



**EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O
CRESCIMENTO E A COMPOSIÇÃO DA
BIOMASSA DA MICROALGA MARINHA**

Pavlova lutheri

Kamila Yoko Carvalho Komatsu

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Anita Ferreira da Silva, D.Sc. Instituto de Química/UFRJ

Ricardo Moreira Chaloub, D.Sc. Instituto de Química/UFRJ

Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph.D. Escola de Química/UFRJ

Dezembro de 2014

**EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E A
COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA**

MARINHA *Pavlova lutheri*

Kamila Yoko Carvalho Komatsu

Projeto de final de curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc. - Escola de Química/UFRJ

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc. - Escola de Química/UFRJ

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc. - Escola de Química/UFRJ

Graciela Diniz dos Santos, M.Sc. – IVIG/COPPE/UFRJ (Suplente)

Orientado por:

Anita Ferreira da Silva, D.Sc. – Instituto de Química/UFRJ

Ricardo Moreira Chaloub, D.Sc. – Instituto de Química/UFRJ

Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph.D. – Escola de Química/UFRJ

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Dezembro de 2014

Ficha Catalográfica

Komatsu, Kamila Yoko Carvalho.

Efeito da salinidade sobre o crescimento e a composição da biomassa da microalga marinha *Pavlova lutheri* / Kamila Yoko Carvalho Komatsu. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

Vi, 47p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

Orientadores: Anita Ferreira da Silva e Ricardo Moreira Chaloub e Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo.

1. Estresse salino. 2. *Pavlova lutheri*. 3. Biomassa. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Anita Ferreira da Silva e Ricardo Moreira Chaloub e Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo. I. Efeito da salinidade sobre o crescimento e a composição da biomassa da microalga marinha *Pavlova lutheri*.

À minha mãe, Ester.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^ª Anita Ferreira da Silva, Prof. Ricardo Moreira Chaloub e Prof^ª Ofélia de Queiroz F. Araújo, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo.

Ao meu pai Nelson, que diante de tantas dificuldades se mostrou tão forte! Obrigada por ter me ensinado a importância da disciplina.

Aos meus primos e tias, pelo incentivo e amor incondicional.

Ao meu namorado Rafael, por tanto carinho e cuidado.

Às amigas muito queridas, Juliana, Paula e Raquel, por serem tão companheiras.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia de Bioprocessos.

EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E A COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA MARINHA *Pavlova lutheri*

Kamila Yoko Carvalho Komatsu

Dezembro de 2014

Orientadores: Anita Ferreira da Silva, Prof^ª Dr^ª. Instituto de Química/UFRJ.

Ricardo Moreira Chaloub, Prof. Dr. Instituto de Química/UFRJ.

Ofélia de Queiroz F. Araújo, Prof^ª Dr^ª Escola de Química/UFRJ.

Fatores de estresse podem modificar a composição da biomassa algácea em termos de níveis de pigmentos, proteínas, carboidratos, lipídeos, entre outros. A salinidade é um fator extrínseco ao crescimento que influencia vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados ao crescimento, sendo que muitos organismos, incluindo as microalgas, alteram seu metabolismo para se adaptar ao ambiente extremo. Tendo em vista a possibilidade de se utilizar esses organismos para alimento vivo em aquicultura e para produção de compostos específicos de alto valor agregado, o desenvolvimento de pesquisas que abordem esse tema se torna necessário. Neste trabalho foi avaliado o efeito do aumento da salinidade sobre o crescimento e a composição da biomassa da microalga marinha *Pavlova lutheri* nas fases exponencial e estacionária do crescimento. As respostas da espécie foram avaliadas em salinidades distintas, que variaram entre 35 e 70S. Além da determinação do volume celular médio, foram quantificados os carotenoides, clorofilas *a* e *c*, proteínas hidrossolúveis e glicídeos totais. O aumento da salinidade resultou numa diminuição de 1,5 e 2,5 vezes nos teores de clorofilas *a* e *c*, respectivamente, na fase exponencial do crescimento. Por outro lado, os teores de proteínas hidrossolúveis e glicídeos totais foram aumentados em 1,3 e 4,0 vezes, respectivamente. O envelhecimento da cultura levou a um aumento por volume de cultura de todos os componentes da biomassa estudados, enquanto que o aumento da salinidade afetou negativamente todos os constituintes da biomassa, exceto os glicídeos totais.

ÍNDICE

	Pág.
Capítulo I	
1. Introdução.....	1
1.1. Microalgas e aplicações econômicas.....	1
1.2. As Primnesiofíceas.....	3
1.3. Composição da Biomassa e Salinidade.....	5
Capítulo II	
2. Objetivos.....	9
Capítulo III	
3. Metodologia Experimental.....	10
3.1. Organismo	10
3.2. Meio de cultura.....	10
3.3. Condições de cultivo.....	13
3.4. Crescimento celular.....	13
3.5. Preparação das amostras.....	14
3.6. Extração e dosagem de pigmentos fotossintéticos.....	14
3.7. Determinação dos glicídeos totais.....	15
3.8. Determinação de proteínas hidrossolúveis.....	16
3.9. Determinação do volume celular.....	17
3.10. Análises estatísticas.....	17
3.11. Reagentes.....	18
Capítulo IV	
4. Resultados	19
4.1. Crescimento celular.....	19
4.2. Medida do volume celular.....	21
4.3. Pigmentos fotossintéticos.....	22
4.4. Proteínas hidrossolúveis.....	27
4.5. Glicídeos totais.....	29
Capítulo V	
5. Discussão.....	31
Capítulo VI	
6. Conclusão.....	38
Referências Bibliográficas.....	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microalgas e aplicações econômicas

As microalgas constituem um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação de energia solar em compostos orgânicos através do processo fotossintético. Envolvem enorme diversidade de formas e funções ecológicas. Estes organismos desempenham um importante papel na estruturação das cadeias tróficas aquáticas devido as suas altas taxas de produtividade primária, além de serem de extrema importância nos processos de ciclagem de nutrientes. No ambiente aquático, as microalgas são responsáveis pela maior parte da produtividade primária (Lourenço & Marques Júnior, 2009).

Além da extrema importância na natureza, as microalgas são também aproveitadas em atividades econômicas. Estes organismos apresentam elevadas taxas de crescimento em cultivos, condição que proporciona uma alta produção de biomassa em intervalos de tempo curtos. A produtividade de sistemas que envolvem microalgas é sempre muito superior a de quaisquer culturas agrícolas conhecidas (Pulz & Gross, 2004). Além disso, apresentam vantagem em relação a outros microorganismos heterotróficos (leveduras, bactérias, etc), uma vez que estes últimos requerem moléculas orgânicas para produzir seus metabólitos (Jin & Melis, 2003).

A capacidade de autotrofia é uma maneira direta para converter a energia solar em moléculas orgânicas, embora existam sistemas que funcionam a 2000-4000 metros de profundidade no mar. No entanto, algumas espécies de microalgas ainda têm a capacidade de crescer a partir de carbono orgânico de um metabolismo heterotrófico

e/ou mixotrófico, exibindo várias vantagens sobre aqueles que são exclusivamente autotróficos (Perez-Garcia e col., 2011).

O uso de microalgas em aplicações comerciais envolve atividades bastante diversas. A utilização de microalgas em aquicultura constitui-se numa prática centenária (Lourenço, 2006), e estima-se que cerca de 30% da produção de biomassa algácea seja destinada a alimentação de organismos aquáticos em cultivo (Becker, 2007). Microalgas são necessárias direta ou indiretamente em pelo menos algum estágio do cultivo de animais marinhos (De Pauw e col., 1984) e são essenciais para criação comercial de muitos animais aquáticos, especialmente para larvas e juvenis de moluscos bivalves, camarões e animais do zooplâncton (Heasman e col., 2000; Muller-Feuga, 2000).

Uma variedade de bioprodutos pode ser obtida a partir de microalgas. A partir da fermentação dos carboidratos presentes na biomassa algácea é possível produzir biossolventes como o bioetanol (Takeda e col., 2011), bioacetona, biobutanol (Ellis e col., 2012), e 1,3-propanodiol (Nakas e col., 1983). Lipídeos a partir de microalgas têm sido utilizados na produção de biodiesel (Sathish e col., 2012), e a obtenção do metano como biogás também já foi possível a partir da digestão anaeróbia da biomassa algácea. (Yuan e col., 2011). Das e col. (2012) demonstraram propriedades antibacterianas dos extratos orgânicos da microalga *Euglena viridis*. Além de bioprodutos para o setor energético, o betacaroteno e proteínas produzidos pelas algas também têm sido utilizados como suplementos nutricionais para humanos e animais (Spolaore e col., 2006). Neste contexto, as microalgas podem ser consumidas úmidas ou secas (misturadas a alimentos convencionais) ou podem ser usadas para produzir encapsulados, que consistem essencialmente em biomassa de microalgas seca e prensada, com níveis variáveis de processamento industrial (Lourenço, 2006).

Embora a biomassa de microalgas seja considerada a próxima geração de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, o seu cultivo apenas para este fim em escala comercial parece não ser ainda economicamente viável e sustentável (Clarens e col, 2010; Norsker e col, 2011; Razon e Tan, 2011; Soratana e Landis, 2011). Além disso, algumas espécies de microalgas cultivadas sob condições de estresse também podem acumular metabólitos secundários específicos como, por exemplo, pigmentos, vitaminas, etc., produtos de alto valor econômico, que podem ser aplicados no setor de cosméticos, alimentos ou fármacos (Skjånes e col., 2012). Portanto, a melhoria da viabilidade econômica da produção do biocombustível poderia ser alcançada pelo cultivo simultâneo da microalga com o objetivo de se produzir, de forma combinada, compostos específicos de alto valor e biocombustíveis, num conceito de biorrefinaria, aplicação da biomassa de microalgas que tem ganhando bastante interesse nos dias de hoje (Campenni' e col, 2013.; Carriquiry e col, 2011.; Nobre e col, 2013.; Singh e col, 2011.; Yasar, 2007).

1.2. As *Primnesiofitas*

Pavlova lutheri é uma microalga marinha, unicelular, fitoflagelada pertencente à ordem das Chrysomonadales e a divisão das Primnesiofitas (Haptofitas) (Lourenço, 2006). Essa divisão se divide em duas ordens, as Primnesiales (possuem células com dois flagelos lisos iguais, sem mancha ocelar e com escamas cobrindo a célula) e as Pavlovaes (possuem células que podem apresentar mancha ocelar e são dotadas de dois flagelos desiguais cobertos com cerdas) (Lee, 2008). As algas pertencentes a esta divisão são geralmente encontradas em ambientes marinhos, embora haja registros de espécies de água doce e de ambientes terrestres (Barsanti & Gualtieri, 2006).

