFIC-004 em diferentes condições de cultura”. A extração e a determinação do teor de lipídios foram realizadas por gravimetria de acordo com a método de BLIGH & DYER (1959), utilizando 1 g de biomassa liofilizada. A análise foi realizada em triplicata. Os óleos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) por aquecimento com $\text{BF}_3\text{-MeOH}$, tal como recomendado pela metodologia padrão AOCS (CHRISTIE, 1989). Os ésteres foram extraídos com heptano e secou-se sobre Na_2SO_4 anidro. A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo a gás (CG) Shimadzu QP 2010 plus, equipado com um injetor automático COA 20i acoplado a espectrometria de massa (CG-EM). O método utilizado foi AOCS Ce 1c-89 (AOCS 2006). As condições de aquecimento das ms DB5 coluna (30 m x 0,25 mm x 0,25 um) foram 150 ° C (0,1 min) aquecimento a 250 ° C (3 ° C.min⁻¹) e, em seguida, continuando o aquecimento a 30 ° C.min⁻¹ a 300 ° C. No detector de massa, a temperatura da fonte de ionização (impacto electrónico, EI) e a temperatura da interface foram 280 ° C. O sistema de injeção foi usada no modo de divisão (1:5) a 250 °C, e o detector de massa foi mantido no modo de varredura. Hélio foi utilizado como o portador de gás a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os padrões de éster metílico (Sigma ©) foram injetadas juntamente com as amostras, em triplicata, em alíquotas de 1 µL.

4.2.5 Análise da morfologia celular

Para a análise da morfologia celular, amostras vivas foram analisadas e fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX 41 equipado com um software 5.1 Pro Qcapture do sistema de captura de imagem. Para visualização dos lipídios neutros, as amostras foram incubadas com vermelho do Nilo - VN (9-diethylamina- 5Hbenzo

[α] fenoxazina-5-ona; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluídos em DMSO ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$). Dez microlitros da solução estoque foram adicionados a 2 ml da suspensão de células, misturada por agitação em vórtex e, em seguida, mantidos no escuro durante 30 min. A fluorescência do VN foi observada sob microscopia confocal de varredura a laser (Leica DMI 6000 B) em 470 nm, excitação com espectro de emissão de 530-630 nm (SALTPATI & PAL, 2014). A autofluorescência dos cloroplastos foram observadas com laser a 488 nm de excitação com espectro de emissão de 650-750 nm (ZITTA *et al.*, 2013). Foram observadas e fotografadas de uma a três lâminas de microscópio de cada tratamento (replicata), totalizando 300 a 800 células analisadas de cada frasco.

4.2.6 Detecção de lípidos, tamanho celular e complexidade por citometria de fluxo

Suspensões de células de diferentes tratamentos contendo 10^6 cel.mL^{-1} foram coradas com solução de VN de forma igual ao descrito acima para a morfologia das células. A fluorescência foi obtida usando uma excitação de 488 nm com um laser de argônio. O sinal de emissão foi medido em dois canais sob excitação: fluorescência frontal (FSC - Forward Scatter) e lateral (SSC- Side Scatter) através de detectores FITC (fluorescência verde; 530/40 nm) e PE (laranja fluorescência; 580/30 nm), indicativo de pigmentos (carotenóides, clorofila) e lipídios neutros, respectivamente, nas células coradas com VN. Uma amostra de suspensão celular sem a adição do corante

VN também foi analisada no citometro de fluxo para identificação e caracterização das populações de células através de medidas de tamanho FSC (Forward Scatter) e complexidade SSC (Side Scatter). Para cada caso, foram analisadas 200.000 células automaticamente pelo equipamento. A intensidade de fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias (u.a), e as imagens foram analisadas utilizando o software flowing ver. 2.5.1.

4.2.7 Análise da ultra-estrutura das células

A MET foi realizada de acordo com a metodologia de BOUZON *et al.*, (2005) e SIMIONI *et al.*, (2014). As amostras foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (PH 7,2) durante 4 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram fixadas e lavadas quatro vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 10 min. O material foi pós-fixado com 1% tetróxido de ósmio (OsO_4) e

tampão de cacodilato de sódio 0.1M (PH 7,2) durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, três lavagens de 10 min cada foram realizadas em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Depois das lavagens, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona v / v (30, 50, 70, 90, e 100%), 15 min cada passo. A última série de 100% de acetona foi realizada duas vezes. O material foi em seguida infiltrado com resina Spurr em série graduada de resina Spurr-acetona, durante 3 dias, seguido por duas infiltrações com resina pura durante 12h, e finalmente polimerizada em estufa a 70 °C durante 24 h. Os cortes ultrafinos (60 nm) foram realizados com uma navalha de diamante em ultramicrotomo e, subsequentemente, corados com acetato de uranila 1% por 20 min e 1% de citrato de chumbo, durante 10min. As secções foram observadas (fotografadas) em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1011; Laboratório Central de Microscopia Eletrônica do LCME / UFSC) em aceleração de 80 kV.

4.2.8 Análise estatística

Os testes foram realizados utilizando triplicatas para cada tratamento. O uso de três réplicas para ensaios com esta cepa provou ser adequada em ensaios anteriores, uma vez que o inóculo foi em fase de crescimento exponencial (condição saudável), como foi o caso dos experimentos presentes, o que resulta em comportamento reprodutível. As médias e desvios-padrão foram calculados para todos os tratamentos. A comparação entre os tratamentos foram realizadas por teste ANOVA ($p < 0,05$) e as diferenças significativas foram determinadas por uma análise de variância de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Padrão de crescimento da cepa *C. acidophila* LAFIC-004

Após isolamento e purificação, a cepa *C. acidophila* LAFIC-004 mostrou aclimatação rápida e crescimento satisfatório sob condições de laboratório padrão. Treze curvas de crescimento obtidas nestas condições foram utilizadas para identificar os tempos aproximados para as fases de crescimento exponencial e estacionária da cepa (Tabela 6).

A fase exponencial durou até 13 dias após a inoculação e a fase estacionária foi até 30 dias após a inoculação. Com base nesses dados, os tempos típicos para fases exponencial e estacionária foram definidos para ser 12 e 30 dias, respectivamente. Nós optamos por usar os tempos mais

longos obtidos (curva n. 13, Tabela 6), assumindo que elas caracterizam melhor o estado bioquímico típico das células nessa fase de crescimento. Frascos da curva n°. 13 tinham um volume maior (5000 mL) e serviu para se obter e caracterizar a biomassa da cepa em condições padrão. Taxa de crescimento exponencial (μ) destas culturas foram então calculadas com os dados da densidade celular a partir da 3ª (De_0) e do 13º (De_f) dias, com 10 dias de tempo decorrido (t). A média do valor para μ foi de 0,49 dia⁻¹. Vale ressaltar que o pH variou em média 0,3 unidade apenas nas culturas, mesmo após 30 dias de crescimento, o que indica a capacidade de tamponamento do ácido (ácido acético) pelo meio de cultura.

Tabela 6 - Dados de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 em meio ácido modificado, pH 3,6 em condição fototrófica. μ : taxa de crescimento em fase exponencial. EP: erro padrão da média. Todos os experimentos foram realizados em frascos de 150 mL com 3 a 5 repetições excepto n ° 13, que foi realizada em frascos de 5.000 mL para a produção de biomassa e determinação do teor de lipídios e o perfil de ácidos graxos.

Direitos autorais

Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

4.3.2 Crescimento de *C. acidophila* LAFIC-004 em diferentes condições

Os experimentos de crescimento em diferentes condições de cultivo (fototrófico, mixotrófico e heterotrófico) foram conduzidas até o 12º dia, assumindo que, pelo menos, o tratamento fototrófico crescerá exponencialmente, evitando assim a possibilidade do excesso de células mortas. Os tempos de cultivo foram ajustados igualmente para todos os tratamentos para comparar a eficiência do crescimento.

O crescimento celular foi significativamente maior no tratamento Foto (% de incremento, 87,9), seguida por Mix-Glu (56,5% de incremento) apresentando diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). O crescimento em condição heterotrófica foi baixa (12,2% de incremento) sem diferença significativa entre os tratamentos com glicose (Het-Glu) e

acetato (Het-Acet) ($p > 0,05$) (Fig. 10). Nenhum crescimento foi observado no tratamento Mix-Acet.

Figura 10 - Percentual de incremento das células de *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 em condições fototrófica (Foto) e mixotófica (Mix-Glu) com 1% de glicose, heterotróficas com 1% de glicose (Het-Glu) e no tratamento heterotrófico com 1% de acetato (Het -Acet). Letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (média \pm DP, $n = 3$).



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

4.3.3 Teor de lipídios e perfil de ácidos graxos

C. acidophila LAFIC-004 mostrou níveis relativamente altos de produção de lipídios, quando cultivada sob condição fototrófica com 15,9% na fase exponencial e 54,6% na fase estacionária tardia, mostrando ter um bom potencial como fonte de lipídios (Fig. 11). O perfil de ácidos graxos mostrou diferença considerável entre as amostras das duas fases de crescimento (Fig. 11). O ácido graxo mais abundante no óleo obtido a partir da fase exponencial foi o ácido hexadecanóico (C16: 0), com 46,2%, seguida por ácido (Z) -octadec-9-enóico (C18: 1-C) e (E) -octadec-11- enóico (C18: 1T) com 31,4 e 14,7%, respectivamente. No óleo obtido a partir da fase estacionária tardia, a percentagem de ácido hexadecanóico (C16: 0) diminuiu para 20,4%, enquanto que (Z) -octadec-9-enóico (C18: 1c) apareceu como o mais abundante, com 35,7%, seguido de (9Z, 12Z) octadeca-9,12-dienóico ácido (C18: 2) com 22,3% (Fig. 11). De um modo geral, em ambos os casos, os ácidos graxos saturados e mono- ou di-insaturado foram mais importantes.

Figura 11 - Perfis de ácidos graxos da cepa *Chlamydomonas acidiphila* LAFIC-004 na fase de crescimento exponencial (12 dias) e na fase de crescimento estacionária (30 dias), em condição fototrófica. Outro S = ácido graxos saturados não identificado (> 2%); Outros L = ácidos graxos insaturados não identificado (> 2%); S Total = Total de ácidos graxos saturados; U = ácidos graxos insaturados totais; teor de óleo = conteúdo total de óleo. Percentagens são expressas como média \pm desvio padrão, n = 3.



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

4.3.4 Morfologia celular

Quando analisadas por microscopia de luz, as células do tratamento- Foto de *C. acidiphila* LAFIC-004 apresentaram forma esférica com intensa cor verde e regiões vacuolares (Fig. 12a). Essas características também foram encontradas nas células tratadas com Mix-Glu (Fig. 12b). No tratamento Het-Glu, as células apresentaram uma coloração esverdeada fraca, mas há regiões vacuolizadas (Fig. 12c). No tratamento Het-Acet, as células apresentaram alterações na forma e pigmentação (Fig. 12d).

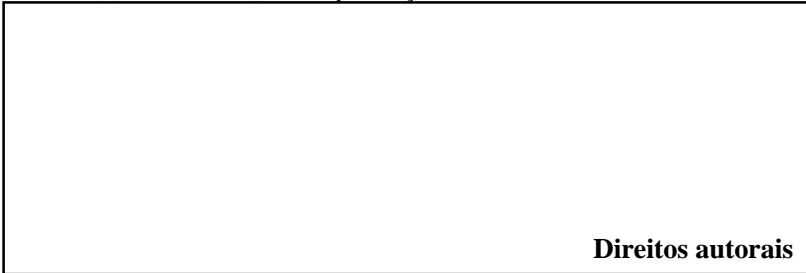
Quando analisadas por microscopia confocal de varredura a laser, células de ambos os tratamentos Foto e Mix-Glu apresentaram intensa autofluorescência dos cloroplastos (Fig. 12e,f). No tratamento Het-Glu, as células mostraram uma diminuição na autofluorescência (Fig. 12g), e no tratamento Het-Acet, as células apresentaram pouca, ou nenhuma, autofluorescência (Fig. 12h).

Por microscopia confocal de varredura a laser, células vivas tratadas com Foto e Mix-Glu e marcadas com Vermelho do Nilo apresentaram pontuações amareladas, marcando os lipídios neutros (Fig. 12i, j). Nos tratamentos Het-Glu e Het Acet, essas pontuações ainda eram visíveis, mas em menor número (Fig. 12k, l).

4.3.5 Detecção de lipídios, tamanho da célula, e complexidade por citometria de fluxo

Medidas de dispersão de luz de tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) das células de *C. acidophila* LAFIC-004 são apresentadas na Fig. 13a, b, respectivamente. Em relação ao tamanho das células, todos os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas, mas em relação a complexidade celular os tratamentos Foto e Mix-Glu não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$); no entanto, os tratamentos Het-Glu e Het-Acet foram significativamente diferentes. Het-Glu e Het-Acet apresentaram mudanças consideráveis na morfologia e complexidade celular. Os tratamentos Foto e Mix-Glu apresentaram uma distribuição heterogênea das células (Fig. 14) com tamanhos médios e grandes e baixa complexidade. As células tratadas com Het-Glu apresentaram uma distribuição mais homogênea em comparação com as células do tratamento Foto, apresentando células de tamanho menor e baixa complexidade. Por outro lado, as células tratadas com Het-Acet apresentaram alta complexidade em comparação com os outros tratamentos, e a maioria das células apresentaram tamanho pequeno (Fig. 14).