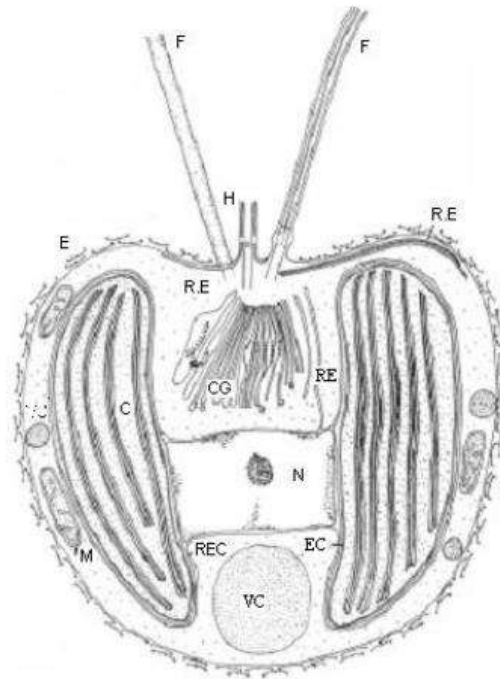


Figura 1. Estrutura celular de uma *Prymnesiophyta*; F (Flagelo), H (Haptonema), E (Escamas), RE (Retículo Endoplasmático), CG (Complexo de Golgi), C (Cloroplasto), M (Mitocôndria), N (Núcleo), REC (Retículo endoplasmático do cloroplasto), EC (Envelope do cloroplasto), VC (Vesícula de Crisolaminarina) (Fonte: Lee, 2008).

Os pigmentos fotossintéticos deste grupo presentes nos cloroplastos das células incluem clorofila a, clorofila c1, clorofila c2 e carotenoides como fucoxantina (geralmente o mais abundante deles), β -caroteno, diadinoxantina, diatoxantina e derivados da fucoxantina, como 19'-hexanoilxifucoxantina e 19'-butanoilxifucoxantina conferindo um aspecto amarelo-dourado. A presença de carotenoides em grande concentração confere a algumas células uma coloração amarelada, dourada ou diversos tons de marrom, mascarando a cor da clorofila (Lee, 2008; Lourenço, 2006; Barsanti & Gualtieri, 2006). O produto de reserva, característico

desta ordem, é um polissacarídeo derivado da glicose formado por ligações glicosídicas do tipo β -1,3, a crisolaminarina (Lee, 2008; Janse e col., 1996). Segundo Lourenço (2006), lipídeos também são acumulados no citoplasma como produto de reserva (Figura 1).

A haptófita *Pavlova lutheri* é amplamente utilizada em aquicultura como alimento vivo para invertebrados marinhos (moluscos, crustáceos, zooplâncton) e particularmente para bivalves (larvas, juvenis e reprodutores) (Webb & Chu, 1983; Borowitzka 1997; Wickfors & Onho, 2001; Brown, 2002; Rico-Villa e col., 2006). *Pavlova lutheri* é uma espécie rica em ácidos graxos poli-insaturados, especialmente EPA (*ácido eicosapentaenoico*) e DHA (*ácido docosaexaenoico*) (Volkman e col., 1989), essenciais para animais marinhos (Kanazawa e col., 1979).

1.3. Composição da Biomassa e Salinidade

Fatores intrínsecos e extrínsecos ao crescimento podem modificar a composição da biomassa algácea em termos de níveis de pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídeos, entre outros (Reitan e col., 1994). Dentre os fatores intrínsecos podem-se destacar a idade da cultura e o tempo de condicionamento das células no meio de cultivo. Como fatores extrínsecos, são relevantes os efeitos da luz, nutrientes, temperatura, pH e salinidade (Richmond 1986; Henley e col., 2002). O crescimento e a produtividade da microalga também podem ser influenciados pela salinidade do cultivo (Parida & Das, 2005). Assim, em viveiros de camarões e moluscos que usam águas de estuários e lagoas costeiras, a salinidade pode ser alterada em função dos processos de evaporação ou precipitação que podem ocorrer nesses corpos d'água. Como consequência, este fenômeno pode afetar a qualidade nutricional em termos de proteína,

lipídeos e carboidratos da microalga usada como fonte de alimento em aquicultura (García e col., 2012).

A salinidade é definida como a medida do total de materiais dissolvidos presente na água do mar. Num senso rigoroso, designar como “sais” o conjunto de substâncias dissolvidas na água do mar é incorreto, uma vez que há componentes não salinos presentes (Lourenço, 2006). Águas costeiras, como regiões entremarés ou lagunas rasas, possuem elevada variação de salinidade. Nestas áreas, onde a massa d’água é mais rasa, os efeitos do balanço evaporação/precipitação podem ser percebidos em poucas horas (Pereira & Soares-Gomes, 2002).

O estresse salino possui dois componentes, o estresse iônico e o estresse osmótico (Joset e col., 1996; Hasegawa e col., 2000). As células, de um modo geral, mantêm uma elevada concentração intracelular de potássio e uma baixa concentração de sódio sob condições ótimas de crescimento. A homeostase intracelular K^+ e Na^+ é importante para o funcionamento de diversas enzimas, para a geração de potencial de membrana e na regulação do volume celular. As células tendem a manter alta a razão K^+/Na^+ mesmo com o aumento de Na^+ durante o estresse salino, utilizando-se, para isso, de transportadores de Na^+ e/ou de K^+ localizados na membrana plasmática (Karandashova & Elanskaya, 2005). A concentração de Cl^- no interior da célula é, em geral, menor do que no ambiente. Quando a concentração de Cl^- no ambiente torna-se extremamente alta, o potencial negativo de membrana dentro da célula ainda garante uma barreira termodinâmica à entrada de Cl^- . Entretanto, durante o choque salino, a entrada de Na^+ despolariza a membrana resultando num influxo de Cl^- ao longo de um gradiente químico (Karandashova & Elanskaya, 2005).

A membrana plasmática possui importante papel nas respostas ao estresse salino (Karandashova & Elanskaya, 2005). A ativação osmótica das proteínas de membrana pode ser sinalizada, principalmente, via: (i) alterações na turgência celular; (ii) deformações elásticas da membrana; (iii) estímulo mecânico originado à partir do exo- ou citoesqueleto das células; (iv) alterações nas propriedades físico-químicas da bicamada lipídica das membranas, alterando as forças locais entre moléculas lipídicas e entre lipídeos e proteínas (Poolman e col., 2002). Na cianobactéria *Synechocystis* sp. o estresse salino promove o aumento da insaturação dos lipídeos de membrana, tornando-a mais fluida e reduzindo sua permeabilidade aos íons H^+ e Na^+ (Joset e col., 1996; Karandashova & Elanskaya, 2005), como também aumenta a atividade e a síntese de sistemas antiporte Na^+/H^+ (Allakhverdiev e col., 1999).

A salinidade é um fator extrínseco ao crescimento que influencia vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados ao crescimento, sendo que muitos organismos, incluindo as microalgas alteram seu metabolismo para se adaptar ao ambiente extremo. (Kan e col., 2012). Nesse caso, as células adotam diferentes mecanismos, incluindo alterações nos padrões morfológicos e de desenvolvimento, bem como nos processos fisiológicos e bioquímicos (Bohnert e col., 1995). A habilidade das microalgas de sobreviverem em ambientes salinos sob influência de estresse osmótico tem recebido considerável atenção uma vez que pode afetar não só o crescimento celular, mas também a formação de lipídeos (Asulabh e col., 2012). Como as algas são habitantes de biótopos caracterizados por variações na salinidade, elas têm ganhado significância em estudos que envolvem tolerância ao sal e têm servido como organismos modelo para uma melhor compreensão da aclimação salina em processos fisiológicos mais complexos (Talebi e col., 2013; Alkayal e col., 2011).

Quando as células são expostas a variações de salinidade, processos específicos como restauração da pressão de turgor, regulação da captura e liberação de íons através da membrana celular e acúmulo de solutos osmoprotetores bem como proteínas relacionadas ao estresse são ativados (Talebi e col., 2013; Allakhverdiev e col., 2000). Estes mecanismos, por sua vez, geram um estresse no interior das células da alga causando um aumento no conteúdo de lipídeos totais que atuam como material de reserva energética até que surjam condições favoráveis (Talebi e col., 2013; Asulabh e col., 2012).

A espécie de microalga *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyceae), é o principal modelo unicelular eucariota fototrófico utilizado em estudos de tolerância ao sal (Fisher e col., 1997) devido sua habilidade de aumentar o crescimento da biomassa e o conteúdo de lipídeos sob estresse salino (Kalpesh e col., 2012). Esta alga é provavelmente o organismo eucariota mais halotolerante que se conhece, o qual, mesmo não possuindo parede celular, tolera uma ampla variação externa da salinidade (0,05 – 5,0M NaCl), mantendo uma baixa concentração intracelular de íons Na⁺, através de inúmeros mecanismos: (1) retraindo-se ou inchando-se imediatamente; (2) sintetizando solutos compatíveis (glicerol); (3) mudando a composição da membrana plasmática e controlando o fluxo iônico através dela; e (4) otimizando a captação de CO₂ em face das limitações severas de dióxido de carbono em meio hipersalino, utilizando-se, para tal, da síntese de uma anidrase carbônica associada à membrana plasmática e resistente ao sal (Fisher e col., 1996).

Embora muitas espécies de microalgas, incluindo cepas marinhas heterotróficas, sejam tolerantes a altas variações de salinidade, sua composição química e conteúdo lipídico podem variar com o estresse salino (Kalpesh e col., 2012; Kirroliia e col., 2011). Quando organismos fotossintéticos são expostos ao estresse salino, ocorre um

aumento na proporção de ácidos graxos insaturados (Asulabh e col., 2012). Por outro lado, o aumento de ácidos graxos saturados e a diminuição dos ácidos graxos insaturados sob alto estresse salino também tem sido reportado (Kan e col., 2012). As algas produzem alguns metabólitos para se proteger contra os danos causados pelo sal e também para ajustar sua osmolaridade (Rao e col., 2007).