Figura 12 - *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004, células em diferentes condições de cultivo. Microscopia de Luz (**a-d**), confocal de varredura a laser da autofluorescência dos cloroplastos (**e-h**) e marcados com Vermelho do Nilo (**i-l**). As Células apresentaram coloração esverdeada com as regiões do vacúolo evidente em condições fototrófica (Foto) (**a**) e mixotrófica com 1% de glicose (Mix-Glu) (**b**), enquanto na condição heterotrófica com 1% de glucose (Het-Glu), o número e o tamanho das células apresentaram-se reduzidos (**c**), juntamente com a ausência de pigmentação em células do tratamento heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet) (**d**). A autofluorescência dos cloroplastos (vermelho) em fototrófico (**e**) e células Mix-Glu (**f**) apresentaram intensa fluorescência com as estruturas dos cloroplastos intactos. No tratamento Het-Glu, os cloroplastos estavam granular com autofluorescência (**g**), enquanto que no tratamento Het-Acet, as células apresentaram pouca fluorescência (**h**). Através da coloração com o Vermelho do Nilo (amarelo) as células do tratamento fototrófico (**i**) e Mix-Glu (**j**), apresentaram pontuações amarela (pontas de seta), enquanto nos tratamentos Het-Glu (**k**) e Het-Acet (**l**) essas pontuações são reduzidas.



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

Figura 13 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. **(a)** O FSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se o tamanho das células); **(b)** SSC- A (intensidade de fluorescência, referindo-se à complexidade celular); de *C. acidophila* - LAFIC-004 células em condições fototrófica (Foto) e mixotrófica (Mix-Glu) com 1% de glicose, mixotrófica com 1% de acetato (Mix-Acet), heterotrófica com 1% de glicose (Het-Glu), e heterotrófica com 1% de acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 3$).



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

O VN foi eficiente para a coloração dos pigmentos celulares, mostrando significativas diferenças quando analisados através do canal FITC (Fig. 15-a). O tratamento Foto apresentou a maior intensidade de fluorescência, seguido por Mix-Glu. O tratamento Het-Acet apresentou a menor intensidade de fluorescência. Estes resultados estão relacionados com os dados de densidade celular, que revelou maior aumento no tratamento Foto, seguido do Mix-Glu. Os lipídios neutros, representados pela intensidade de fluorescência nos tratamentos marcados com VN e analisados através do canal PE, não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos Foto e Mix-Glu em contraste com ambos os tratamentos heterotróficos (Fig. 15b). Entre os tratamentos heterotróficos, Het-Glu apresentou maior fluorescência em relação ao apresentado no tratamento Het-Acet (Fig. 15b).

Figura 14 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. Gráfico de dispersão - tamanho celular (FSC-A) vs. complexidade celular (SSC-A) de células de *C. acidophila* LAFIC-004 em condições fototrófica (Foto) e mixotrófica (Mix-Glu) com 1% de glicose, mixotrófica com 1% de acetato (Mix-Acet), heterotrófico com 1 % de glicose (Het-Glu) e heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet).



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

Figura 15 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004. **(a)** FITC-A - VN (células marcada com Vermelho do Nilo - sinal de fluorescência 530 / 40nm), FITC-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 530 / 40nm); **(b)** PE-VN (células marcadas com Vermelho do Nilo - sinal de fluorescência 580 / 30nm- referindo-se aos lipídios neutros), PE-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 580 / 30nm), nos seguintes tratamentos: fototrófico (Foto), mixotrófico com 1% de glicose (Mix-Glu), heterotrófico com 1% de glicose (Het-Glu), e heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 3).



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

4.3.6 Ultra-estrutura celular

Quando observados por MET, as células do tratamento Foto de *C. acidophila* LAFIC-004 mostraram uma estrutura típica de Chlamydomonadaceae com um cloroplasto ocupando a maior parte do volume celular e tilacóides alongados em grupos de três ou quatro (Fig. 16a, b). Dentro do cloroplasto, foi possível observar o estigma, uma região de concentração de carotenóides (Fig. 16c), bem como um grande pirenóide rodeado por grãos de amido (Fig. 16d). Além disso, vários corpos lipídicos com pontuações elétron-densas periféricas foram visualizadas (Fig. 16e, f).

As células do tratamento Mix-Glu apresentaram características semelhantes ao tratamento Foto, com cloroplasto ocupando quase todo o volume celular e a presença de alongados e organizados tilacóides, com pirenóide evidente e estigma (Fig. 17a-d). Os grãos de amido dispersos dentro do cloroplasto foram observados em maior quantidade em comparação com o fototrófico (Fig. 17e). Além disso, os corpos lipídicos foram visualizados em maiores quantidades neste tratamento, mostrando também pontuações elétron-densas periféricas (Fig. 17e).

No tratamento Het-Glu, as células apresentaram forma alterada, confirmando observações da microscopia de luz, mas mantendo a organização das células com visíveis membranas nos tilacóides do cloroplasto (Fig. 18a, b). A diminuição no número e tamanho dos grãos de amido foram observados ao redor de todo o pirenóide (Fig. 18b, c), bem como um aumento de pontuações elétron-densas em corpos lipídicos (Fig. 18d).

No tratamento Het-Acet, mudanças bem acentuadas na estrutura das células podem ser observadas (Fig. 19a). Os tilacóides apareceram degenerados em toda a célula (Fig. 19b, c), e apenas alguns corpos lipídicos e grãos de amido foram observados. Além disso, pontuações elétron-densas apareceram dentro do pirenóide, característica não observada nos outros tratamentos (Fig. 19d).

Figura 16 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 após 12 dias de cultivo no tratamento fototrófico (a,f); As células apresentaram cloroplasto ocupando todo o volume citoplasmático (a, b) com presença de estigma (c) e pirenóide (d) cercado por grãos de amido e vários corpos lipídicos (e) com pontuações elétron-densas no interior das estruturas (setas) (f). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S), flagelo (F), Estigma (ST).

Direitos autorais

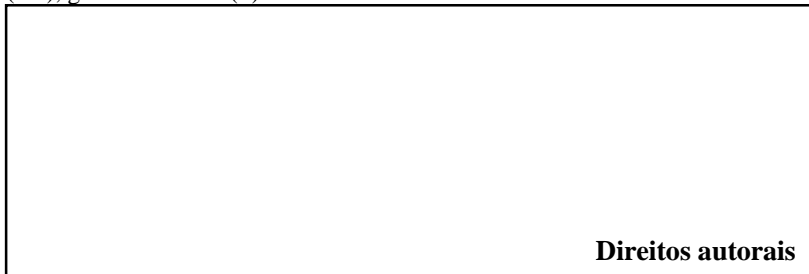
Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 após 12 dias de cultivo no tratamento mixotrófico com glicose (Mix-Glu) (a, f). Células características com presença de grãos de amido no cloroplasto (a, b) pirenóide (c) e estigma (d); Estrutura dos tilacóides com presença de grãos de amido (e); Observa-se o aumento do número de corpos lipídicos com estruturas elétron-densas (setas) (f). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S), Estigma (E).

Direitos autorais

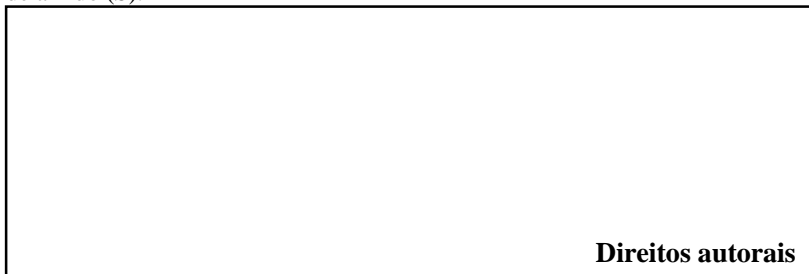
Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 cultivadas após 12 dias no tratamento heterotrófico com glicose (Het-Glu) (a-d). Células com presença de cloroplasto ocupando menor volume celular, mas com tilacóides característicos (a, b); Pirenóide com alguns grãos de amido e tilacóides visíveis (c); Corpos lipídicos com aumento de pontuações elétron-densas (d). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S).



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de *Chlamydomonas acidophila* estirpe LAFIC-004 após 12 dias em tratamento heterotróficos com acetato (Het-Acet) (a-d). As células com estrutura alterada do cloroplasto (a, b). Detalhe dos tilacóides desintegrados (c). Pirenóide com pontuações elétron-densas no interior (d). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S).



Fonte: Souza, L. S. *et al*, 2016

4.4 DISCUSSÃO

C. acidophila LAFIC-004 foi facilmente cultivada sob condições fototróficas quando mantida em meio de cultura com pH semelhante ao encontrado no seu ambiente original (2,5-3,8). A taxa de crescimento nas condições padrão definida (média 0,49 dia⁻¹) foram semelhantes a outras cepas de *C. acidophila*, que variavam de 0,32-0,88 dia⁻¹ (GERLOFF-ELIAS *et al.*, 2005; CUARESMA *et al.*, 2006; TITTEL *et al.*, 2005).

Como já foi relatado por vários autores, o estresse promovido pela acidez extrema resulta em alto consumo de energia, uma vez que as microalgas acidófilas tendem a manter ativamente quase neutro o pH intracelular, apesar dos valores externos (GERLOFF-ELIAS *et al.*, 2005). Além disso, um pH altamente ácido, limita severamente a disponibilidade do carbono inorgânico (CO₂) (TITTEL *et al.*, 2005). A manipulação das condições de cultivo (irradiância, balanço/ aeração, suprimento de carbono) provavelmente produz um aumento na taxa de crescimento. Considerando o potencial biotecnológico dessa espécie em biorremediação (NISHIKAWA *et al.*, 2003) e produção de lipídios (LANGNER *et al.*, 2009), as condições de cultura alternativa tendem a aumentar o potencial e a taxa de crescimento podendo contribuir para a viabilidade de aplicações comerciais.

No presente estudo, avaliou-se o crescimento e algumas características fisiológicas e bioquímicas da cepa *C. acidophila* LAFIC-004 cultivada em diferentes condições de cultivo (fototrófico, heterotrófico e mixotrófico), com a utilização de glicose e acetato como fontes de carbono orgânico. Vários autores relataram que as condições de cultivo heterotrófico e mixotrófico são boas estratégias para aumentar as taxas de crescimento e o teor de lipídios em microalgas. MOON *et al.*, (2013) verificaram que *Chlamydomonas reinhardtii* apresentou maior crescimento em condições mixotrófica usando 1% de acetato, mas nenhum crescimento foi verificado para a espécie em condição heterotrófica. DOEBBE *et al.*, (2007) demonstraram que a absorção da glicose em *C. reinhardtii* é limitada pela ausência de transportadores de glicose. Entretanto, outras cepas de *C. acidophila* apresentaram um crescimento satisfatório em condições mixotrófica com glicose (SPIJKERMAN, 2007), indicando que a capacidade para utilizar diferentes fontes de carbono orgânico varia dentro do gênero e mesmo entre diferentes cepas da mesma espécie. No entanto, o maior crescimento e produção de lipídios para *C. acidophila* LAFIC-004 foram observados em condição fototrófica. As células cultivadas nessa condição mostraram integridade e estrutura intracelular normais. Além disso, uma intensa fluorescência da clorofila foi detectada por meio de microscopia confocal e citometria de fluxo, indicando alta atividade fotossintética.

As células no tratamento Mix-Glu apresentaram características morfofisiológicas e ultra-estruturais semelhantes às do tratamento Foto. A quantidade de corpos lipídicos foi equivalente, com população heterogênea, apresentando tamanho celular diferente, mas com menor taxa de crescimento. Esta inferior taxa de crescimento não está de acordo

com estudos anteriores, onde *C. acidophila* apresentou maior crescimento na condição mixotrófica (TITTEL *et al.*, 2005).

A heterogeneidade da população celular é, sem dúvida, relacionada com o ciclo reprodutivo do gênero *Chlamydomonas*, que dispõe de vários tipos de células com diferentes tamanhos e estruturas, incluindo células jovens, células maduras, gametas, zigotos e zoósporos (HARRIS, 2009). A reprodução sexual em *Chlamydomonas* spp. é induzida principalmente pela falta de nitrogênio. Em culturas de laboratório, esta condição é geralmente observada no final da fase de crescimento exponencial, a fase em que foram analisadas as culturas do presente estudo, por ambas as análises (citometria de fluxo e ultra-estrutura). Assim, a maior heterogeneidade da população visto nos tratamentos Foto e Mix-Glu pode ser explicado pela maior diversidade de tipos de células, resultado da reprodução sexual. No tratamento Het-Glu, por sua vez, a homogeneidade relativa da população celular indica falta de reprodução sexual, provavelmente por causa da condição de escuro, uma vez que a gametogênese neste gênero é dependente, ou, pelo menos, facilitada por luz (SAITO *et al.*, 1998).