Embora vários estudos estejam investigando o impacto da salinidade no crescimento e na composição da biomassa de microalgas marinhas, o efeito do estresse salino no crescimento e na composição da biomassa da microalga marinha *Pavlova lutheri* ainda é pouco conhecido. Nesse sentido, o desenvolvimento de pesquisas que abordem esse tema se torna necessário, tendo em vista a possibilidade de se utilizar essa espécie para finalidades econômicas, como por exemplo, como alimento vivo na aquicultura ou ainda visando o acúmulo de componentes da biomassa como lipídeos e carboidratos como substrato para a produção de bioprodutos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do aumento da salinidade sobre o crescimento e a composição da biomassa da microalga marinha *Pavlova lutheri* nas fases exponencial e estacionária do crescimento.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Organismo

Utilizou-se neste estudo uma cepa da microalga marinha *Pavlova lutheri* (LEAF0301), integrante da Coleção de Microalgas do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (CMLEAF), do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, representada na figura 2. Originalmente esta cepa foi proveniente da Coleção de Microalgas “Elisabeth Aidar” (CMEA), do departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

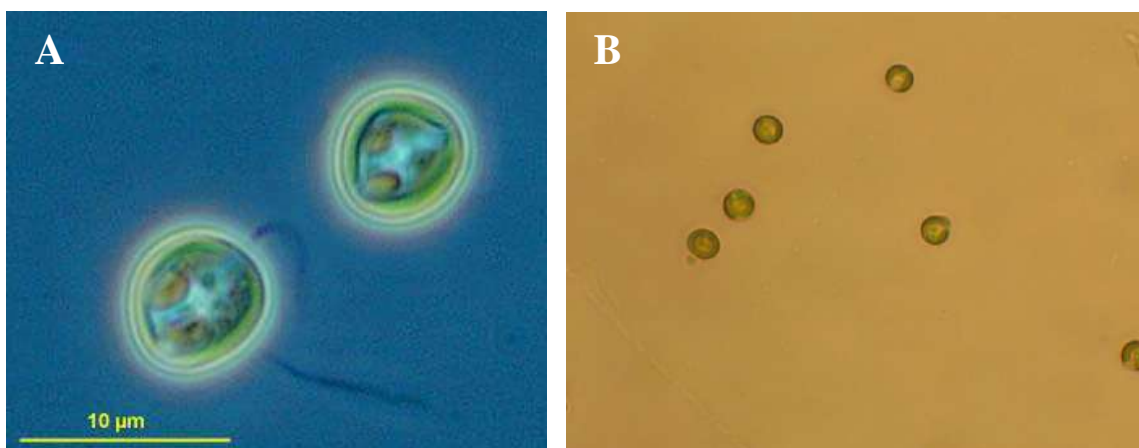


Figura 2. Imagem de *Pavlova lutheri* obtida a partir de microscopia óptica. Fonte: <http://pinkava.asu.edu/starcentral/microscope/portal.php?pagetitle=assetfactsheet&imageid=2622>. (A); Silvia Pope de Araujo – Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (IQ/UFRJ) (B)

3.2. Meio de cultura

O organismo foi cultivado em meio líquido constituído de água do mar enriquecida com nutrientes inorgânicos e orgânicos, resultando no meio designado f/2 (Guillard, 1975), conforme descrito na tabela I. A água do mar, coletada na Área de

Proteção Ambiental de Grumari (APA-Grumari), Rio de Janeiro – RJ, foi filtrada em filtro de acetato de celulose de 0,45 μm de poro (MFS[®]) e filtro de acetato de celulose de 0,22 μm de poro (MFS[®]) para a remoção de material em suspensão, fitoplâncton, bacterioplâncton além de cistos de resistência de fungos. Após a filtração, a água do mar foi autoclavada a 121°C por 30 min. As soluções de nutrientes foram preparadas em água deionizada filtrada em filtro de acetato de celulose de 0,22 μm de poro (MFS[®]) e também autoclavadas a 121°C por 30 min, separadamente da água do mar. A solução de vitaminas não foi autoclavada, tendo sido esterilizada por filtração em filtro de acetato de celulose de 0,22 μm de poro (MFS[®]). Os meios de cultura foram preparados através da adição das soluções de nutrientes à água do mar esterilizada. Para que houvesse o restabelecimento do equilíbrio dos gases dissolvidos, os meios de cultura somente foram utilizados pelo menos 24 h após a esterilização por autoclavagem. A salinidade média dos meios de cultura foi de 35S (35 g/L) e o pH por volta de 8,0. As demais salinidades foram obtidas através da adição de NaCl à água do mar antes de autoclavar. Os valores das salinidades foram ajustados com o auxílio de um refratômetro manual, Shibuya Optical Co., LTD. (modelo S-10).

Tabela I: Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura f/2 modificado, tendo sido desprezadas as concentrações de nutrientes presentes na água do mar.

Macro nutrientes	μM	-
NaNO ₃	880	-
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	36,2	-
Na ₂ SiO ₃	97,35	-
Metais traço	μM	nM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	11,7	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	11,7	-
CoCl ₂ . 6H ₂ O	-	47
CuSO ₄ . 5H ₂ O	-	40
MnCl ₂ . 4H ₂ O	-	910
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-	26
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	-	75
Vitaminas	-	mg/L
Biotina	-	0,5
Cianocobalamina (B ₁₂)	-	0,5
Tiamina HCl	-	100,0

Observação: Originalmente o meio continha Ferro Sequestreno, que foi substituído por FeCl₃ e Na₂EDTA.

3.3. Condições de cultivo

Os cultivos em batelada foram iniciados pela adição de $1,5 \times 10^5$ células por mL e realizados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo, em sala climatizada a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidos a um fotoperíodo de 12:12 h. A iluminação foi provida por conjuntos de lâmpadas fluorescentes dispostas lateralmente (Philips, 23 W, luz branca), que resultou na densidade de fluxo de fótons correspondente a $50 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, medida na superfície externa dos frascos de cultivo. A densidade do fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm) foi estimada por meio de um sensor quântico LI-190SA (Li-Cor Inc., USA) acoplado a um integrador radiométrico LI-250A (Li-Cor Inc., USA). Uma cultura matriz foi mantida separadamente na fase exponencial do crescimento até o final dos experimentos. Cada experimento foi realizado em duplicata e repetido entre três e sete vezes para obtenção das amostras para as análises. Os cultivos em batelada foram homogeneizados manualmente, pelo menos cinco vezes ao dia e, diariamente, as posições dos frascos na bancada de cultivo foram alteradas aleatoriamente.

3.4. Crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado através de contagens do número de células em hemocitômetro Fuchs Rosenthal com auxílio de microscópio óptico (Zeiss, Primo Star). Com este propósito, alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada cultivo, previamente homogeneizado, sendo fixadas e preservadas pela adição de 8 μL de lugol acético. Em cada contagem, pelo menos 400 indivíduos foram registrados, envolvendo uma margem de erro de apenas 10%. A quantidade de células contadas foi multiplicada

pelo fator correspondente à área de contagem para obtenção do valor final, expresso em células/mL (Lourenço, 2006). O crescimento celular foi acompanhado diariamente, durante 10 dias.

3.5. Preparação das amostras

As amostras foram coletadas em dois estágios distintos da curva de crescimento, correspondentes ao final da fase exponencial do crescimento (dia 4) e ao início da fase estacionária do crescimento (dia 8). As membranas contendo a biomassa filtrada foram mantidas a -8°C em recipientes contendo sílica gel até o momento das análises.

Com vistas à determinação de pigmentos (clorofilas, carotenoides) e proteínas hidrossolúveis, 25 mL das culturas foram filtrados em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm de poro (MFS®) no quarto dia de crescimento e 10 mL no oitavo dia. Para a determinação dos glicídeos totais, os mesmos volumes de amostra foram filtrados em membrana de fibra de vidro Whatman GF/F (2,5 cm de diâmetro e porosidade de 0,70 µm). Para cada salinidade utilizada, 2 frascos de cultivo (duplicata) foram preparados para a retirada das amostras. Assim, cada amostra da duplicata foi proveniente de um frasco de cultivo, diminuindo a redução do volume no final dos cultivos em decorrência das coletas das amostras.

3.6. Extração e dosagem de pigmentos fotossintéticos

As clorofilas *a* e *c* e os carotenoides totais foram extraídos com metanol 100% (Porra e col., 1989) e quantificados de acordo com as equações correspondentes para

clorofilas (Jeffrey & Humphrey, 1975) e para carotenoides totais (Wellburn, 1994), abaixo descritas:

$$\text{Chl } a = 13,8 \times \text{DO}_{668} - 1,3 \times \text{DO}_{635}$$

$$\text{Chl } c = 67,3 \times \text{DO}_{635} - 14,1 \times \text{DO}_{668}$$

$$\text{Car.}_{(x+c)} = (1000 \times \text{DO}_{470} - 2,86 \text{ Ca} - 129,2 \text{ Cc}) / 221$$

As concentrações dos pigmentos são obtidas em $\mu\text{g/mL}$ de solvente. Na última equação, Ca e Cc correspondem às concentrações de clorofilas a e c , respectivamente.

A cada tubo contendo a membrana com o concentrado celular, adicionou-se 1,0 mL de metanol 100%. A suspensão resultante foi vigorosamente agitada em aparelho de agitação (tipo “Vortex”) por 30 segundos e o material transferido para tubos de centrífuga de vidro, encapados com papel alumínio. Este ciclo foi repetido até se completar um volume final de 4 mL de metanol. As amostras permaneceram no escuro por 30 min. à temperatura ambiente e, após nova agitação em “Vortex”, foram centrifugadas em centrífuga Sorvall (modelo ST 16R) por 10 min. a 22°C e a 5182 g. As absorvâncias dos sobrenadantes foram estimadas em 635, 668, 470 e 750 nm em espectrofotômetro Shimadzu (modelo U-1800). De cada valor de absorvância utilizado nas equações acima descritas foi diminuída a turbidez registrada em 750 nm.

3.7. Determinação dos glicídeos totais

Os glicídeos totais foram extraídos de acordo com o método descrito por Myklestad & Haug (1972). As membranas, com a face contendo as células voltadas para o fundo, foram colocadas em frascos (tipo “vials”) que se encontravam em banho

de gelo. Após a adição de 2 ml de H_2SO_4 95% - 97% (v/v) e incubação a $4^\circ C$ por 16-20 h, as amostras foram trituradas com bastão de vidro, diluídas com 6 mL de água deionizada e filtradas com auxílio de microfiltradores acoplados a seringas de 5 mL. De cada extrato filtrado, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para tubos de ensaio longos (25 cm) para a determinação de glicídeos totais de acordo com o método de Dubois e col. (1956). Para cada 1 ml de amostra adicionou-se 0,5 ml de fenol 5% (m/v) aquoso e, em seguida, 2,5 ml de H_2SO_4 concentrado (95 - 98%), agitando-se, vigorosamente os tubos, após cada adição do fenol e do ácido. Após 30 min da adição do ácido, os glicídeos foram determinados espectrofotometricamente a 485 nm, utilizando-se glicose como padrão.

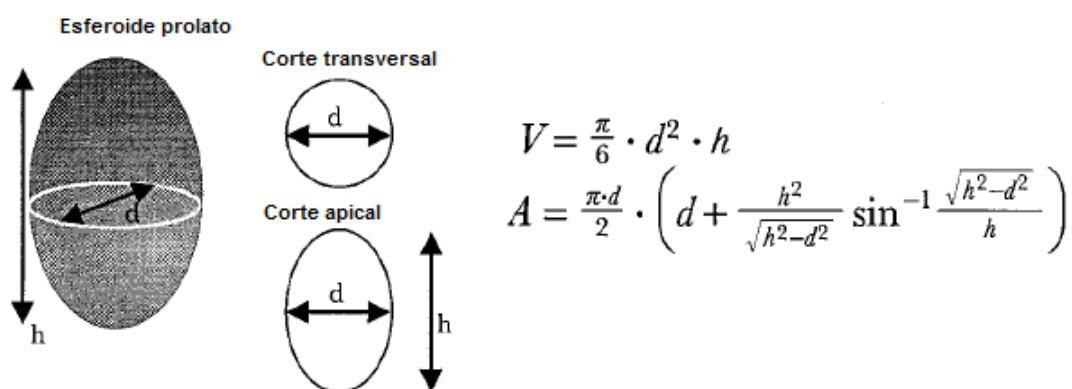
3.8. Determinação de proteínas hidrossolúveis

As proteínas solúveis foram determinadas segundo Lowry e col. (1951). Os filtros contendo o concentrado celular foram colocados em frascos tipo “vials”, adicionando-se, em seguida, 2 mL de água deionizada a cada frasco. Em seguida, as amostras foram maceradas com o auxílio de um bastão de vidro até a completa remoção do concentrado celular da superfície da membrana. Após 24 h à temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL do reagente C, constituído pela mistura de 50 volumes do reagente A (2,0% Na_2CO_3 , m/v, em 0,1N NaOH) para cada 1 volume do reagente B (1 ml de $CuSO_4$ 0,5%, m/v, + 1 ml de $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ 1,0%, m/v). Dez minutos depois da adição do reagente C, as amostras foram filtradas com auxílio de microfiltradores acoplados a seringas de 5 mL e transferidas para tubos de ensaio. A cada tubo adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído com H_2O (1:2, v/v) e, após

30 min, foram feitas as leituras espectrofotométricas à 750 nm. Para a determinação do conteúdo proteico das amostras utilizou-se albumina de soro bovino como padrão.