A expectativa era que o tratamento Mix-Glu apresentasse maiores taxas de crescimento que o tratamento Foto, uma vez que a glicose representa uma fonte adicional de energia e carbono. Isso seria especialmente vantajoso em ambientes extremamente ácidos em consequência do CO₂ limitado, mas essa situação não foi verificada em nossos resultados. Nós selecionamos três possíveis explicações para esses resultados aparentemente contraditórios: (a) incapacidade de absorver glicose, (b) taxa de crescimento regulada, e (c) nutrientes desequilibrados em meios de cultura com uma alta concentração de carbono em comparação com nutrientes inorgânicos, tais como N ou P. A primeira explicação pode ser refutada, uma vez que vários estudos mostraram que *C. acidophila*, bem como outras espécies do gênero, podem absorver e assimilar glicose (BISSINGER *et al.*, 2000; TITTEL *et al.*, 2005; SPIJKERMAN, 2007). Além disso, o tratamento Mix-Glu apresentou maior quantidade de amido do que o tratamento Foto, sugerindo a participação da glicose na síntese do presente produto de armazenamento. Esta evidência refuta a primeira explicação.

Em relação à regulação da taxa de crescimento, dois aspectos devem ser considerados. Em primeiro lugar, esta espécie é extremófila. Tais espécies são tolerantes à condições ambientais extremas e evoluíram para crescer em um desses regimes, sem ter praticamente competidores (SECKBACH & OREN, 2007). Essa condição elimina a necessidade de altas taxas de crescimento, permitindo a utilização de energia para

manutenção, em vez de crescimento (por exemplo, tolerar condições extremas). Em segundo lugar, a abundância de glicose poderia reduzir a expressão de genes (enzimas e transportadores) envolvidos na fotossíntese na fase clara. Como resultado, em condição mixotrófica, a cepa pode estar apenas crescendo, principalmente, pelo consumo da glicose, mesmo na presença de luz. Ainda que, esse efeito da glicose tenha sido relatado numa ampla gama de algas e plantas superiores (JANG & SHEEN, 1994), não foi mencionado em outros estudos de crescimento mixotrófico para *C. acidophila*.

A terceira explicação considera a possibilidade de que a redução do crescimento em condições mixotrófica está associada a elevadas concentrações de carbono em relação ao meio, por exemplo, elevada razão C/N a partir da glicose. Isto pode ter outra forma restrita de crescimento equilibrado da cepa que em seguida respondeu com maior acúmulo de produtos de armazenamento (amido) no lugar de crescimento/reprodução. Na verdade, a presença de glicose encurta a via da síntese de amido uma vez que a glicose é diretamente fosforilada pela glicose-6P e subsequentemente polimerizada, durante a via fototrófica com fonte de carbono inorgânico (CO₂), o ciclo de Calvin deverá ocorrer antes para produzir glicose. Neste caso, a suplementação com nutrientes inorgânicos provavelmente resultaria em maior crescimento na condição Mix-Glu. Os estudos sobre a expressão de genes relacionados com o metabolismo são necessárias para explicações definitivas dessas questões, que vão além do âmbito do presente trabalho.

De acordo com o tratamento Het-Glu, a população de células foi mais homogênea e de tamanho pequeno, apresentando importantes mudanças intracelulares, com baixa pigmentação, e menos grânulos de amido. Esse parece definir o cenário de baixo, ou nenhum, crescimento, por sua vez, ameaçando a sobrevivência. Também significa que a glicose, provavelmente, não foi usada como fonte de energia para esta cepa na condição de escuro. Portanto, a sobrevivência neste tratamento provavelmente resultou em reservas intracelulares existentes. Por sua vez, isso sugere que a menor quantidade de amido no presente tratamento pode estar relacionado com o consumo e a inativação de síntese como consequência da condição de escuro. O primeiro passo da síntese de amido no plastídio é a catalisação por ADPglucose pirofosforilase (ATPase), que converte a glicose-1-fosfato e ATP para a ADP-glicose e a PPI, que, em seguida, inicia a polimerização ao amido (Kolbe *et al.*, 2005). A ativação redox da ATPase necessita do poder redutor que vem a partir da fase clara das reações da fotossíntese (BUCHANAN, 1980). Isso explicaria o bloqueio da síntese, na ausência de luz.

O acetato foi a fonte de carbono que mais provocou alterações celulares. O tratamento Mix-Acet causou a morte celular, enquanto no tratamento Het-Acet, as células apareceram severamente danificadas. PIRASTRU *et al.*, (2012) demonstraram que o crescimento da microalga verde *Scenedesmus sp.* em baixa luz com acetato (60-120 mM) apresentou diminuição do conteúdo de pigmentos concomitante com o declive do transporte de elétrons do PSII para PSI. Em nosso estudo, o acetato também afetou a atividade fotossintética, como observado por citometria de fluxo e mudanças nos tilacóides, como observado em imagens do MET. A ruptura das membranas internas indica claramente a toxicidade do acetato nas condições testadas. Esta toxicidade deve estar relacionada com pH ácido do meio de cultura utilizado no presente estudo. CHEN & JONHNS (1994; 1996) chamaram a atenção para a toxicidade do acetato na sua forma não dissociada, que é predominante em pH abaixo de 4.8. Estes autores relataram que concentrações superiores a 0,4 g.L⁻¹ de acetato inibiram o crescimento de *C. reinhardtii*.

A inibição do crescimento celular por acetato ocorre por interferência química do transporte de membrana do fosfato, que pode resultar em mais gastos de ATP, causando a ruptura das membranas celulares e alterações na morfologia da célula, bem como células irregulares e alongadas. Entretanto, MOON *et al.*, (2013) verificaram que *C. reinhardtii* cresceu com acetato em condições de pH mais elevado.

Finalmente, é importante mencionar que algumas microalgas são fototróficas obrigatórias, pela falta de mecanismo de transporte para absorção eficiente de fontes de carbono orgânico. Quando estes transportadores são introduzidos, as células são capazes de crescer heterotroficamente (CHEN & CHEN, 2006; DOEBBE *et al.*, 2007). Contudo, algumas espécies de microalgas, tais como *Dunaliella tertiolecta* e *Prymnesium parvum*, são incapazes de assimilar a glicose, apesar de possuir as enzimas necessárias para o seu metabolismo (NEILSON & LEWIN, 1974). Da mesma forma, as causas do crescimento fotoautotrófico obrigatório têm sido atribuídos a percursos incompletos no metabolismo de carbono central, ou, talvez, a ausência de reações enzimáticas (CHEN & CHEN, 2006). Estas descobertas levaram a uma maior compreensão da genômica de microalgas na última década (RADAKOVITS *et al.*, 2010), resultando na publicação de seqüências genômicas para algumas espécies de microalgas, esclarecendo assim as suas vias metabólicas (ARMBRUST *et al.*, 2004; NOZAKI *et al.*, 2007; BOWLER *et al.*, 2008; BLANC *et al.*, 2010; PROCHNIK *et al.*, 2010). No caso da cepa aqui estudada, nenhuma evidência particular sugere a ausência desses transportadores e enzimas.

A análise lipídica de *C. acidophila* LAFIC-004 em condição fototrófica apresentou teor de óleo de 15% na fase exponencial, que é considerada um resultado razoável para uma cepa crescida em meio ácido. O rendimento de *Chlamydomonas* spp. em geral, é cerca de 20% de lipídios em peso seco (DW) (WANG *et al.*, 2009; WORK *et al.*, 2010; MOU *et al.*, 2012). Quando os cultivos da nossa cepa foram mantidos até a fase estacionária tardia, o teor de óleo atingiu o valor surpreendentemente elevado de 54%. Este aumento foi provavelmente relacionado com a falta de nutrientes inorgânicos no meio de cultura, um fenômeno comum em cultivos em fase estacionária. Em *C. reinhardtii*, a espécie mais estudada do gênero, este valor tende a aumentar até 46% com deficiência de nitrogênio ou em mutantes em que a síntese de amido foi inibida (WANG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015). Valores semelhantes foram obtidos com estresse de NaCl em *Chlamydomonas mexicana* (SALAMA *et al.*, 2013). Essas condições de stresses podem ser induzidas em cultivos, ou podem ser realizadas em células em fase de crescimento estacionária que apresentam uma tendência em armazenar lipídios por causa da limitação de nutrientes ou outros recursos.

O consenso na literatura afirma que uma microalga deve produzir pelo menos 40% da biomassa seca em lipídios para ser considerada boa produtora (CHISTI, 2013). Para produção de biodiesel de alta qualidade, por exemplo, lipídios neutros compostos de ácidos graxos saturados, especialmente C16: 0 e C18: 0, são desejados, não ultrapassando 12% de ácidos graxos insaturados (EIBL *et al.*, 2014). Em *C. acidophila* LAFIC-004, a percentagem de ácidos graxos saturados diminuiu de 49,12% na biomassa em fase exponencial para 33,74% na biomassa na fase estacionária. Além disso, entre os ácidos graxos insaturados, a maior parte foram monoinsaturados C18: 1 (35,7%) e di-insaturados C18: 2 (22,3%), o qual não compromete a qualidade do óleo para utilização em biodiesel, como seria o caso para ácidos graxos poliinsaturados (EIBL *et al.*, 2014). Estes dados sugerem um potencial considerável de lipídios da cepa, tanto para a produção de biodiesel ou outros usos. Este fato é reforçado se for levado em consideração que a cepa pode ser cultivada em drenagem ácida de águas residuais do tipo de mineração de carvão (DAM), em que a microalga poderia provavelmente executar biossorção de metais pesados, como um benefício adicional.

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que a cepa acidofílica *C. acidophila* LAFIC-004 é uma boa produtora de lipídios neutros e tem um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biocombustíveis. A melhor condição para produção de lipídios foi encontrada no cultivo fototrófico até a fase estacionária tardia.

Cultivos em condições mixotrófica e heterotrófica com glicose a 1%, não resultaram em qualquer aumento significativo do crescimento, e o acetato é provavelmente tóxico devido ao pH baixo no meio de cultivo. Ajustes na concentração de nutrientes inorgânicos podem, eventualmente, melhorar o desempenho da cepa em condições mixotróficas com glicose. Finalmente, considerando que *C. acidophila* LAFIC-004 cresce bem em águas ácidas residuais ricas em metais pesados, características típicas de drenagem ácida de mineração, um duplo benefício pode ser alcançado em um futuro cenário de luxo pelo qual a biomassa útil seja produzida, enquanto são remediados resíduos de metais pesados.

5 ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, ULTRAESTRUTURAL E PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E CAROTENÓIDES DA CEPA *Parachlorella kessleri* LAFIC 006 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Parachlorella kessleri LAFIC 006 é uma microalga verde isolada de efluente doméstico. No presente trabalho, esta cepa foi cultivada em meio BBM (pH 7), sob condições fototrófica, mixotrófica, e heterotrófica para determinar a melhor condição de crescimento e produção de lipídios e carotenóides, simultaneamente, avaliar possíveis alterações morfológicas e ultra-estruturais nas células. Nos tratamentos heterotrófico e mixotrófico, duas fontes de carbono orgânico foram testados: 1% de glicose e 1% de acetato de sódio. A maior produtividade de biomassa seca foi verificada em condição mixotrófica com glicose (1,8 g.L⁻¹). A glicose na presença da luz resultou em um aumento significativo na produção de biomassa, diferente da condição heterotrófica que foi semelhante a condição fototrófica. O teor de lipídios sob condição fototrófica e mixotrófica com glicose foi relativamente baixo (8,5%, 6%), respectivamente. O maior teor de lipídios foi verificado no tratamento mixotrófico com acetato (17,8%). Baseado na morfologia celular (por citometria de fluxo e microscopia de luz) e ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão), características diferentes foram observadas nos tratamentos com glicose e acetato, evidenciando muitos grãos de amido e corpos lipídicos com coloração elétron-densa diferenciada entre os tratamentos. As condições mixotrófica (com acetato e glicose) e heterotrófica com acetato resultaram em maior produção de biomassa seca, lipídios neutros e carotenóides. Pode-se concluir que a cepa apresenta rusticidade (baixa exigência), crescendo em condições mixotrófica e heterotrófica consumindo compostos orgânicos e inorgânicos. Considerando a capacidade da cepa de crescer em efluentes domésticos poderíamos no futuro alcançar um cenário ideal onde a biorremediação do efluente e a produção de compostos como lipídios e carotenóides ocorreriam simultaneamente.

5.1 INTRODUÇÃO

As microalgas atualmente são consideradas uma fonte de energia sustentável promissora, devido à capacidade de algumas espécies acumularem grandes quantidades de lipídios para a produção de biocombustíveis (XU *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2009). Além disso, a possibilidade de aumentar a produção de compostos através da

otimização das vias metabólicas, é de grande vantagem, tornando as microalgas organismos com grande potencial biotecnológico. Estudos demonstraram que a viabilidade econômica global da produção de biocombustíveis a partir de microalgas baseia-se principalmente na identificação e otimização de cultivos de espécies apropriadas (PROMMUAK *et al.*, 2013).