3.9. Determinação do volume celular

As medidas do volume celular foram realizadas de acordo com os padrões estabelecidos para esta espécie, determinados por Hillebrand e col., (1999). As amostras foram coletadas em estágios distintos do crescimento e as células foram fixadas com lugol acético. No final de cada crescimento, pelo menos 50 células foram medidas em microscópio óptico Zeiss (Axiovert 40C), dotado de lente ocular com escala micrométrica. Segue abaixo a equação utilizada para realização da medida do volume celular de *Pavlova lutheri*.



3.10. Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada nas medições realizadas ao longo do tempo, enquanto que o teste *t* de Student foi aplicado entre as médias obtidas a cada amostragem para os dois tipos de cultivos. Em ambos os casos foi adotado um nível de significância igual a 0,05 (Zar, 1996).

3.11. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água utilizada nas análises foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, U.S.A.).

4. RESULTADOS

4.1. Crescimento celular

A figura 3 representa o crescimento autotrófico em batelada da microalga *P. lutheri* em meio f/2, a 20°C, sob irradiância de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em cinco diferentes concentra\u00e7\u00f5es salinas entre 35 e 70S. O aumento da salinidade resultou num aparecimento de fase “lag”, que durou cerca de 48h para a cultura de 70S. As culturas apresentaram um crescimento exponencial at\u00e9 o 4\u00b0 dia de cultivo e, ent\u00e3o, o crescimento celular entrou em fase de desacelera\u00e7\u00e3o, sendo a fase estacion\u00e1ria atingida a partir do 7\u00b0 dia. A taxa espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento (Tabela II) variou entre $0,70 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ (no cultivo realizado em 35S) e $0,66 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ (no cultivo realizado em 70S) de forma n\u00e3o significativa ($p > 0,05$). O c\u00e1lculo desta taxa correspondeu \u00e0 m\u00e9dia dos coeficientes angulares de tr\u00eas experimentos independentes. Esses coeficientes da regress\u00e3o linear foram obtidos a partir dos valores do logaritmo da concentra\u00e7\u00e3o celular em fun\u00e7\u00e3o do tempo, determinados durante a fase exponencial de crescimento de cada cultivo.

Tabela II: Taxa espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2, a 20°C e irradi\u00e2ncia de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e em cinco diferentes salinidades (35 a 70S). Os valores representam a m\u00e9dia entre tr\u00eas experimentos independentes \pm desvio padr\u00e3o ($n = 3$).

Salinidade	$\mu \text{ (d}^{-1}\text{)}$
35S	$0,70 \pm 0,02$
45S	$0,68 \pm 0,03$
50S	$0,66 \pm 0,03$
60S	$0,63 \pm 0,04$
70S	$0,66 \pm 0,03$

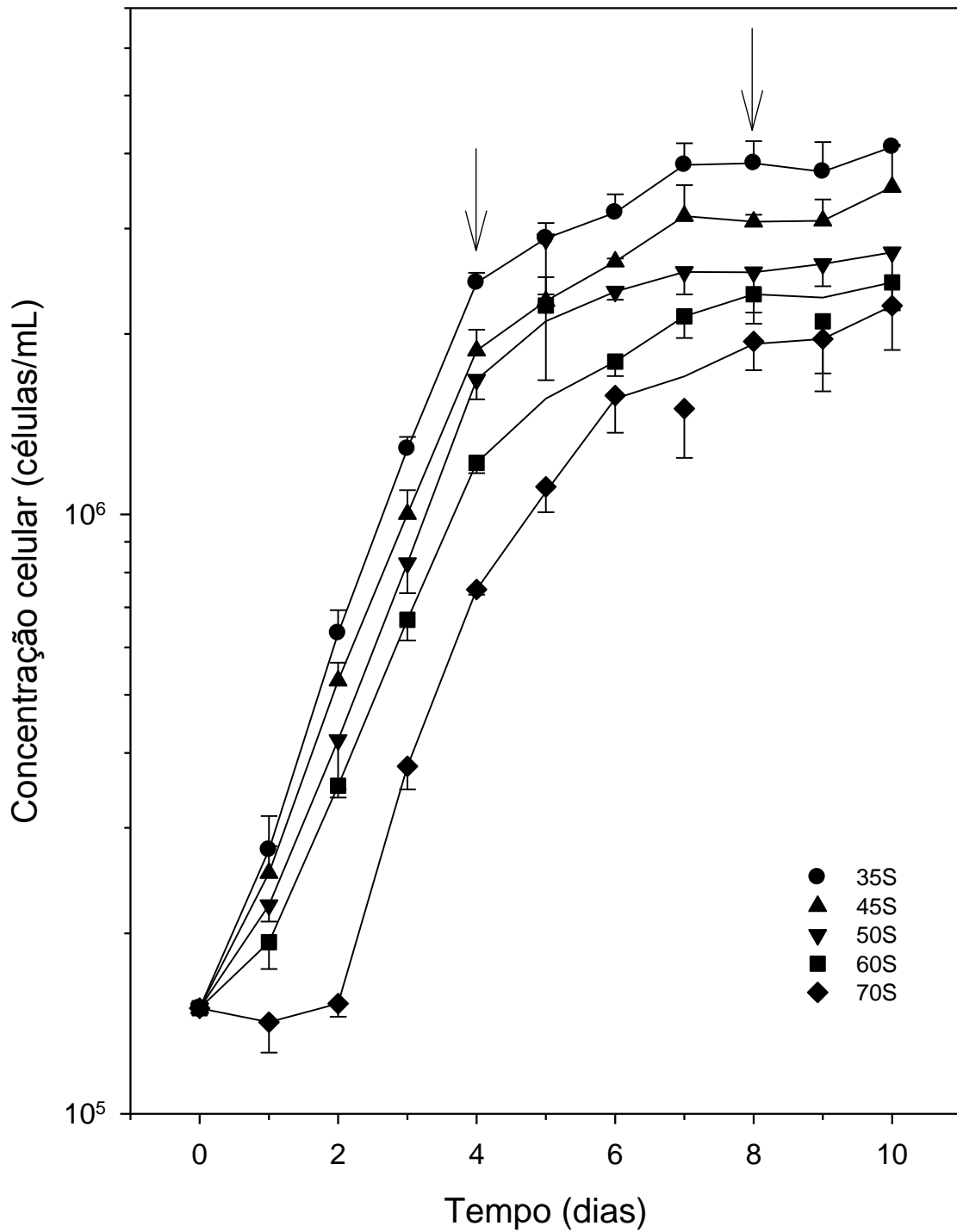


Figura 3: Curvas de crescimento de *Pavlova lutheri* cultivadas a 20°C em meio f/2, sob irradiância de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e em cinco diferentes salinidades (35 a 70S). Cada curva representa a m\u00e9dia de tr\u00eas a sete experimentos independentes ($3 \leq n \leq 7$) e as barras representam o desvio padr\u00e3o em cada ponto. As setas indicam os dias de amostragem para a realiza\u00e7\u00e3o das an\u00e1lises bioqu\u00edmicas.

4.2. Medida do volume celular

A figura 4 mostra que os volumes celulares médios foram essencialmente iguais nas salinidades de 35, 45 e 50S, independente da fase de crescimento. Entretanto, nas duas maiores salinidades, o volume celular apresentou um aumento, principalmente na fase estacionária de crescimento. Pode-se observar que o envelhecimento da cultura levou a um aumento significativo de 19% do volume celular quando as células foram cultivadas em salinidade de 70S ($t < 0,01$).

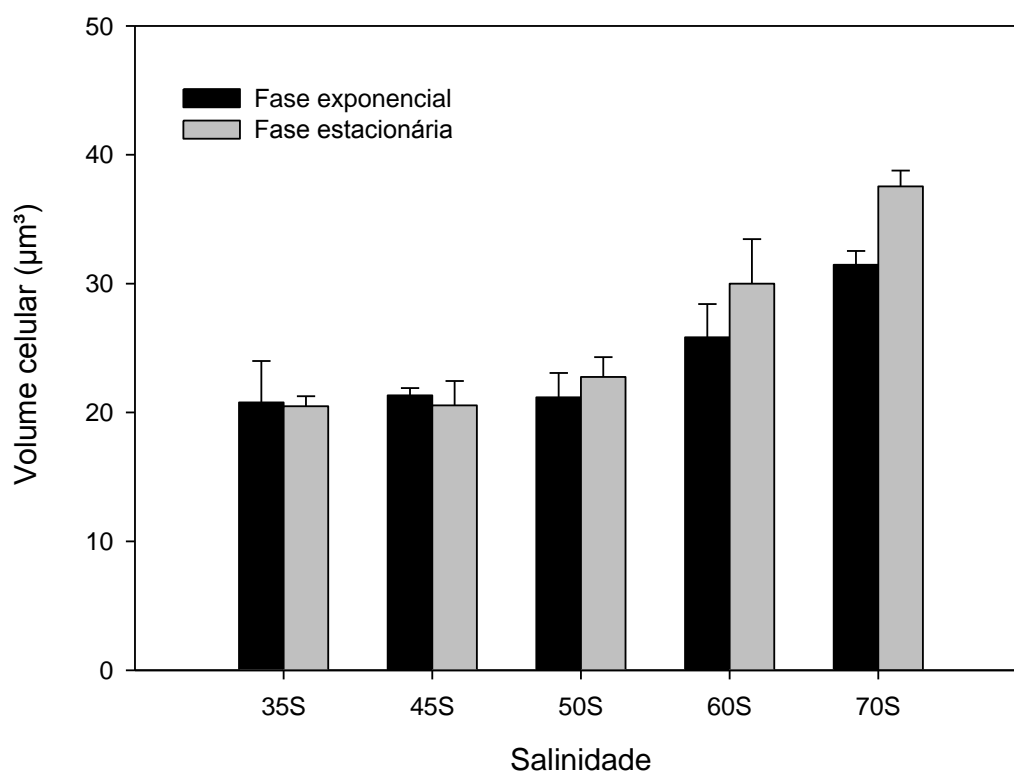


Figura 4: Variações dos volumes celulares médios de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2 contendo diferentes salinidades e em fases distintas do crescimento celular conforme indicado na figura. Cada ponto representa a média de quatro experimentos independentes \pm desvio padrão ($n = 4$).

4.3. Pigmentos fotossintéticos

Alterações nos teores dos pigmentos fotossintéticos foram observadas tanto em função do tempo de cultivo, quanto da salinidade do meio. De modo geral, observou-se uma diminuição na concentração de todos os pigmentos (clorofilas e carotenoides) em função do aumento da salinidade e, contrariamente, um aumento em função do envelhecimento da cultura (Figuras 5-7).

Quando o conteúdo em pigmentos fotossintéticos foi expresso por mL de cultura pôde-se observar uma redução progressiva desses pigmentos em função do aumento da salinidade (Figuras 5-7, B). Comparativamente, na fase exponencial do crescimento, o aumento da salinidade de 35S para 70S levou a uma redução de aproximadamente cinco vezes no conteúdo de clorofila *a*, oito vezes no conteúdo de clorofila *c* e duas vezes no conteúdo de carotenoides totais. Essa redução foi menos expressiva na fase estacionária do crescimento, quando o conteúdo em clorofila *a*, *c* e carotenoides reduziram 2,3, 4,5 1,6 vezes respectivamente. O envelhecimento da cultura também levou a um aumento significativo ($t < 0,05$) de aproximadamente duas vezes no conteúdo em pigmentos fotossintéticos na cultura controle (35S) e, quando as células foram expostas a 70S, esse aumento foi de aproximadamente quatro vezes para o conteúdo em clorofilas e de 2,5 vezes no conteúdo em carotenoides totais.

Quando o conteúdo em pigmentos fotossintéticos foi expresso por células (Figuras 5-7, A) pode-se observar que o aumento da salinidade promoveu uma variação apenas no conteúdo em clorofilas *a* e *c*. Na fase exponencial do crescimento, o aumento da salinidade de 35S para 70S levou a uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 1,5 vezes no conteúdo de clorofila *a* e de 2,5 vezes no conteúdo em clorofila *c*. Durante a fase estacionária do crescimento, o aumento da salinidade de 35S

para 45S resultou num aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo em clorofila *a*, que reduziu significativamente 1,8 vezes na maior salinidade. Para os teores de clorofila *c*, essa redução foi de 3,4 vezes quando as células foram submetidas à maior salinidade. O envelhecimento da cultura também levou a um aumento ($t < 0,05$) no conteúdo em pigmentos fotossintéticos na cultura controle (35S) e, quando as células foram expostas a 70S, esse aumento foi de aproximadamente 1,3 vezes apenas para o conteúdo em clorofilas.

A comparação entre os teores das clorofilas e carotenóides presentes nas cinco condições de salinidade mostrou que as maiores variações foram encontradas em termos de clorofila *c*. Por outro lado, clorofila *a* e carotenóides parecem ter sido menos afetados em decorrência do aumento da salinidade conforme foi apresentado nesse estudo.

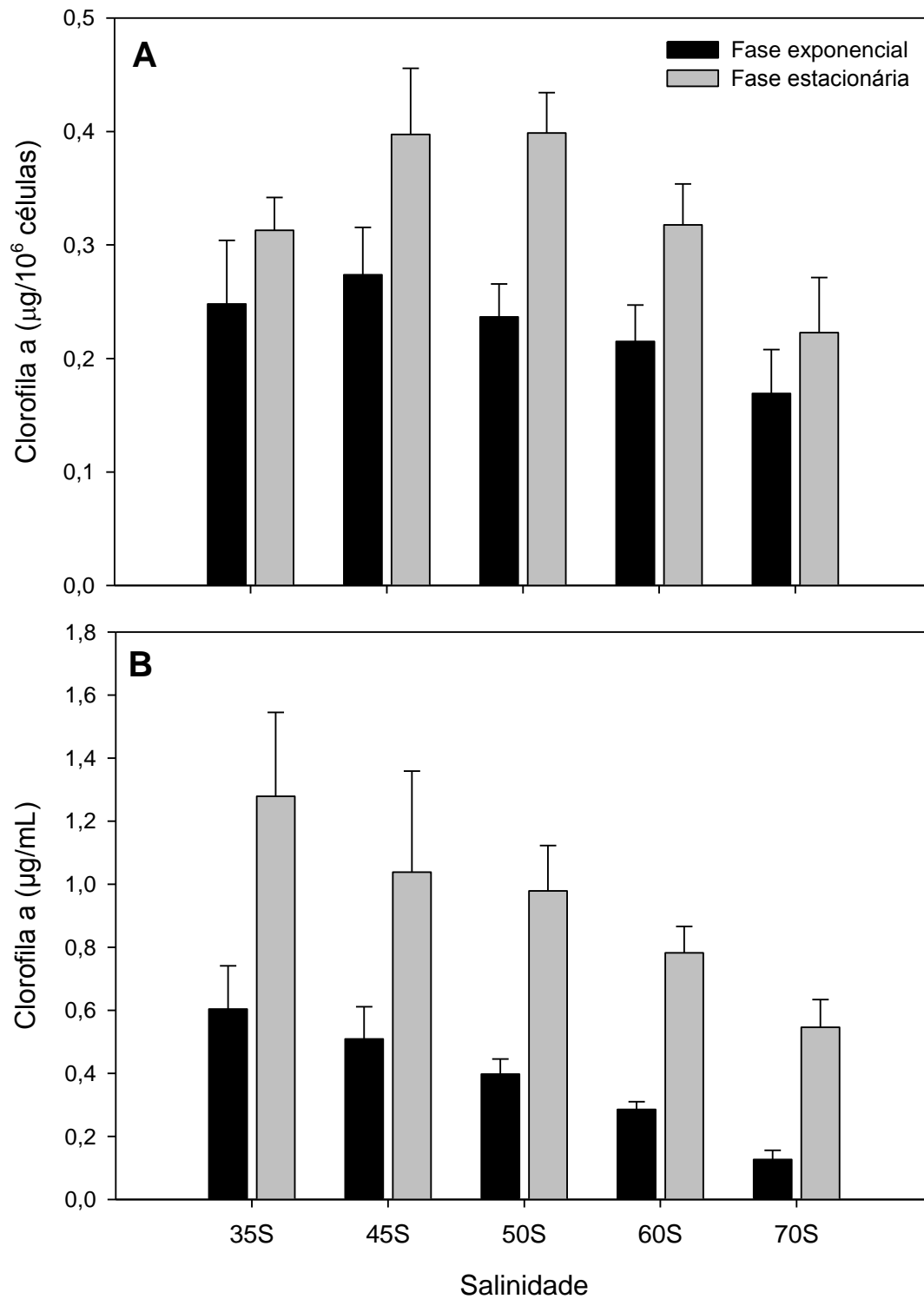


Figura 5: Comparação dos teores de clorofila *a* normalizados por número de células (A) e por volume de cultura (B) de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2 contendo diferentes salinidades, conforme indicado na figura. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão ($n=3$).

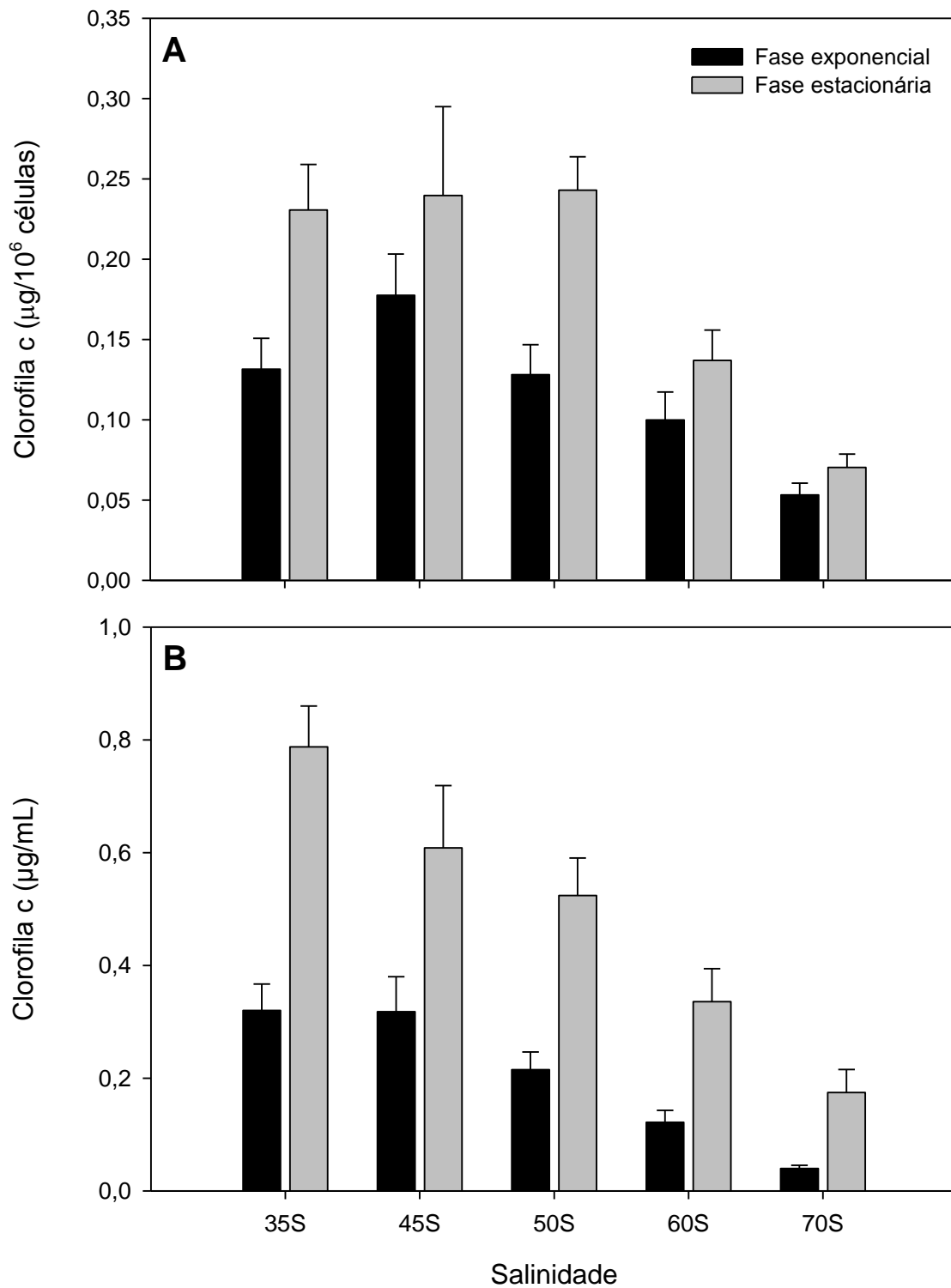


Figura 6: Comparação dos teores de clorofila *c* normalizados por número de células (A) e por volume de cultura (B) de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2 contendo diferentes salinidades, conforme indicado na figura. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n=3).