A utilização de microalgas também pode ser uma grande estratégia no ponto de vista ambiental e econômico, onde a integração da produção de coprodutos como biocombustíveis ou pigmentos a partir da biomassa oriunda da biorremediação, resultaria em um duplo benefício (MATA *et al.*, 2010; MOHAN *et al.*, 2015).

Entre a grande diversidade de microalgas, o gênero *Chlorella* se destaca por apresentar diversas espécies com capacidade de duplicar-se com muita velocidade, além de possuir um elevado teor de proteínas e apresentar todos os aminoácidos essenciais, β caroteno, minerais, carboidratos, ácidos graxos e vitaminas do complexo B, C e E, entre outros, sendo muitas espécies do gênero consideradas de grande valor nutricional (KAY., 1991, BORZANI *et al.*, 2001).

As espécies do gênero *Chlorella* são tipicamente esféricas, pequenas com diâmetro que varia de 2 a 10 μm e esféricas, não móveis, unicelulares com um único cloroplasto e parede celular hemicelulóticas rígidas (SAFI *et al.*, 2014). Uma das principais espécies cultivadas é *C. vulgaris* devido a sua resistência a condições adversas, competidores e também a capacidade de respostas vantajosas frente a condições de stresses, aumentando a produção de alguns compostos de interesse (PŘIBYL *et al.*, 2013). As várias espécies de *Chlorella* são geneticamente semelhantes, entretanto, a composição química pode variar de acordo com as condições de crescimento a qual elas são expostas. Por exemplo, as espécies de *Chlorella* produzem diferentes quantidades de lipídios, podendo variar entre 5 a 63 % de biomassa seca (CHISTL., 2007; GOUVEIA & OLIVEIRA., 2009). Recentemente, o gênero *Chlorella* foi estritamente relacionado ao gênero *Parachlorella*, e têm atraído a atenção devido ao potencial para a produção de triacilgliceróis (TAG) e ácidos graxos de alto valor agregado (LI *et al.*, 2013).

Muitos estudos têm demonstrado diversas estratégias para aumentar o teor de lipídios em microalgas, particularmente sob condições de stresse ou de privação de nutrientes. A redução ou privação total da fonte de nitrogênio no meio de cultura tem sido uma estratégia bastante utilizada, dependendo da espécie pode ocorrer o aumento de carboidratos em vez de lipídios (LI *et al.*, 2015). Esforços tem sido realizado explorando a engenharia genética e metabólica de microalgas,

com o objetivo de estimular a biossíntese dos ácidos graxos (RADAKOVITS *et al.*, 2010).

A flexibilidade metabólica que algumas espécies de microalgas apresentam também é uma grande estratégia para o aumento da produção de metabólitos. Muitos estudos apontam que *Chlorella* spp. possui a capacidade de crescer no escuro, se suplementada com fontes de carbono orgânico (LI *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014). Outros autores afirmam, ainda, que suas taxas de crescimento são mais altas sob condições heterotróficas do que sob condições autotróficas (LIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014). Algumas microalgas também crescem em condições mixotróficas, que é uma variante da condição heterotrófica, onde o CO₂ e o carbono orgânico são simultaneamente assimilados e ambos os metabolismos respiratório e fotossintético, operam simultaneamente (CHEN, 1996; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Muitas pesquisas tem relatado o aumento significativo de lipídios, carotenóides e carboidratos em algumas espécies de microalgas nos cultivos mixotrófico e heterotrófico (LIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; LIANG, 2013; LIU *et al.*, 2014). Entretanto, o crescimento e a composição bioquímica de microalgas é resultado da interação entre fatores bióticos e abióticos, e pela natureza de cada espécie algal (MIÃO & WU, 2004).

Há dois grandes grupos de lipídios sintetizados pelas microalgas: os polares e os neutros. Enquanto os lipídios polares são os principais componentes de membranas biológicas, os neutros consistem principalmente de triacilglicerol (TAG), esteróis, ésteres, monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG), e são frequentemente armazenados em corpos lipídicos citosólicos (HARWOOD & JONES, 1989; LI *et al.*, 2010). Os lipídios neutros, triacilglicéridos (TAG), são compostos ricos em energia que podem ser convertidos em biocombustíveis (RADAKOVITS *et al.*, 2010). A extração de lipídios e a determinação da percentagem de lipídios neutros são dois passos importantes para produção de biodiesel, além da triagem para melhores linhagens (LEE *et al.*, 1998). Portanto, a detecção rápida de produção in situ de lipídios neutros é um desafio atual. Uma alternativa rápida e fácil para rastrear os teores lipídicos das microalgas é a combinação da técnica de citometria de fluxo com o marcador Vermelho do Nilo. Essa técnica tem sido utilizada por vários grupos de pesquisa para marcar corpos lipídicos neutros em microalgas em combinação com diferentes solventes orgânicos (MONTEIRO *et al.*, 2011; GUZMÁN *et al.*, 2012; CIRULIS, *et al.*, 2012; ROLEDA, *et al.*, 2013; SATPATI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Reduzir os custos de produção é extremamente necessário para viabilizar a produção de biocombustíveis a partir da biomassa microalgal. Para isso é necessário ter o conhecimento da morfologia, fisiologia e bioquímica das microalgas, para a elaboração da melhor estratégia visando o aumento do teor de lipídios por célula e da biomassa. Contudo, para muitas espécies informações sobre a regulação dos processos metabólicos relacionado a formação e produção de lipídios são escassos (PIENKOS *et al.*, 2009, TRAINOR, 2009, PRIBYL *et al.* 2012).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas fisiológicas e morfológicas da cepa *Parachlorella kessleri* LAFIC 006 cultivada sob condições fototrófica, mixotrófica e heterotrófica. Para tanto técnicas de microscopia de luz, confocal, e eletrônica de transmissão, bem como a citometria de fluxo foram utilizadas.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Cepa de microalga e condições de cultura

A cepa *P. kessleri* foi isolada do efluente da Estação Experimental de Tratamento de Esgoto (ETE) localizada na Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) e mantida na Coleção de Culturas de Microalgas do Laboratório de Ficologia (CCM-LAFIC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A cepa foi cultivada em meio Bold's Basal Medium (BBM): K_2HPO_4 (0,075 g.L⁻¹), $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ (0,175 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 g.L⁻¹), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,025 g.L⁻¹), Na_2EDTA (0,050 g.L⁻¹), $NaCl$ (0,025 g.L⁻¹), $NaNO_3$ (0,250 g.L⁻¹), KOH (0,0031 g.L⁻¹), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,00498 g.L⁻¹), H_2SO_4 (1,18 g.L⁻¹), H_3BO_3 (11,42 m g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,44 m g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,882m g.L⁻¹), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,049 m g.L⁻¹), MoO_3 (0,71 m g.L⁻¹). O pH foi ajustado para 7, os cultivos foram mantidos em sala de cultivo com irradiância de 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes), fotoperíodo (12-12 h), e temperatura de 22 ± 2 °C. Estas condições de cultivo foram definidas como a condições de cultura padrão para a cepa.

5.2.2 Crescimento de *P. kessleri* LAFIC-006 em diferentes condições

Foram realizados experimentos para avaliar os cultivos e comparar as características de crescimento da cepa sob condições fototrófica, mixotrófica e heterotrófica. As condições de cultivo foram: (a) fototrófica

(Foto), condição padrão descrito acima; (b) mixotrófico com 1% de glicose (Mix-Glu); (c) mixotrófico com 1% de acetato (Mix-Acet); (d) heterotrófico com 1% de glicose (Het-Glu); e (e) heterotrófico com 1% de acetato (Het-Acet). Os testes foram realizados em cinco repetições usando frascos de 250 mL contendo 150 ml de meio de cultura estéril e 10 mL de inóculo axênico com densidade celular de aproximadamente 4×10^6 cel.mL⁻¹.

Os frascos do tratamento mixotrófico foram expostos ao mesmo fotoperíodo e irradiância descrita na condição fototrófica. Os frascos do tratamento heterotrófico foram selados com papel alumínio. Todos os cultivos foram iguais à condição padrão já descrita. As concentrações de glicose e de acetato foram utilizadas segundo a metodologia descrita por MOON *et al.*, (2013).

A estimativa da biomassa seca inicial e final foram realizadas em cada tratamento. A biomassa seca foi determinada por gravimetria, onde alíquotas de 30 mL no início (t₀) e final (t₇) do experimento foram filtradas através de filtros de fibra de vidro (Whatman® GF/C, 47 mm de diâmetro) previamente calcinados e pesados. Após a filtração os filtros foram secos em estufa a 60 °C até obtenção de peso constante. O cálculo da biomassa seca (P_{máx}, g.L⁻¹.dia⁻¹) foi obtida segundo a equação (1) onde X_t é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t (dia), e X₀ a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t₀ (dia) (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Amostras dos tratamentos Foto, Mix-Glu, Mix-Acet, Het-Acet, e Het-Glu foram coletadas no final do experimento para as análises morfológicas por citometria de fluxo (tamanho, complexidade, e a presença de lipídios neutros), microscopia de luz (ML), microscopia confocal (MC), e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

$$P = (X_t - X_0)/(t) \quad (1)$$

5.2.3 Extração de lipídios

A extração e a determinação do teor de lipídios foram realizadas nos tratamentos Foto, Mix-Glu, Mix-Acet, Het-Glu e Het-Acet por gravimetria de acordo com a método de BLIGH & DYER (1959), utilizando-se 1 g de biomassa liofilizada. Amostras foram coletadas no 7º dia de cultivo (fase de crescimento exponencial) quando foi encerrado o experimento. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.4 Análise da morfologia celular

Para a análise da morfologia celular, amostras vivas foram analisadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 41 equipado com um software 5.1 Pro Qcapture do sistema de captura de imagem. Para visualização dos lípidos neutros, as amostras foram incubadas com Vermelho do Nilo - VN (9-diethylamina-5Hbenzo [α] fenoxazina-5-ona; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluídos em DMSO (0,25 mg.mL⁻¹). Dez microlitros da solução estoque foram adicionados a 2 ml da suspensão de células, misturados por agitação em vórtex e, em seguida, mantidos no escuro durante 30 minutos. A fluorescência do VN foi observada sob microscopia confocal de varredura a laser (Leica DMI 6000 B) em 470 nm, excitação com espectro de emissão de 530-630 nm (SALTPATI & PAL., 2014). A autofluorescência dos cloroplastos foram observadas a 488 nm do laser de excitação com espectro de emissão de 650-750 nm (ZITTA *et al.* 2013). Foram observadas e fotografadas de uma a três lâminas de microscópio de cada tratamento (replicata), totalizando 300 a 800 células analisadas de cada frasco.

5.2.5 Detecção de lípidos, tamanho celular, e complexidade por citometria fluxo

Suspensões de células de diferentes tratamentos contendo 106 cel.mL⁻¹ foram coradas com solução de VN de forma semelhante ao descrito acima para a morfologia das células. A fluorescência foi obtida usando uma excitação de 488 nm com um laser de argônio. O sinal de emissão foi medido em dois canais sob excitação: fluorescência frontal (FSC -Forward Scatter) e lateral (SSC- Side Scatter) através de detectores FITC (fluorescência verde; 530/40 nm) e PE (laranja fluorescência; 580/30 nm), indicativo de pigmentos (carotenóides, clorofila) e lípidos neutros, respectivamente, nas células coradas com VN. Uma amostra de suspensão celular sem a adição do corante

VN foi também analisada no citometro de fluxo para identificação e caracterização das populações celulares através de medidas de FSC-tamanho (Forward Scatter) e SSC - complexidade (Side Scatter). Para cada caso, foram analisadas 200.000 células automaticamente pelo equipamento. A intensidade de fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias (u.a) e as imagens foram analisadas utilizando o software *flowing*.

5.2.6 Análise da ultra-estrutura das células

A MET foi realizada de acordo com a metodologia de BOUZON *et al.*, (2005) e SIMIONI *et al.*, (2014). As amostras foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (PH 7,2) durante 4 h a 4 ° C. Em seguida, as amostras foram fixadas lavada quatro vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (PH 7,2) durante 10 min. O material foi pós-fixada com 1% tetróxido de ósmio (O_3O_4) e tampão de cacodilato de sódio 0,1M (PH 7.2) durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, três lavagens de 10 min cada foram realizadas em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Depois das lavagens, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona v/v (30, 50, 70, 90, e 100 %), 15 min cada passo. A última série de 100% de acetona foi realizada duas vezes. O material foi em seguida infiltrado com resina de Spurr em série graduada de resina Spurr-acetona, durante três dias, seguido por duas infiltrações com resina pura durante 12 h, e finalmente polimerizada num forno a 70 °C durante 24 h. Os cortes ultrafinos (60 nm) foram realizados com uma faca de diamante num ultramicrotomo e, subsequentemente, corados com acetato de uranilo 1% em 20 min e 1% de citrato de chumbo, durante 10 min. As secções foram observadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1011; Laboratório Central de Microscopia Eletronica do LCME / UFSC) em aceleração de 80 kV.

5.2.7 Perfil de carotenóides

As amostras (0,1 g – massa seca liofilizada) foram homogeneizadas em 20 mL de metanol (100% P.A) e mantidas em repouso (30min) no escuro. Após foram colhidos os sobrenadantes e adicionado mais 20 ml de metanol e mantidos em repouso por 1 hora. Esse processo foi repetido por mais 2 vezes com repouso de uma hora cada até extrair o máximo de pigmentos da biomassa. O sobrenadante recolhido foi centrifugado por 10 min a 4.000 rpm, com esferas de vidro para auxiliar no rompimento da parede celular. Em pré-testes foram testados diferentes solventes para a extração, sendo que o metanol (P.A) mostrou o melhor rendimento para a cepa. A quantificação foi baseado na curva padrão de β -caroteno ($1-50\mu\text{g.mL}^{-1}; y=0,055x; r^2= 0.999$).

5.2.8 Análise estatística

Os testes foram realizados utilizando de três a cinco repetições para cada tratamento. As médias e desvios-padrões foram calculados para

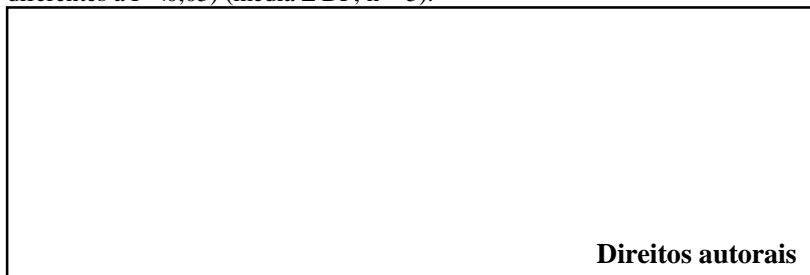
todos os tratamentos. A comparação entre os tratamentos foram realizadas por teste ANOVA ($p < 0,05$) e as diferenças significativas foram determinadas por uma análise de variância de acordo com diferenças altamente significativas do teste Tukey ($p < 0,05$).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Biomassa seca de *P. kessleri* LAFIC-006 em diferentes condições de cultivo

A maior produção de biomassa seca foi encontrada no tratamento Mix-Glu, já no tratamento Het-Glu foi verificada a menor produção de biomassa seca, não apresentando diferença significativa para o tratamento Foto (Fig.20). Os tratamentos com acetato (Mix-Acet e Het-Acet) não apresentaram diferenças significativas entre si (Fig.20).

Figura 20 - Biomassa seca ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}$) de *P. kessleri* nos tratamentos fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 5$).



5.3.2 Teor de lipídios

Os tratamentos Het-Acet e Mix-Acet apresentaram a maior porcentagem de lipídios (14,5% e 17,8%, respectivamente) (Fig. 21). No tratamento Mix-Glu foi verificado o teor de lipídios de 12,2%. O tratamento padrão (Foto) apresentou teor de lipídios relativamente baixo com 8,5%, não apresentando diferença significativa para o tratamento Het-Glu que apresentou 6 % de teor de lipídios (Fig.21).

Figura 21 - Teor de lipídios de *P. kessleri* nos tratamentos fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, $n = 3$).

Direitos autorais

5.3.3 Morfologia celular

A células da cepa de *P. kessleri* apresentaram dimensões que variam entre 2 μ m a 5 μ m, organizadas em colônias ou células individuais. Quando analisadas por microscopia de luz, as células no tratamento Foto apresentaram forma esférica com coloração verde e regiões de vacúolo evidente (Fig. 22a). Estas características também foram encontradas nas células do tratamento Mix-Glu (Fig. 22b). No tratamento Het-Glu, as células apresentaram uma cor esverdeada fraca, mas ainda com regiões vacuolizadas evidentes (Fig. 22d). Nos tratamentos com acetato (Mix-Acet, Het-Acet), as células apresentaram coloração verde mais intensa (Fig. 22c,e) e com regiões vacuolares evidentes.

Quando analisadas por microscopia confocal, as células dos tratamentos Foto e Mix-Glu apresentaram autofluorescência dos cloroplastos (Fig. 22f,g). No tratamento Het-Glu, as células apresentaram uma diminuição da autofluorescência (Fig.22i). Nos tratamentos com acetato (Mix-Acet; Het-Acet), as células apresentaram uma intensa autofluorescência dos cloroplastos (Fig. 22h,j).

Usando microscopia de fluorescência, as células vivas nos tratamentos marcados com VN apresentaram pontuações amarelo ouro, destacando os lipídios neutros em todos os tratamentos (Fig.22). Os tratamentos com acetato (Mix-Acet, Het-Acet) apresentaram a maior intensidade de fluorescência, com maior quantidade de pontuações amarelo ouro (Fig.22m,o). Já nos tratamentos com glicose (Mix-Glu, Het-Glu) as pontuações amarelas foram visualizadas em menor quantidade

(Fig.22l,n). O tratamento Foto apresentou a menor quantidade de pontuações amarela (Fig.22k)

Figura 22 - Microscopia de luz (a-e), Confocal de varredura a laser (f-j) e de Fluorescência (k-o) de *P. kessleri*. As células apresentaram esverdeadas com regiões vacuolizadas no Foto (a) e no tratamento Mix-Glu (Mixotrófico- glicose) (b), no tratamento Mix-Acet (mixotrófico com acetato) as células apresentaram uma coloração esverdeada intensa (c), Het- Glu (Heterotrófico com glicose) as células apresentaram uma coloração esverdeada mais fraca, com células de menor tamanho (d), no tratamento Het-Acet (heterotrófico com acetato) as células apresentara uma coloração esverdeada mais intensa com vacúolo bem evidente (e). A autofluorescência dos cloroplastos (em vermelho), no tratamento Foto (f) e no Mix-glu (g) as células apresentaram baixa intensidade de fluorescência, mas com estrutura íntegra do cloroplasto. No tratamento Mix-Acet as células apresentaram alta intensidade de fluorescência com estrutura íntegra do cloroplasto (h), Het- Glu, o cloroplasto apresentou baixa fluorescência (i), sendo que no Het-acet as células apresentaram alta fluorescência (j). Para a marcação com Vermelho do Nilo (em amarelo), no Foto foram visualizados poucas pontuações amarela (k), assim como no tratamento Mix-Glu (l), no Mix-Acet as células apresentaram intensa fluorescência, com várias pontuações amarela (m), no Het-Glu foram visualizadas poucas pontuações amarela (n), e no tratamento Het-Acet as células apresentaram uma intensa fluorescência com várias pontuações amarela (o).

Direitos autorais

5.3.4 Detecção de lipídios, tamanho da célula, e complexidade por citometria de fluxo

Medidas de dispersão de luz de tamanho (FSC-A) e complexidade das células (SSC-A) de *P. kessleri* cepa LAFIC 006 são apresentadas na Figura 23 a,b, respectivamente. Em relação ao tamanho e a complexidade celular a cepa apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os tratamentos Foto e Mix-Acet apresentaram a maior intensidade de fluorescência referente ao tamanho celular. No tratamento Mix-Glu foi apresentado a menor intensidade de fluorescência. Em

relação a complexidade das células, no tratamento Mix-Acet foi apresentado a maior intensidade de fluorescência indicando células com maior complexidade. Todos os tratamentos apresentaram uma população heterogênea, com células de diferentes tamanhos, representadas na figura 24.

Figura 23 - Citometria de fluxo de células de *P. kessleri* cepa LAFIC 006 (a) FSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se o tamanho das células); (b) SSC-A (intensidade de fluorescência, referindo-se à complexidade celular) nos seguintes tratamentos: fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5).

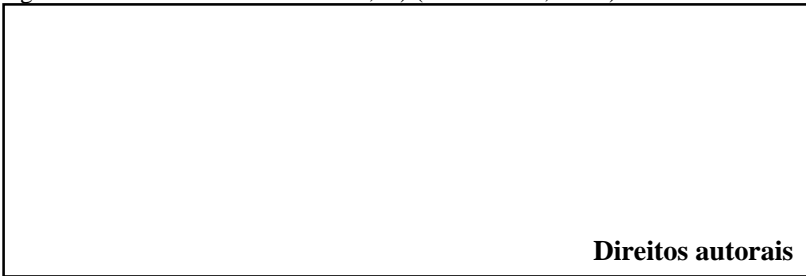
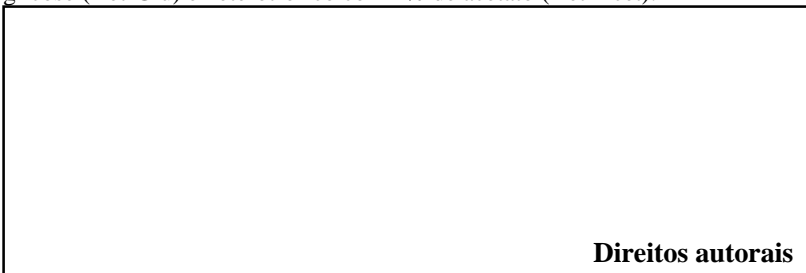
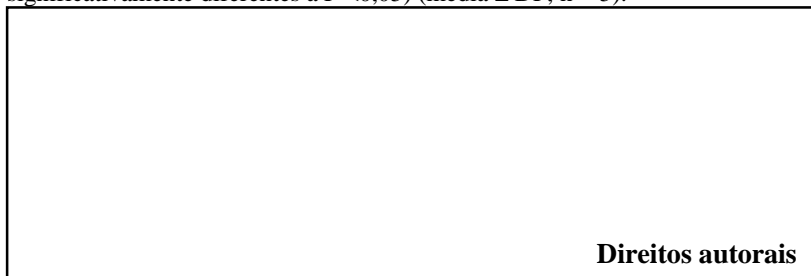


Figura 24 - Citometria de fluxo de células vivas da cepa *P. kessleri* cepa LAFIC 006. Gráfico de dispersão - tamanho celular (FSC-A) vs. complexidade celular (SSC-A) em condições fototrófica (Foto), mixotrófica com 1% glicose (Mix-Glu), mixotrófica com 1% de acetato (Mix-Acet), heterotrófica com 1 % de glicose (Het-Glu) e heterotrófica com 1% de acetato (Het-Acet).



O marcador VN foi eficiente para marcar os lipídios neutros (canal PE-A (580/30nm) e carotenóides (canal FITC-A 530/40nm) da cepa *P. kessleri* LAFIC 006. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos em relação aos lipídios neutros e aos carotenóides (Fig. 25 a,b). Os tratamentos com acetato (Mix-Acet, Het-Acet) apresentaram a maior intensidade de fluorescência para lipídios neutros e carotenóides (Fig. 25 a,b).

Figura 25 - Citometria de fluxo de células de *P.kessleri*. LAFIC 006 cepa LAFIC 006 (a) FITC-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 530 / 40nm); FITC-A VN (células marcada com o VN, sinal de fluorescência 530 / 40nm-referindo-se a carotenóides); (b) PE-A (células não marcadas - sinal de fluorescência 580 / 30nm), PE-A VN (células marcadas com o VN - sinal de fluorescência 580/30nm - referindo-se a lipídios neutros), nos seguintes tratamentos: Fototrófico (Foto), mixotrófico com glicose (Mix-Glu), mixotrófico com acetato (Mix-Acet), heterotrófico com glicose (Het-Glu), heterotrófico com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 5).



Direitos autorais

5.3.5 Ultra-estrutura celular

Quando observada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células de *Parachlorella kessleri*. LAFIC 006, no tratamento Foto apresentaram uma estrutura típica de Chlorellaceae, com células de formato globular para levemente elipsoidal, parede celular bem visível (Fig.26 a), cada célula apresentou um cloroplasto parietal em forma de taça, com tilacóides duplos alongados e penetrando no pirenóide (Fig. 26 b,c,d). O pirenóide possui uma bainha fina de amido em volta, dividido em duas partes quase igual pelo tilacóide e um núcleo, os corpos lipídicos foram visualizados em menor quantidade, relativamente aos demais tratamentos e com pontuações elétron-densa periféricas (Fig.26 c,d). Os tratamentos mixotrófico e heterotrófico com fonte de carbono (glicose e

acetato) apresentaram modificações na ultraestrutura, com grande quantidade de grãos de amido e modificações na morfologia do pirenóide e dos tilacóides. No tratamento Mix-Acet foi possível observar muitos grãos de amido dispersos (Fig.26 e, f) e grandes corpos lipídicos com coloração elétron-densa (Fig.26 g), um pirenóide alongado com uma coloração mais clara, rodeado por uma bainha mais espessa de amido (Fig.26 h). No tratamento Mix-Glu foram visualizados vários corpos lipídicos com uma coloração elétron-densa no interior (Fig.26 i,k), poucos grãos de amido (Fig.26 j) e tilacóides duplos alongados bem definidos penetrando no pirenóide (Fig.26 l). Na condição heterotrófica alterações foram observadas, no tratamento Het-Glu foram visualizados grandes quantidades de grãos de amido com regiões mais elétron-densa (Fig.26 m, n), com corpos lipídicos dispersos no cloroplasto (Fig.26 o) e pirenóide coberto por grãos de amido (Fig. 26 p). No tratamento Het-Acet as características foram semelhantes ao tratamento Het-Glu, com muitos grãos de amido com coloração elétron-densa (Fig.26 q,r), corpos lipídicos com coloração elétron-densa (Fig.26 s) e pirenóide coberto por grãos de amido (Fig.26 t).

Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da cepa *P. kessleri* LAFIC 006 após sete dias de cultivo em condição fototrófica (Foto: a-d) com células típicas, parede celular bem visível, cloroplasto parietal em forma de taça e tilacóides duplos alongados penetrando no pirenóide (a, b), corpos lipídicos elétron-transparentes com pontuações elétron-densa periférica (c) pirenóide com uma bainha fina de amido (d); mixotrófica com acetato (Mix-Acet: e-h) células com grãos de amido dispersos em todo o citoplasma (e), tilacóides alongados entre os grãos de amido (f), vários corpos lipídicos com coloração densa (g) e pirenóide alongado (h); mixotrófica com glicose (Mix-Glu:i-l) células com pirenóide típico e vários corpos lipídicos dispersos no citoplasma (i), grãos de amido dispersos no cloroplasto (j), corpos lipídicos com coloração elétron-densa (k), pirenóide com uma bainha fina de amido (l); heterotrófica com glicose (Het-Glu: m-p) células com muitos grãos de amido de diversos tamanhos dispersos pelo cloroplasto (m,n), corpos lipídicos elétron-transparentes, pontuações elétron-densa periférica (o), pirenóide coberto por grãos de amido (p); heterotrófica com acetato (Het-Acet: q-t) células com muitos grãos de amido (q,r), corpos lipídicos com coloração densa (s), tilacóides cobertos por grãos de amido (t). Cloroplasto (C) pirenóide (P), corpos lipídicos (LB), grãos de amido (S).

Direitos autorais

5.3.6 Perfil de carotenóides

As diferentes condições de cultivo influenciaram no perfil de carotenóides da cepa *P. kessleri* LAFIC 006. A luteína foi o pigmento majoritário e presente em todos os tratamentos, apresentando diferenças significativas (Tabela 7). O tratamento Mix-Glu apresentou maior teor de α - β -Caroteno, $\text{Tras-}\beta$ -Caroteno e $\text{Cis-}\beta$ -Caroteno que o tratamento Foto, os demais tratamentos não apresentaram esses pigmentos. O tratamento Foto não apresentou Zeaxantina (L,E), os demais tratamentos apresentaram zeaxantina-L com maior teor verificado no tratamento Mix-Glu (Tabela 7). A zeaxantina-E foi verificada nos tratamentos Mix-Glu, Mix-Acet e Het-Acet, com maiores teores nos tratamentos com acetato (Tabela 7).

Tabela 7 - Perfil de carotenóides (μ .g) de *P. kessleri* LAFIC 006 nas condições fototrófica (Foto), Mixotrófica com glicose (Mix-Glu), mixotrófica com acetato (Mix-Acet), heterotrófica com glicose (Het-Glu), heterotrófica com acetato (Het-Acet). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes nas colunas de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey (letras diferentes são significativamente diferentes a $P < 0,05$) (média \pm DP, n = 3).

Direitos autorais

5.4 DISCUSSÃO

A cepa *Parachlorella kessleri* LAFIC 006 mostrou habilidade em crescer em condições fototrófica e heterotrófica utilizando fontes de carbono orgânico. Das três condições de crescimento avaliadas, a cepa apresentou a maior produção de biomassa seca na condição mixotrófica com glicose. Em contraste, a produção mais baixa de biomassa foi verificada nas condições heterotrófica com glicose e fototrófica. Resultados semelhantes foram encontrados para a espécie *Chlorella vulgaris* onde a maior produção de biomassa foi verificada na condição mixotrófica em relação às condições heterotrófica e fototrófica (LIANG *et al.*, 2009).

A glicose somada a presença da luz na condição mixotrófica resultou em efeitos estimuladores de crescimento para a cepa *P. kessleri*, podendo ser considerada uma vantagem, já que algumas espécies não assimilam com eficiência fontes de carbono na presença de luz (BECKER *et al.*, 1994). A presença da glicose no meio de cultivo promove alterações na composição enzimática e na fisiologia celular de microalgas; isto porque a glicose pode atuar como estimulante ou supressora de alguns genes (ANGELO *et al.*, 2014). Em cepas de *Chlorella vulgaris*, por exemplo, a expressão das enzimas do sistema simporte hexose/ H⁺, que é responsável pela captação da glicose, é inibida pela presença de luz (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). A condição mixotrófica traz algumas vantagens para o cultivo, como a ausência de fotoinibição; altas taxas metabólicas, com entrada de energia tanto por meio da oxidação da fonte orgânica de carbono quanto da luz; e consumo conjunto de dióxido de carbono e substrato orgânico como fontes de carbono (ANGELO *et al.*, 2014). Tais vantagens representam um ganho considerável em produtividade, além de tornarem o cultivo da espécie em questão mais seletivo e resistente a contaminação e competição.

Na condição heterotrófica com glicose era esperado um aumento da biomassa, como já relatado por diversos autores para espécies do gênero *Chlorella* (BOYLE & MORGAN 2009; LI *et al.*, 2014), no entanto, isso não ocorreu. Alguns fatores podem ter influenciado nesses resultados, tais como: (1) a concentração da fonte de carbono utilizada; (2) a concentração de oxigênio disponível; e (3) a energia produzida na condição heterotrófica pode ter sido utilizada para o maior acúmulo de produtos de reserva (amido) ao invés de crescimento/reprodução. A concentração de glicose utilizada é bem variada entre as espécies, isso tem sido demonstrado em diversos trabalhos com o gênero *Chlorella* (1,5g.L⁻¹ até 60g.L de glicose) (SHI *et al.*, 1999; SANSAWA & ENDO., 2004; HEREDIA-ARROYO *et al.*, 2011). Altas concentrações do substrato podem inibir o crescimento de uma determinada espécie, enquanto baixas concentrações podem não ser suficientes para suprir as necessidades energéticas de crescimento. Em resumo, informações sobre a concentração de glicose necessária para o crescimento metabólico ideal é muito disperso na literatura para uma conclusão definitiva. A resposta pode estar relacionada a combinações de fatores, com a espécie microalgal como principal fator e condições de cultivo e ambientais secundários (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). O consumo da glicose acompanhado por um rápido consumo do oxigênio dissolvido resulta na diminuição da taxa de respiração. Em cultivo de *Chlorella* spp. a limitação de oxigênio reduz a taxa de crescimento específico (WU &

SHI., 2007), muitas vezes esse problema pode ser controlado quando cultivos em biorreatores são realizados. No presente estudo os experimentos foram realizados em frascos pequenos, sem controle do consumo de oxigênio. O maior acúmulo de substância de reserva na condição heterotrófica pode estar muitas vezes relacionada a um desequilíbrio nutricional do meio, considerando que nessa condição as taxas de fluxo energético são maiores para gerar mais ATP (YANG *et al.*, 2000). Fontes extras de nutrientes (glicina, extrato de levedura, extrato de carne, entre outros) no meio de cultura poderiam, eventualmente, aumentar a taxa de crescimento.

A cepa de *P. kessleri* mostrou que assimila tanto a glicose como o acetato nas condições mixotrófica e heterotrófica. A glicose é uma das fontes de carbono mais utilizadas para a cultura heterotrófica de microalgas. Isso acontece porque a glicose tem mais energia em comparação com outros substratos orgânicos. Por exemplo, a glicose produz $\sim 2,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ de energia em comparação com $\sim 0,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ de acetato (BOYLE & MORGAN., 2009). A assimilação de glicose oxidativa começa com a fosforilação da hexose, produzindo glucose-6-fosfato, que está prontamente disponível para armazenamento, síntese celular e respiração. Entre as várias vias utilizadas pelos microrganismos para a glicólise, aparentemente, apenas duas vias foram descritas em algas: a via de Embden-Meyerhof e a via de pentose fosfato (PP) (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Talvez a diferença mais notável no metabolismo de glicose de microalgas em condições de cultura heterotrófica, em comparação com o metabolismo fototrófico, é que no escuro a glicose é metabolizada principalmente pela via pentose-fosfato, enquanto a principal exigência fototrófica é a via Embden-Meyerhof, contudo, a via das pentoses-fosfatos pode ter uma taxa de fluxo maior do que a via Embden-Meyerhof (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Já foi proposto que a luz modulada a regulação da glucose-6-fosfato desidrogenase, devido à alterações na proporção de NADPH / NADPC, e a baixa atividade da via PP na cultura fototrófica provavelmente é um resultado do controle mediado pela luz sobre Glucose-6-fosfato desidrogenase (YANG *et al.*, 2000). Ambas as vias são realizadas no citosol e são funcionais em células de microalgas (YANG *et al.*, 2000, HONG & LEE, 2007).

O acetato uma vez no citosol das células de microalgas, é assimilado pela acetilação da coenzima A pela acetil-CoA sintetase para formar acetil coenzima A (acetil-CoA) usando uma única molécula de ATP (BOYLE & MORGAN, 2009). O acetato (transportado pela coenzima A) é geralmente metabolizado de duas formas: (a) pelo ciclo de

glioxilato para formar malato em plastídios de glioxissoma e (b) através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) para formar citrato nas mitocôndrias, proporcionando esqueletos de carbono e, portanto, energia (NEILSON & LEWIN, 1974.; BOYLE & MORGAN, 2009.; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). O acetato é um substrato prontamente disponível e barato derivado de muitas aplicações industriais, isso é especificamente importante porque reduz custos de produção, além de contribuir com o meio ambiente (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Várias espécies têm aumentado significativamente o teor de lipídios quando cultivadas em condições mixotrófica ou heterotrófica, utilizando diversas fontes de carbono (O'GRADY & MORGAN, 2011; LI *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012; ISLETEN-HOSOGLU *et al.*, 2012). No presente estudo a cepa apresentou um aumento significativo no teor de lipídios na condição mixotrófica com acetato, diferentemente dos registros que reportam ser a glicose o substrato orgânico mais usado nessa condição para espécies do gênero *Chlorella* (O'GRADY & MORGAN, 2011; HEREDIA-ARROYO, 2011). A cepa *P. kessleri* LAFIC 006 aumentou o teor de lipídios na condição Mix-Glu em comparação com a condição Foto, mas não superou os resultados obtidos no tratamento Mix-Acet. Na condição heterotrófica com glicose era esperado um aumento no teor de lipídios, entretanto, o resultado foi semelhante ao tratamento Foto. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao armazenamento de energia em forma de amido como verificado nas imagens do MET e não em lipídios neutros, sugerindo que não é apenas a condição de cultivo que aumenta o teor de lipídios, mas também os nutrientes que compõe o meio de cultura. Segundo LI *et al.* (2016) algas produtoras de amido como armazenamento de energia primária geralmente têm um baixo teor de lipídios, corroborando com os dados do presente estudo onde a cepa *P. kessleri* LAFIC 006 na condição fototrófica apresentou baixo teor de lipídios (8,5%). Já foi reportado que *P. kessleri* quando cultivada em meio de cultura equilibrado na condição fototrófica possui um baixo rendimento de lipídios (1-10%), contudo, esse valor pode ser aumentado quando a cepa for cultivada em meio de cultura com deficiência de nutrientes (nitrogênio, fósforo ou enxofre) (OTA *et al.*, 2016).

Informações sobre alterações morfológicas e fisiológicas em condições fototrófica, mixotrófica e heterotrófica são escassas na literatura, principalmente para *P. kessleri*. O conhecimento desses aspectos para entender o metabolismo e otimizar o cultivo para aplicações biotecnológicas são necessárias.

Pelas imagens do MET é possível visualizar características típicas da espécie *P. kessleri* na condição fototrófica, com tilacóides alongados e

uniformes em torno do pirenóide. O pirenóide apresentou-se dividido em duas partes por uma bainha fina do tilacóide e cercado por uma camada de amido. Estruturas semelhantes foram visualizadas por NEMCOVA & KALINA (2000). Também foram visualizados corpos lipídicos dispersos no citoplasma. As células nas condições mixotrófica e heterotrófica apresentaram alterações na organização intracelular, com muitos grãos de amido dispersos pelo citoplasma. Na condição heterotrófica, os grãos de amido ficaram sobrepostos ao pirenóide. O aumento de grãos de amido nos tratamentos confirma que a fonte de armazenamento energética principal é o amido e não lipídios neutros, similarmente ao relatado por outros autores (LI *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; OTA *et al.*, 2016). O amido é um carboidrato de armazenamento principal em muitas algas e plantas superiores, e sua biossíntese compartilha precursores com a biossíntese lipídica, embora a regulação das duas vias ainda não seja bem compreendida (RAWSTHORNE, 2002, WESELAKE *et al.*, 2009). Contudo, as reservas de lipídios podem ser aumentadas acentuadamente se a microalga for induzida ao estresse nutricional, reduzindo alguns macronutrientes do meio de cultura (LI *et al.*, 2012). No presente estudo, a maior produção de lipídios não está relacionada ao estresse, mas à fonte de carbono orgânico, no caso o acetato, que proporcionou um efeito mais significativo em comparação a glicose.