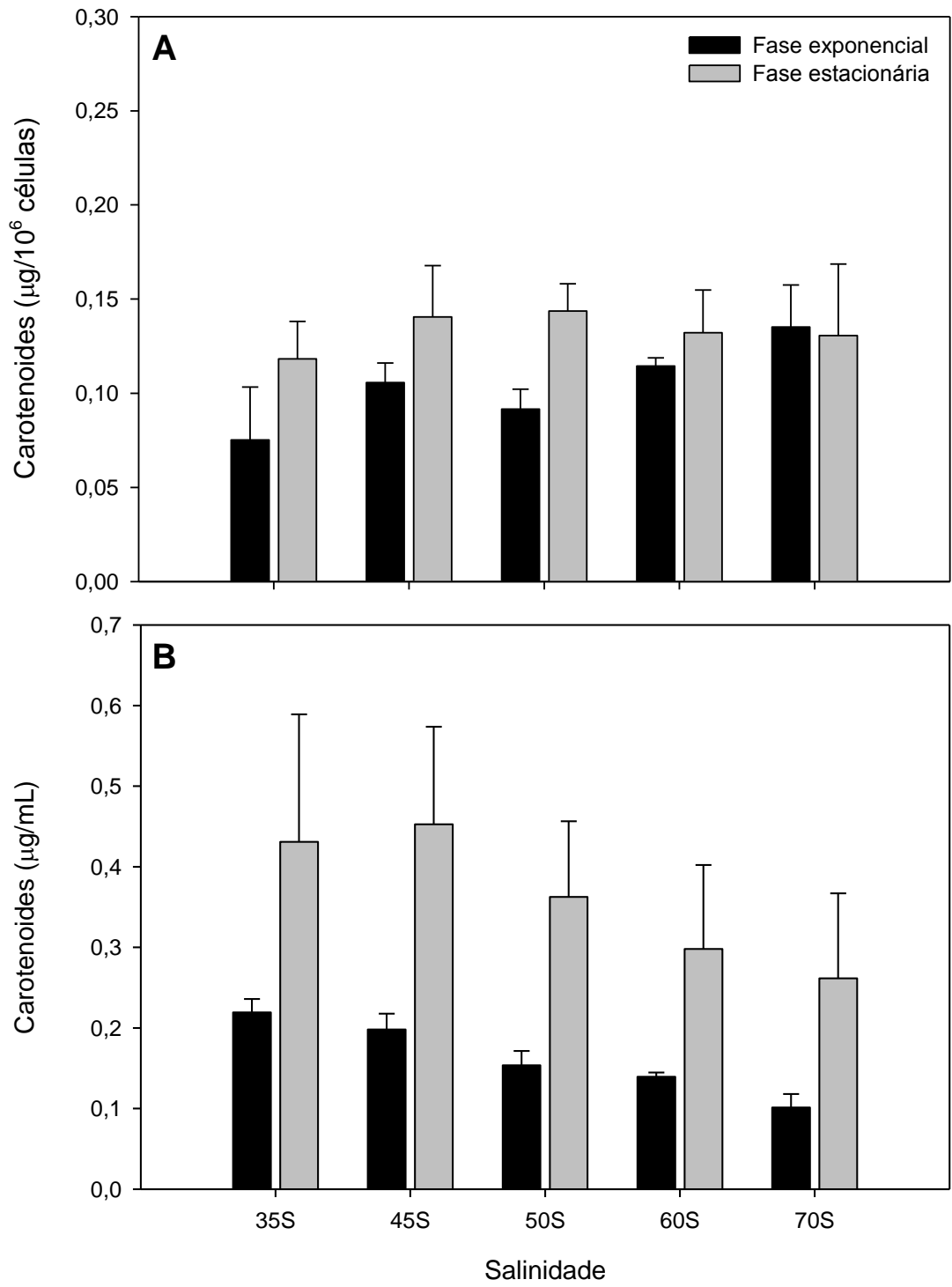


Figura 7: Comparação dos teores de carotenoides totais normalizados por número de células (A) e por volume de cultura (B) de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2 contendo diferentes salinidades, conforme indicado na figura. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n =3).

4.4. Proteínas hidrossolúveis

As alterações observadas para os teores de proteínas hidrossolúveis ocorreram, de modo geral, quando as células foram submetidas às maiores salinidades e os resultados normalizados por número de células.

Quando o conteúdo em proteínas foi expresso por número de células (Figura 8-A) pode-se observar na fase exponencial do crescimento um aumento significativo de 1,3 vezes no conteúdo deste componente da biomassa quando a salinidade foi aumentada de 60S para 70S. Na fase estacionária do crescimento, esse mesmo aumento pode ser observado a partir da salinidade de 50S, sem alterações significativas ($p > 0,05$) até a maior salinidade de cultivo utilizada. De um modo geral, o envelhecimento da cultura não levou a alterações no conteúdo em proteínas das células em função do aumento da salinidade.

Quando o conteúdo em proteínas hidrossolúveis foi normalizado por mL de cultura, o aumento da salinidade de 35S para 70S resultou numa diminuição ($p < 0,05$) de 2,0 vezes neste conteúdo durante a fase exponencial do crescimento (Figura 8-B). Por outro lado, durante a fase estacionária do crescimento, o aumento da salinidade de 35S para 45S resultou numa redução significativa ($p < 0,05$) do conteúdo em proteínas, que não variou com o aumento da salinidade até 70S. O envelhecimento da cultura levou a um aumento ($t < 0,05$) no conteúdo em proteínas hidrossolúveis de 1,8 vezes na cultura controle e 2,5 vezes na cultura com a maior salinidade.

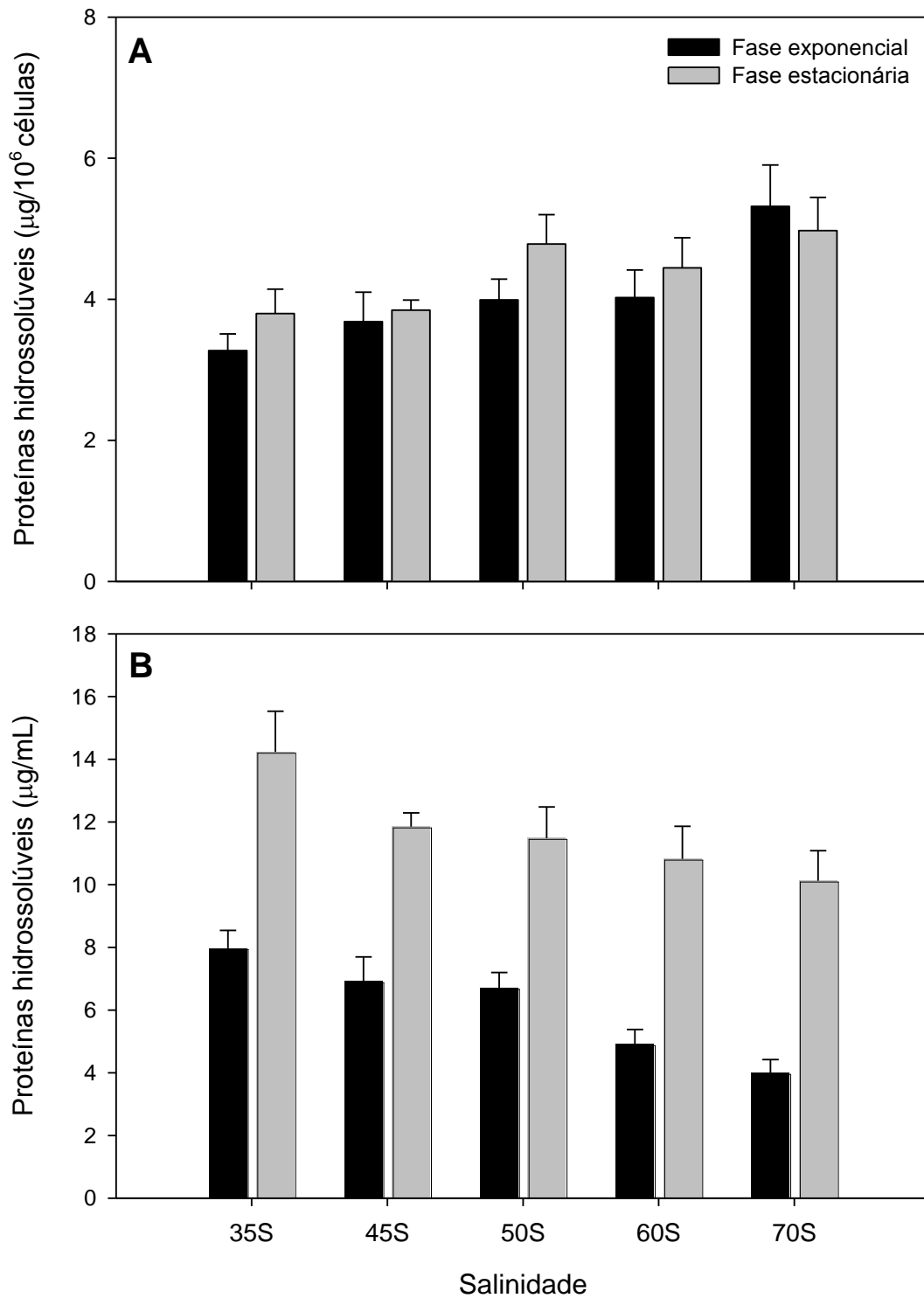


Figura 8: Comparação dos teores de proteínas hidrossolúveis normalizados por número de células (A) e por volume de cultura (B) de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2 contendo diferentes salinidades conforme indicado na figura. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n =3).

4.5. Glicídeos totais

O aumento da salinidade do meio de cultura resultou em alterações nos teores de glicídeos totais, de modo geral, quando se comparou os resultados obtidos entre a menor e a maior salinidade e quando os resultados foram normalizados por número de células.

Quando o conteúdo em glicídeos foi expresso por número de células (Figura 9-A) pode-se observar na fase exponencial do crescimento um aumento significativo de 4,0 vezes no conteúdo deste componente da biomassa quando a salinidade foi aumentada de 35S para 70S, sendo que este aumento foi mais acentuado quando a salinidade foi aumentada de 60S para 70S. Na fase estacionária do crescimento, um aumento progressivo dos glicídeos foi observado em função do aumento da salinidade e a variação obtida entre a menor e a maior salinidade foi de 1,7 vezes. O envelhecimento da cultura não afetou o conteúdo deste componente da biomassa nas duas maiores salinidades de cultivo ($t > 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos teores de glicídeos totais em função do aumento da salinidade em nenhuma das duas fases estudadas quando o conteúdo em glicídeos totais foi normalizado por mL de cultura (Figura 9 - B). Por outro lado, o envelhecimento da cultura levou a um aumento médio ($t < 0,05$) de 2,7 vezes no conteúdo em glicídeos totais na microalga estudada.