As populações celulares nos diferentes tratamentos analisados por citometria de fluxo apresentaram características heterogêneas. Esse resultado está relacionado ao ciclo reprodutivo da cepa que dispõe de vários tipos de células com diferentes tamanhos e estruturas, além disso os cultivos estavam em fase de crescimento exponencial que é marcada por intensa reprodução celular. Quando analisados os parâmetros FSC (tamanho celular) x SSC (complexidade celular), diferenças foram encontradas entre os tratamentos. Os tratamentos Foto e Mix-Acet apresentaram células de tamanho maior, já as células com maior complexidade foram verificadas no tratamento Mix-Acet. Essas diferenças entre os tratamentos podem estar relacionadas à fonte de carbono no meio de cultura.

O corante Vermelho do Nilo foi eficiente para marcar os lipídios neutros de *P. kessleri* LAFIC 006, penetrando na membrana plasmática, permeando pelas células e destacando os corpos lipídicos que foram visualizados em amarelo ouro. Segundo SILVA *et al.*, (2009), a análise de citometria de fluxo utilizando o marcador Vermelho do Nilo é um método mais fácil e mais rápido para a análise de lipídios em relação aos métodos convencionais. Esta técnica baseia-se na medida da fluorescência do corante dissolvido em lipídios neutros e da fluorescência

da clorofila-a, com picos de emissão em 570 e 675 nm, respectivamente. Por se tratar de um método rápido e menos laborioso, tem sido muito empregado para seleção de espécies de algas de alta produtividade em triacilgliceróis (MONTEIRO *et al.*, 2011).

O carotenóide majoritário presente na biomassa da cepa *P. kessleri* LAFIC 006 foi a luteína. A luteína foi o pigmento presente em todas as condições de cultivo, com maior conteúdo na condição Mix-Glu. Segundo VALDUGA *et al.*, (2009) a sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenóides, levando algumas espécies a maiores rendimentos, porém ressaltam que altas concentrações de glicose podem inibir a carotenogênese. No presente estudo a cepa apresentou baixo teor de luteína na condição heterotrófica, não corroborando com alguns trabalhos da literatura que mostram que é possível aumentar o teor de luteína nessa condição (SHI *et al.*, 2002; WUa *et al.*, 2007; O'GRADY & MORGAN, 2011). A síntese de luteína é aumentada através de indutores que afetam o estado redox e geram espécies químicas indutoras de estresse. Esta indução pelo estresse oxidativo é esperada porque a luteína tem um papel de proteção transmitido pelas suas características antioxidantes, particularmente sob o crescimento heterotrófico, onde o estresse oxidativo espontâneo é normalmente ausente ao contrário do que acontece com as culturas fototróficas. Os β -carotenos (trans, cis, α) foram produzidos apenas nas condições fototrófica e Mix-Glu, mostrando que o perfil de carotenóides é influenciado por diversos fatores. No caso do presente estudo a fonte de carbono e a presença de luz foram importantes para definir o perfil de carotenóides da cepa nas condições estabelecidas.

De maneira geral, pode-se concluir que a cepa *P. kessleri* LAFIC 006 cresce em condições mixotrófica e heterotrófica utilizando glicose e acetato de sódio a 1% como fonte de carbono orgânico. A melhor condição para a produção de biomassa e lipídios neutros foi verificada na condição Mix-Acet. A melhor produção de carotenóides foi obtida na condição Mix-Glu. A produção de lipídios neutros foi relativamente baixa se compara a de outras espécies da literatura, no entanto, a redução na concentração de macronutrientes no meio de cultura pode, eventualmente, ser uma boa estratégia para aumentar a produção de lipídios. Por fim, considerando que a cepa foi isolada de um efluente doméstico e apresenta rusticidade, crescendo em condições mixotróficas consumindo compostos orgânicos e inorgânicos, espera-se que possa alcançar um cenário ideal no futuro, onde a biorremediação do efluente e produção de lipídios e carotenóides ocorreriam simultaneamente a partir da biomassa gerada.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A cepa *P. kessleri* LAFIC 006 apresentou o melhor crescimento, produção de biomassa e lipídios neutros no meio de cultura BBM. A melhor produção de carotenóides foi encontrada no meio hidropônico NPK. A cepa cresce em condições mixotrófica e heterotrófica utilizando glicose e acetato de sódio a 1% como fontes de carbono orgânico. A melhor condição para a produção de biomassa e lipídios neutros foi verificada na condição mixotrófica com acetato de sódio. A melhor produção de carotenóides foi obtida na condição mixotrófica com glicose.

A cepa *C. acidophila* LAFIC 004 apresentou o melhor crescimento, produção de biomassa, lipídios neutros e carotenóides no meio de cultivo MAM. A melhor condição para produção de lipídios neutros foi encontrada no cultivo fototrófico até a fase estacionária tardia. Cultivos em condições mixotrófica e heterotrófica com glicose a 1%, não resultaram em qualquer aumento significativo no crescimento, e o acetato foi tóxico em pH ácido. A cepa é uma boa produtora de lipídios neutros apresentando um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biocombustíveis.

As populações celulares das duas cepas apresentaram características heterogêneas e a técnica de citometria de fluxo associada ao corante Vermelho do Nilo mostrou-se eficaz, podendo ser uma metodologia utilizada para selecionar populações hiper-produtoras.

A duas cepas apresentaram características importantes no ponto de vista biotecnológico, apresentando rusticidade (baixa exigência) e plasticidade para crescer em uma ampla faixa de pHs e meio de cultivo alternativo.

REFERÊNCIAS

ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.* v 51, p. 199-202, 1968.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **AOCS**, 2006. Official Method Ce 1c-89.

ANGELO, E. A; ANDRADE, D. S; FILHO, A. C Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35 (2), p.125-136, 2014.

ARMBRUST, E.; BERGES, J.; BOWLER, C. et al The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. **Science** 306:79-86, 2004.

BAI, M. D. et al. Microalgal pigments potential as by products in lipid production. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.** v. 42, p. 783-786, 2011

BELL, G. Experimental evolution of heterotrophy in a green alga. **Evolution**, v. 67, p. 468-476, 2013.

BHATNAGAR, A., CHINNASAMY, S., SINGH, M., DAS, K. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Appl. Energy**, v.88, p. 3425-3431, 2011.

BHOSALE P, BERNSTEIN PS Microbial xanthophylls. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 68, p. 445-455, 2005.

BISCHOFF, H.W.; BOLD, H.C. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. **University of Texas Publications**, v. 6318, p. 1 - 95, 1963.

BISSINGER, V.; JANDER, J.; TITTEL, J. A new medium free of organic carbon to cultivate organisms from extremely acidic mining lakes (pH 2.7). **Acta Hydrochimica Hydrobiologica** 28: 310-312, 2000.

BLANC, G.; DUNCAN, G.; AGARKOVA, I. et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. **Plant Cell** 22:2943-2955, 2010.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol** , v.37, p.911-917, 1959.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialisation. *J Appl Phycol*, v.25, p. 743-756, 2013.

BORZANI, W. **Biotecnologia industrial** / [coordenação de] W. Borzani ... [et al.]. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. Engenharia Bioquímica, São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda. 1ª edição. v. 2, 2001.

BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L.C.; OLIVEIRA, E.C. Ultrastructure of tetraspore germination in the agar-producing seaweed *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 44, p. 09-415, 2005.

BOWLER, C.; ALLEN, A. E.; BADGER, J. H. et al The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature** 456:239-244, 2008.

BOYLE N. R, MORGAN J. A. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas*. **BMC Syst Biol**, v. 3: p. 4, 2009.

BOYLE, N. R.; MORGAN, J. A. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. **BMC Syst. Biol.** V.3, p. 4, 2009.

BUCHANAN, B.B. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann Rev Plant Physiology*. v.31, p.341-74, 1980.

BURLEW J. S. **Algal culture from laboratory to pilot plant**. Washington DC: Carnegie Institution of Washington, 1953.

BUX, F. **Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products**. CRC Press Boca Ratón, 2013, Flórida.

CAMPENNI, L. et al. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p.1383-1393, 2013.

CHANDRA, R; ROHIT, M.V; SWAMY, Y.V; VENKATA MOHAN, S. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. **Bioresour. Technol.**, v. 165, p. 279- 287, 2014.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends Biotechnol.** v.14, p. 412-426, 1996.

CHEN, F.; JOHNS, M. R. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. **Process Biochem** 31: 601-604, 1996.

CHEN, F.; JOHNS, M. R. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. **Process Biochem** 29:245-252, 1994.

CHEN, F; JOHNS, M. R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. **J. Appl. Phycol.**, v.7, p. 43-46, 1995.

CHEN, G., CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v.28, p.607-616, 2006.

CHENG, Y. et al. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.84, p. 777-781 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n.3, p.294-306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **J. Biotechnol**, v.167, p. 201-214, 2013.

CHO, D; RAMANAN, R; KIM, B. Novel approach for the development of axenic microalgal cultures from environmental samples. **J. Phycol.** v. 49, p. 802-810, 2013.

CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids - A Practical Guide**, 1989, 1^o ed, Matreya.

CIRULIS, J.T.; STRASSER, B. C.; SCOTT, J. A.; ROSS, G. M. Optimization of Staining Conditions for Microalgae with Three Lipophilic Dyes to Reduce Precipitation and Fluorescence Variability. **Cytom Part A.** v. 81A, p.618-62, 2012.

COHEN, Z. [Ed.] 1999. **Chemicals from Microalgae**. London: Taylor & Francis. 419p

COLLIER, J. L. Flow cytometry and the single cell in phycology. **J phycol**, v.36, p. 628-44. 2000.

COUTTEAU, P. 1996. Micro-algae. **In:** LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361. Rome, FAO. 295p.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J. M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology.** v.40. p.158-162, 2006.

D'ALESSANDRO E. B; FILHO N. E. A Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832-841, 2016.

DE JESUS TORRES H. S.; CASSINI S. T. A.; GONÇALVES R. F. Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis. 2014. In: IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, Porto Alegre: ABES.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

DOEBBE A, et al. Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H₂ production. **J. Biotechnol**, v. 131, p. 27-33, 2007.

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. **In:** RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boca Raton: CRC, 1990. p. 101-116.

DUBINSKY, Z.; MATSUKAWA, R.; KARUBE, I. Photobiological aspects of algal mass culture. **J. Mar. Biotechnol.**, v.2, p.61-65, 1995.

EIBL, J. K. et al. Bioprospecting for acidophilic lipid-rich green microalgae isolated from abandoned mine site water bodies. **AMB Express**, v. 4, p.7, 2014.

FERNANDES, B. et al. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. **Bioresource Technology** <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.096>, 2013.

FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M.; BOOPATHY, R. Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1700- 1703, 2007.

GAO, C; ZHAY, Y; DING, Y; WU, O. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Microbiology**, p. 756-761, 2010.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biociência**, v.34, p.36-43, 2005.

GERLOFF-ELIAS, A.; SPIJKERMAN, E.; PRÖSCHOLD, T. Effect of external pH on the growth photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). **Plant Cell and Environ**, v.28, p. 1218-1229, 2005.

GIOVANARDI, M. et al. Morphophysiological analyses of *Neochloris oleabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. **Protoplasma** 252:1347-1359, 2013.

GIRARD, J. et al. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Res.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.002>. 2014.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.36, n.2, p.269-274, 2009.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.

GUZMÁN, H. M.; VALIDO, J. A.; PRESMANES, K. F.; DUARTE, L. C. Quick estimation of intraspecific variation of fatty acid composition in *Dunaliella salina* using flow cytometry and Nile Red. **J Appl Phycol.** v. 24, p.1237-1243, 2012.

HAMMED A. M; PRAJAPATI S. K; SIMSEK, A; SIMSEK, H. Growth regime and environmental remediation of microalgae. **Algae**, v. 31(3), p. 189-204, 2016.

HARRIS, E. H. The *Chlamydomonas* Sourcebook - Vol. I: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. 2nd edition. Academic Press, 2009, Oxford p. 444

HARWOOD, J. L.; JONES, A. L. Lipid metabolism in algae. **Adv Bot Res**, v. 16, p.1-53, 1989.

HEREDIA-ARROYO, T., Wei, W., Hu, B., 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**162, 1978-1995

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass Bioenerg.**v. 35, p. 2245-2253, 2011.

HONG, S.-J.; LEE, C.-G. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** v.12, p.165-173, 2007.

HONGYANG, S.; YALEI, Z.; CHUNMIN, Z.; XUEFEI, Z.; JINPENG, L. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 9884-9890, 2011.

HU, Z.; TAN, P.; YAN, X.; LOU, D. Life cycle energy, environment and economic assessment of soybean-based biodiesel as an alternative automotive fuel in China. **Energy**, v. 33, p. 1654-1658, 2008.

HUANG, G. H. et al. Biodiesel production 674 by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.

ILLMAN, A. M.; SAAGG, A. H.; SHALES. S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microb. Tech.** v.27, p. 631-635, 2000.

INTHORN, D. Removal of Heavy Metal by Using Microalgae. **In:** Kojima H L, YK Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology. Springer, Hong Kong pp. 111-135, 2001.

JANG, J. C.; SHEEN, J. Sugar Sensing in Higher Plants. **Plant Cell**, v. 6, p. 1665-1679, 1994.

KAIN, J. M. Seasonal growth and photoinhibition in *Plocamium cartilagineum* (Rhodophyta) of the Isle of Man. **Phycol.** v. 26 (1), p. 88-99, 1987.

KAY, R. A; BARTON, L. L. Microalgae as food and supplement. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 30:555-573, 1991.

KOLBE A. et al Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. **PNAS**, v.102 (31), p. 11118-11123, 2005.

KOMOLAFE, O. et al. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. **Bioresour. Technol.** v.154, p. 297-304, 2014.

KOMOR, E. Proton-coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*. **FEBS Lett.**, v.38, p. 16-18, 1973.

KOMOR, E.; TANNER, W. The hexose-proton symport system of *Chlorella vulgaris*: specificity, stoichiometry and energetic of sugar-induced proton uptake. **Eur. J. Biochem.**, v. 44, p. 219-223, 1974.

KUMAR, K. S.; DAHMS, H-U.; WON, E-J.; LEE, J-S.; SHIN, K-H. Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotox Environ Safety**, v. 113, p.329-352, 2015.

LANGNER, U.; JAKOB, T.; STEHFEST, K.; WILHELM, C. An energy balance from absorbed photons to new biomass for *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas acidophila* under neutral and extremely acidic growth conditions. **Plant Cell and Environment** 32: 250-258, 2009.

LEE, S. J., YOON, B. D., OH, H. M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, v.12, p. 553-556, 1998.

LEMOINE, Y; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae:a multifunctional response to stress. **Photosynth Res.**v.106, p. 155-177. doi:10.1007/s11120-010-9583-3, 2010.

LI D. et al. Storage lipid synthesis is necessary for autophagy induced by nitrogen starvation. **Febs Letters**, v. 589, p.269-276, 2015.

LI, X. et al. M The Microalga *Parachlorella kessleri*--A Novel Highly Efficient Lipid Producer. **Biotechnology and Bioengineering** doi: 10.1002/bit.2459511, 2013.

LI, X.; Xu, H.; Wu, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, v.98, p.764-771, 2007.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnol. Bioeng.** v. 107, p. 258-268, 2010.

LI, Y. et al. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnol Bioeng**, v.107, p. 258-268, 2010.

LI, Z.; YUAN, H.; YANG, J.; LI, B. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresour. Technol.** v.102, p. 9128-9134, 2011.

LIANG Y. et al. Producing liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Appl. Energy**, v.104, p.860-868, 2013.

LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnol Lett**, v. 31, p.1043-1049, 2009.

LIANG, Y. Producing liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Applied Energy**, v. 104, p. 860-868, 2013.

LIU, J. et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 106-110, 2011.

LIU, J.; SUN, Z.; CHEN, F. **Biofuels from algae**. Ed Elsevier, 2014. v.6, p. 111-153.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 588p.

MARKOU, G; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: are view with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnol.Adv.** 8,1532-1542.doi:10.1016/j.biotechadv.2013. 07.011, 2013.

MATA, T. M.; ANTONIO, A. M.; NÍDIA S. C. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renew Sustainable Energy**, v.14, p.217-232, 2010.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **J. Biotechnol.** v.110, p. 85-93, 2004.

MINHAS, A. K; HODGSON, P; BARROW, C. J; ADHOLEYA, A. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, doi: 10.3389/fmicb.2016.00546, 2016.

MOHAN, S. V. et al. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 169-178, 2015.

MONTERO, M. F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G. G. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. **J Appl Phycol**, v. 23, p.053-1057, 2011.

MOON, M. et al. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Algal Research**, v. 2, p.352-357, 2013.

MORALES-SANCHEZ D. et al. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World J Microbiol Biotechnol**, v.31, p. 1-9, 2015.

MOU, S. Rapid estimation of lipid content in an Antarctic ice alga *Chlamydomonas* using the lipophilic fluorescent dye BODIPY505/515. **J Appl Phycol**, v. 24, p. 1169-1176, 2012.

NEILSON, A. H; LEWIN, R. A. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative. **Biochemistry Phycol**, v. 13, p. 227-264, 1974.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3.^a ed. São Paulo: Sarvier Editora Ltda, 2002, 955p.

NEMCOVA, Y; KALINA, T. Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C sorokiniana* compared with *C luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **Arch. Hydrobiol.** 95-105, 2000.

NISHIKAWA, K.; YAMAKOSHI, Y.; UEMURA, I.; TOMINAGA, N. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, p.253-259, 2003.

NOZAKI, H. et al. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hostspring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. **BMC Biol**, v. 5, p.1-8, 2007.

NURDOGAN, Y.; OSWALD, W. J. Enhanced nutrient removal in high rate ponds. **Water Science Technology**. v. 31. p. 31-43, 1995.

O'GRADY, J.; MORGAN, J. A.; Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 34, 121-125, 2011.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p. 359-466, 2003.

OLAVENSON, M.M.; STOKE, P. M. Responses of the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3. **J of Phycol**, v. 25, p. 529-539, 1989.

ÖRDÖG V. et al. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **J Appl Phycol**. v. 24, p. 907-914, 2012.

OTA, S. et al. Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole?cell 3D ultrastructure. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p.13, 2016.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic Growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. **J. Phycol**, v. 47(1), p.190-199, 2011.

PIENKOS, P.T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels*, **Bioproducts & Biorefining** , v.3, p. 431-440, 2009.

PIRASTRU, L. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. **J Appl Phycol**, v. 24, p.117-124, 2012.

PŘIBYL, P.; CEPÁK, V.; ZACHLEDER, V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p.540-561, 2012.

PŘIBYL, P.; CEPÁK, V.; ZACHLEDER, V. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*. **J. Appl. Phycol.**, v. 25, p. 545–553, 2013.

PROCHNIK, S. E. et al. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. **Science**, v. 329, p. 223-226, 2010.

PROMMUAK C. et al. Simultaneous production of biodiesel and free lutein from *Chlorella vulgaris*. **Chem Eng Technol** , v.36, p.733-739, 2013.

PULZ, O.; Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, p.635-648, 2004.

RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced Biofuel production. **Eukaryot Cell**, v. 8, p. 486-50, 2010.

RATTANAPOLTEE, P.; KAEWKANNETRA, P. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. **Energy**, v. 78, p.4-8, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. BIOLOGIA VEGETAL. 6ª ED. EDITORA Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2001. 906p.

RAWSTHORNE S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. **Prog Lipid Res** 41:182-196, 2002.

RICHMOND, A. & GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*, v.10, p. 253-64, 1986.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Appl Phycol**. 2nd edition Oxford: Wiley Blackwell Publishing, 2013. pp 1- 736

RIPPKA, R. et al. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol** . v. 111, p. 1 - 61, 1979.

ROLEDA, M.Y. et al. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technol**, v. 129, p.439-449, 2013.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH, M. J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, n.19, p. 430-436. 2008.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.35, p.265-278, 2014.

SAITO, T.; INOUE, M.; YAMADA, M.; MATSUDA, Y. Control of gametic differentiation and activity by light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol**, v.39, p.8-15, 1998.

SALAMA EL-SAYED. et al. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess Biosyst. Eng**. v. 36, p.827-833, 2013.

SALTPATI, G. G; PAL, R. Rapid detection of neutral lipid in green microalgae by flow cytometry in combination with Nile red staining-an improved technique. **Annals Of Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.937-949, 2014.

SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; VOLTOLINA, D. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions comparative. **Biochemistry and Physiology**, v. 107b, n. 1, p. 39-44, 1994.

SANSAWA, H.; ENDO, H. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. **J. Biosci. Bioeng.** v.98, p. 437-444, 2004.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, 254 p

SCHMIDT, R.A.; WIEBE, M.G.; ERIKSEN, N.T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyaninproducing red alga *Galdieria sulphuraria*. **Biotechnol. Bioeng.** v. 90, p. 77-84, 2005.

SECKBACH, J.; OREN, A. Oxygenic Photosynthetic Microorganisms **In** Extreme Environments: Possibilities and Limitations. In: Seckbach, J. (Ed.). *Algae And Cyanobacteria In Extreme Environments*. Springer, The Dordrecht, 2007, pp. 5-25.

SHARMA, K.K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P.M. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. **Energies** 5:1532-1553,2012.

SHEEHAN, J.; DUNAHA, Y. T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - **Biodiesel from Algae**. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-580-24190, 1998.

SHI, X.-M.; LIU, H.-J.; ZHANG, X.-W.; CHEN, F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. **Process Biochem.** v.34, p.341-347, 1999.

SHI, X-M; JIANG, Y.; CHEN, F. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. **Biotechnol Prog.** v.18, p.723-7, 2002.

SILVA, T. L. et al. Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry. **Appl Biochem Biotechnol**, v.159, p.568-578, 2009.

SIMIONI, C. et al. Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). **J Phycol**, v. 50(3), p.577-596, 2014.

SMITH, G. M. **Botânica Criptogâmica: Algas e Fungos**, Fundação Calouste Gulbenkian, 1955. 4ª ed., v.1.

SOARES, DINIARA. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 f. Tese (Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica - Mestrado e Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba,

SOSIK, H. M.; OLSON, R. J. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. **Limnol Oceanogr Methods**, v.5, p. 204-16. 2007.

SOUZA, L. D. S. et al. Morphological and Ultrastructural Characterization of the Acidophilic and Lipid-Producer Strain *Chlamydomonas Acidophila* LAFIC-004 (Chlorophyta) Under Different Culture Conditions. 2016, DOI: 10.1007/s00709-016-1030-7.

SPIJKERMAN, E. Phosphorus acquisition by *Chlamydomonas acidophila* under autotrophic and osmo-mixotrophic growth conditions. **Journal of Experimental Botany**, v58, p 15-16, 2007.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.2, p.87-96, 2006.

TAN, C., JOHNS, M. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila*. **Hydrobiologia**, v. 215, p.13-19, 1991.

TITTEL, J.; BISSINGER, V.; GAEDKE, U.; KAMJUNKE, N. Inorganic Carbon Limitation and Mixotrophic Growth in *Chlamydomonas* from an Acidic Mining Lake. **Protist**, v.156, p. 63-75, 2005.

TOMASSELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed) **Handbook of the microalgal culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. p.3-19.

TRAINOR, F. R. Breaking the habit. Integrating plasticity into taxonomy. **Syst Biodivers**, v. 7, p. 95-100, 2009.

USDOE. National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program. 2010, 124p.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2429 - 2436, 2009.

VARSHNEY, P. et al. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. **Bioresour Technol**, v. 184, p.363-372, 2015.

VELMURUGAN, N. et al. Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry. **Bioresour Technol**, v. 138, p.30-37, 2013.

WANG, H., XIONG, H., HUI, Z., ZENG, X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggyery wastewater to produce lipids. **Bioresour. Technol.** v.104, p.215-220, 2012.

WANG, Z. T. Et al. Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, p. 1856-1868, 2009.

WESELAKE, R. J. et al. Increasing the flow of carbon into seed oil. **Biotechnol Adv**, v.27, p. 866-878, 2009.

WORK, V. H. et al. Increased Lipid Accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 Starch less Isoamylase Mutant and Increased Carbohydrate Synthesis in Complemented Strains. **Eukaryotic**, v. 9 (8), p. 1251-1261, 2010.

WU, S. et al. Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricornutum* using Nile red and BODIPY 505/515. **J Appl Phycol**, v. 26, p. 1659-1668, 2014.

WU, Y.-H. et al. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresour. Technol.** v.112, p.193-198, 2012.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 44, p.13-18, 2007.

WU, Z.; WU, S.; SHI, X. Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*. **J. Food Proc. Eng.**, v.30, p. 174-185, 2007.

XIONG, W. et al. Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, v.101, p. 2287-2293, 2010.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **J. Biotechnol.** v.126, p. 499-507, 2006.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/ dark-heterotrophic conditions. **Biochem. Eng. J.** v. 6, p. 87-102, 2000.

YENTSCH, C. S.; YENTSCH, C. M. Single cell analysis in biological oceanography and its evolutionary implications. **J Plankton Res**, v.30, p.107-17, 2008.

YENTSCH, C.M.; CAMPBELL, J.W. Phytoplankton growth perspectives gained by flow cytometry. **J Plankton Res**, v.13, p.83-108, 1991.

ZASLAVSKAIA, L. A. et al. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. **Science**, v. 292, p. 2073-2075, 2001.

ZITTA, C. S ; ROVER, T. ; HAYASHI, L. ; BOUZON, Z. L. Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (*Rhodophyta, Gigartinales*) brown tetrasporophyte strain. **J. Appl. Phycol.** v.25, p. 615- 29, 2013.

ZHANG, X. W., CHEN, F., JOHNS, M. R. Kinetic models for heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in batch and fed-batch cultures. **Process Biochem.** v.35, p.385-389, 1991.