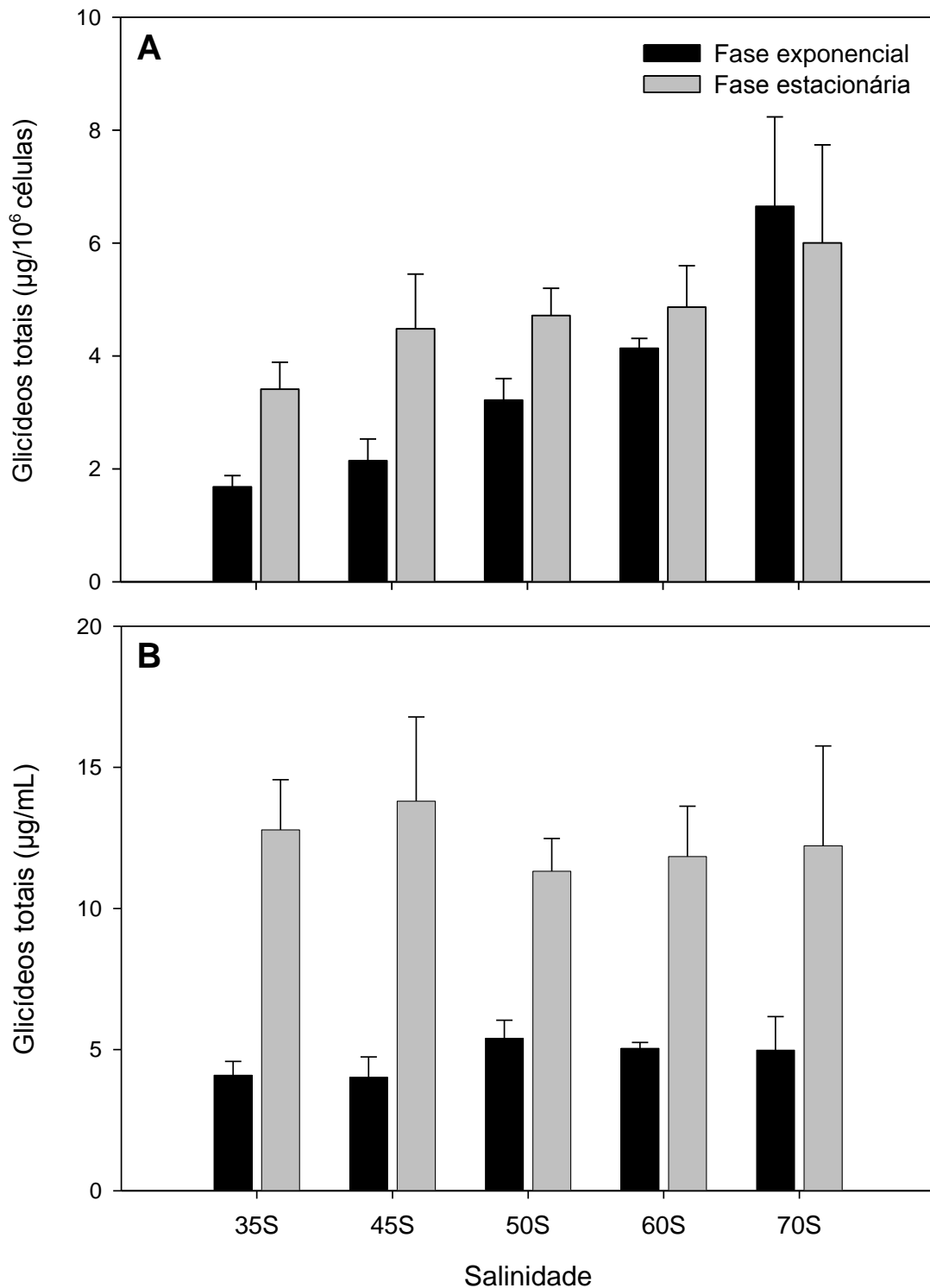


Figura 9: Comparação dos teores de glicídeos totais normalizados por número de células (A) e por volume de cultura (B) de *Pavlova lutheri* cultivada em meio f/2 contendo diferentes salinidades conforme indicado na figura. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n=3).

5. DISCUSSÃO

O estresse salino pode causar múltiplas alterações bioenergéticas e bioquímicas nos organismos fotossintéticos. Essas alterações incluem modificações no padrão de crescimento celular e metabolismo das biomoléculas, nas taxas do processo fotossintético e alterações da permeabilidade da membrana (Tarchevsky, 2002; Hahn, 1996; De Wit e col., 1997; Neumann, 1989). O conhecimento e a avaliação dessas alterações são essenciais para a compreensão dos mecanismos de adaptação adotados pelas células quando submetidas ao estresse salino.

O cultivo em batelada de *Pavlova lutheri* em meio f/2 apresentou um padrão de desenvolvimento bem definido, com fases de crescimento exponencial, de desaceleração e fase estacionária. Por outro lado, a concentração salina de 70S promoveu o aparecimento de uma fase “lag”. Isto acontece, porque para se adaptar ao estresse salino, as células adotam diferentes mecanismos, incluindo alterações nos padrões morfológicos e de desenvolvimento, bem como nos processos fisiológicos e bioquímicos (Bohnert e col., 1995). Expressão de “bombas iônicas” e alteração dos ácidos graxos constituintes da biomassa lipídica resultando em modificação da fluidez da membrana são exemplos de modificações que a célula pode adotar no sentido de se aclimatar a essas mudanças no ambiente. Assim, pode-se observar que o aumento da salinidade induziu um retardo tanto no início do crescimento quanto no início da fase estacionária, provavelmente porque o gasto energético despendido pela célula na tentativa de manter a pressão de turgor é muito alto, resultando na diminuição do crescimento e da produtividade (Kirst, 1989). De acordo com Sudhir & Murthy (2004) e Mahajan & Tuteja (2005), a redução do crescimento de organismos fotossintéticos quando expostos a elevadas concentrações de sal pode ser atribuída a uma

superprodução de espécies reativas de oxigênio, que causam estresse oxidativo, inativação de enzimas e redução na taxa fotossintética. Neste trabalho, o aumento da salinidade levou a uma redução progressiva no rendimento final das culturas, que pode estar relacionada ao estresse oxidativo ocasionado pelo aumento da salinidade.

A taxa de absorção de carbono inorgânico, respiração, produtividade e a eficiência do crescimento celular são influenciadas pelo tamanho da célula (Blasco e col., 1982). De acordo com González-Del Valle (1997), células menores tendem a apresentar uma eficiência de crescimento maior e vice-versa. A avaliação do volume celular tem sido de grande importância para a determinação dos processos de aclimação e variação de condições ambientais. Nesse sentido, culturas dotadas de menores volumes celulares geralmente apresentam maiores taxas de crescimento, ao passo que, aquelas que apresentam maior volume celular, apresentam taxas de crescimento menores. Tais resultados devem estar associados à maior eficiência na absorção de nutrientes por células menores, devido à maior razão superfície-volume destas células (Lavin & Lourenço, 2005), bem como a diferenças em atividade de enzimas associadas ao metabolismo de nutrientes (Lourenço, 2006). Embora esta seja uma observação frequente na literatura, *Pavlova lutheri* não apresentou este comportamento. As taxas específicas de crescimento desta célula não variaram significativamente com o aumento da salinidade, nem com o aumento significativo do biovolume nas duas maiores salinidades. Esse mecanismo pode apontar para um comportamento específico das primnesiofíceas ou ainda pode indicar uma característica espécie-específica.

Em cultivos de laboratório, a quantidade de luz que atravessa uma cultura é muito mais determinada pela densidade celular do que pela quantidade de luz que incide na superfície do frasco de cultivo, ou seja, a quantidade de luz disponível para cada

indivíduo torna-se cada vez menor na medida em que aumenta a concentração da cultura (Schaefer & Golden, 1989). O aumento significativo de clorofilas *a* e *c* observado nesse trabalho pode ser uma confirmação desse efeito natural de sombreamento da cultura com o aumento da densidade celular, independente do aumento da salinidade (Figuras 5-A e 6-A). Assim, pode ter ocorrido um aumento no tamanho das antenas distais do fotossistema II nessas células, para compensar a diminuição da quantidade de luz disponível em decorrência do aumento da concentração da cultura. Por outro lado, o aumento da salinidade resulta numa diminuição no conteúdo em clorofilas como consequência da redução da taxa fotossintética devido ao estresse osmótico e do estresse iônico do sal (Moradi & Ismail, 2007). Muitos estudos prévios reportaram a diminuição no conteúdo em clorofilas como resultado do cultivo realizado em altas concentrações de salinidade (Vonshak e col., 1996). Também tem sido reportado que a clorofila é o alvo principal da toxicidade do sal, resultando na redução da fotossíntese e redução do crescimento (Rai, 1990; Rai & Abraham 1993). Neste estudo, o aumento da salinidade afetou principalmente reduzindo o conteúdo em clorofila *c* (Figura 6), dentre os pigmentos fotossintéticos analisados. Esse resultado sugere uma redução no tamanho das antenas distais do fotossistema II nessas células, em decorrência do aumento da salinidade da cultura. De forma semelhante ao encontrado em *P. lutheri*, o conteúdo em clorofilas totais de *Chlorella vulgaris* foi estimulado em baixas concentrações de NaCl (0,1 e 0,2M) quando comparados ao controle e, em altas concentrações (0,3 e 0,4M), esse conteúdo foi reduzido (Hiremath & Mathad, 2010).

Allakhverdiev e col. (2000) mostraram que tanto o efeito osmótico quanto o efeito iônico do sal estão envolvidos na inativação do aparato fotossintético na cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC 7942, submetida ao estresse salino. Para tal, eles

compararam os efeitos da adição de 1M de sorbitol sobre a atividade fotossintética, com os efeitos da adição de 0.5M de NaCl. Na medida em que a osmolaridade é influenciada apenas pela concentração de partículas em solução e não pela natureza das mesmas, e como o sorbitol não possui efeito iônico, foi possível isolar os dois efeitos e compará-los com os resultados obtidos quando a célula foi submetida ao estresse salino. Assim, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, não foi possível distinguir se as variações observadas em *P. lutheri* foram resultantes do efeito da osmolaridade ou da força iônica.

Trabalhos anteriores com algas mostram, em geral, um aumento na concentração de carotenoides em função do estresse salino, ao contrário da concentração de clorofilas, que variam de diversas maneiras, dependendo da espécie estudada (Schubert & Hagemann, 1990; Schubert e col.,1993; Verma & Mohanty, 2000; Lu & Vonshak, 2002). Os carotenoides exibem propriedades antioxidantes e também podem ser aplicados como aditivos em suplementos alimentares (Campo e col., 2007; Christaki e col.; 2013; Yuan e col., 2011). Sua síntese é afetada pela variação das condições de cultivo e seu acúmulo é induzido quando a célula é exposta a algum tipo de estresse (Lemoine & Shoefs, 2010). A síntese de carotenoides é aumentada na presença de espécies reativas de oxigênio, que são produzidas em condições de estresse (Gouveia e col., 1996; Kobayashi, 2003). Neste trabalho, houve uma tendência ao aumento nos teores de carotenoides na maior salinidade utilizada, além de um aumento dos carotenoides em função do envelhecimento para as salinidades de 35 a 60S (Figura 7-A). Esse aumento pode também ser observado à medida em que a razão carotenoides/clorofila total foi aumentada aproximadamente três vezes em função do aumento da salinidade de cultivo.

Uma característica marcante observada em cultivos de microalgas é a relação entre as concentrações de proteína e de carboidratos durante o crescimento. As proteínas são o componente da biomassa de maior importância quantitativa na fase exponencial de crescimento e mantêm uma relação inversa com os níveis de carboidratos (Uriarte e col., 1993). De maneira geral, há um aumento no conteúdo de produtos não nitrogenados e uma redução dos produtos nitrogenados com o envelhecimento da cultura. Assim, os níveis de proteína tendem a diminuir enquanto que os níveis de carboidratos ou de lipídeos aumentam. O estudo comparativo de acumulação de produtos durante o envelhecimento das culturas de *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, realizado por Utting (1985), mostrou que enquanto *Tetraselmis* acumulou glicídeo como produto não nitrogenado, *Isochrysis* acumulou lipídeos. Assim, pode-se perceber que o tipo de produto não nitrogenado acumulado com o envelhecimento da cultura tende a variar de acordo com cada espécie estudada. Lee (2008) relata que as primnesiofíceas, de um modo geral, acumulam preferencialmente glicídeos como produto de reserva. Assim, neste trabalho, o envelhecimento da cultura levou a um aumento de 2,0 vezes no conteúdo de glicídeos totais presentes nas células cultivadas na salinidade controle (Figura 9-A).

Muitos estudos prévios reportaram que a síntese de glicídeos pode ser estimulada em condições de estresse. Gill e col. (2002) observaram que açúcares solúveis desempenham um importante papel na regulação osmótica das células durante a reprodução e condições de estresse. Dentre os diferentes solutos que se acumulam em resposta ao estresse, os açúcares podem desempenhar papel fundamental para a manutenção da regulação osmótica da célula. Assim, o aumento no conteúdo de açúcares pode ser uma medida de adaptação ao estresse salino. Neste trabalho, um aumento de até 4 vezes no conteúdo celular (Figura 9-A) em termos de glicídeos totais

foi observado quando a salinidade foi aumentada de 35 para 70S, na fase exponencial do crescimento. Verificou-se ainda que este aumento foi acompanhado pelo aumento do volume celular. Segundo Lee (2008), altas concentrações de glicídeos na célula podem se refletir em modificações que levam a um aumento nos volumes celulares. Assim, pode-se propor uma relação direta entre o acúmulo de glicídeos e aumento do volume celular devido à maior quantidade de água de hidratação decorrente do aumento do polissacarídeo. A Figura 9-B mostra que o estresse salino não afetou a concentração de glicídeos totais, expresso por mL de cultura, em nenhuma das duas fases de crescimento analisadas. Dessa forma, é possível dizer que o aumento da salinidade não contribuiu para o aumento da produtividade de glicídeos totais.

Em condições de estresse, as microalgas reduzem sua capacidade de sintetizar proteínas e aumentam a síntese de lipídeos e carboidratos (War e col., 1985; Tomaselli e col., 1987). *Chlorella vulgaris* apresentou uma redução no conteúdo de proteínas totais em todas as concentrações de NaCl utilizadas (Hiremath & Mathad, 2010). Hagemann e col. (1990) observaram um bloqueio completo na síntese de proteínas em cianobactérias sob estresse salino. Por outro lado, o aumento da salinidade resultou num aumento da síntese de proteínas em *Scenedesmus quadriculata* (Kirrolia e col., 2011). Neste trabalho, um aumento de 1,3 vezes no conteúdo em proteínas hidrossolúveis foi observado na maior salinidade utilizada durante a fase exponencial do crescimento. Embora a literatura retrate comportamentos distintos com relação à variação desse componente da biomassa em resposta ao estresse salino, não foi possível identificar as causas que justifiquem as variações encontradas para *P. lutheri*.

O efeito do aumento da salinidade em *Pavlova lutheri* foi avaliado e, em termos gerais, pode-se observar um aumento no conteúdo celular em glicídeos totais e proteínas. Conseqüentemente, o volume celular também foi aumentado. Assim, o

estresse salino poderia beneficiar os cultivos “outdoor”, uma vez que, em altas salinidades pode-se reduzir a contaminação ocasionada tanto por predadores quanto por competidores. Por outro lado, o aumento no conteúdo celular em níveis de proteínas e glicídeos pode contribuir para melhoria no valor nutricional dessa célula, na medida em que *P. lutheri* é amplamente utilizada como alimento vivo em aquicultura.

6. CONCLUSÕES

De modo geral, o estresse salino resultou em uma diminuição de todos os componentes da biomassa em termos de produtividade, exceto para os glicídeos totais, os quais os resultados foram essencialmente os mesmos para todas as salinidades analisadas.

Dessa forma, o cultivo de *P. lutheri* sob estresse salino com o intuito de super expressar os componentes da biomassa não é vantajoso.

Assim, a única vantagem que o estresse salino poderia trazer, seria em relação aos cultivos “outdoor”, uma vez que, em altas salinidades pode-se reduzir a contaminação ocasionada tanto por predadores quanto por competidores.

Por outro lado, para alcançar a viabilidade econômica destes cultivos, *P. lutheri* poderia ser cultivada simultaneamente com o objetivo de se produzir, de forma combinada, num conceito de biorrefinaria, compostos específicos de alto valor como metabólitos secundários, que podem ser aplicados no setor de cosméticos, alimentos ou farmacêutica.

Além disso, esses mesmos organismos poderiam ser utilizados como alimento vivo em aquicultura e ainda para a produção de biocombustíveis, pois, embora a biomassa de microalgas seja considerada a próxima geração de matéria-prima para a produção dos mesmos, seu cultivo apenas para este fim em escala comercial parece não ser ainda economicamente viável e sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkayal, F., Albion, R.L., Tillett, R.L., Hathwaik, L.T., Lemos, M.S., Cushman, J.C., 2011. Expressed sequence tag (EST) profiling in hyper saline shocked *Dunaliella salina* reveals high expression of protein synthetic apparatus components. *Plant Sci.* 179: 437-449.
- Allakhverdiev, I.S., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N., 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus sp.* *Plant Physiol.* 123 (3): 1047-1056.
- Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Suzuki, I., Tasaka, Y. & Murata, N., 1999. Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5862-5867.
- Asulabh, K.S., Supriya, G., Ramachandra, T.V., 2012. Effect of salinity concentrations on growth rate and lipid concentration in *Microcystis sp.*, *Chlorococcum sp.* and *Chaetoceros sp.* In: LAKE: National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems, pp. 27-32.
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2006. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology.* London, Taylor & Francis, 301p.
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25(2): 207-10.
- Blasco, D., Packard, T.T. & Gardfield, P.C., 1982. Size dependence of growth rate, respiratory electron transport system activity and chemical composition in marine diatoms in the laboratory. *J. Phycol.* 18: 58-63
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., & Jonsen, R.G., 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393-401.
- Brown, M.R., 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, D., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola. VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, Cancun, Mexico, pp. 281-292.
- Campenni', L., Nobre, B.P., Santos, C.A., Oliveira, A.C., Aires-Barros, M.R., Palavra, A.M., Gouveia, L., 2013. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 1383-1393.

- Campo, J., García-González, M. & Guerrero, M., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1163-1174.
- Campos, V.B., Barbarino, E., Lourenço, S.O., 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural* 40(2): 339-347.
- Carriquiry M.A., Du, X., Timilsina, G.R., 2011. Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy* 39: 4222-4234.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. & Florou-Paneri, P., 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. *J Sci Food Agric* 93: 5-11.
- Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A., Colosi, L.M., 2010 Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environ. Sci. Technol.* 44: 1813-1819.
- Das, B.K., Pradhan, J., Pattnaik, P., Samantaray, B.R., Samal, S.K., 2012. Production of antibacterials from the freshwater alga *Euglena viridis* (Ehren). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 45-50.
- De Pauw, N., Morales, J., Persoone, G., 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hydrobiologia*. 116/117: 121-134.
- De Wit, P.J.G.M., Lauge, R., Honee, G., Joosten, M.H.A.J., Vossen, P., Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., Vervoort, J.J.M., 1997. Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 71: 137-141.
- Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton P.A., Rebers J.K., & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (3): 350-356.
- Ellis, J.T., Hengge, N.N., Sims, R.C., Miller, C.D., 2012. Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresource Technology* 111 (0), 491-495.
- Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U. & Zamir, A. 1997. A structurally novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *J. Biol. Chem.* 272(3): 1565-1570.
- Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U. & Zamir, A., 1996. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem.* 271(30): 17718-17723.

- García, N., López-Elías, J.A., Miranda, A., Martínez-Pochas, M., Huerta, N. & García, A., 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 40: 435-440.
- González-Del Valle, M.A., 1997. Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés. M.Sc. thesis. Universidad de Sevilla, España, 157p.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J., 1996. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 57: 157-163.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates In: W.L. Smith & M.H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, pp. 29-60.
- Hagemann, M., Wolfel, L. & Kruger, B., 1990. Alterations of protein synthesis in *Synechocystis Sp.* PCC 6803 after salt shock. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1393-1399.
- Hahn, M.G., 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 387-412.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. & Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular response to high salinity. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T., Foulkes, L., 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. *Aquaculture Research* 31: 637-659.
- Henley, J.W., M.K. Major & L.J. Hironaka. 2002. Response to salinity and heat stress in two halotolerant Chlorophyte algae. *J. Phycol.* 38: 757-766.
- Hillebrand, H., Durselen, C-D., Kirschtel, D., Pollinger, U. & Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35: 403-424.
- Hiremath, S. & Mathad, P., 2010. Impact of salinity on the physiological and biochemical traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *J. Algal Biomass Utiln.* 1: 51-59.
- Janse, L., Rijssel, M.V., Gottschal, J.C., Lancelot, C., Gieskes, W.W.C., 1996. Carbohydrates in the North Sea during spring blooms of *Phaeocystis* a specific fingerprint. *Aquatic microbial ecology.* 10: 97-103.
- Jeffrey, S. M. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167:191-4.
- Jin, E., Melis, A., 2003. Microalgal biotechnology: carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 8: 331-7.

- Joset, F., Jeanjean, R. & Hagemann, M., 1996. Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: deciphering the molecular events. *Physiol. Plant.* 96: 738-744.
- Kalpesh, K.S., Holger, S., Peer, M.S., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5: 1532-1553.
- Kan, G., Shi, C., Wang, X., Xie, Q., Wang, M., Wang, X., Miao, J., 2012. Acclimatory responses to high-salt stress in *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae) from Antarctica. *Acta. Oceanol. Sin.* 31: 116-124.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K., 1979. Relationships between the essential fatty acid requirement of aquatic animals and their capacity for bioconversion of linoleic acid to highly unsaturated fatty acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 295-298.
- Karandashova, V. & Elanskaya, V., 2005. Genetic control and mechanisms of salt and hyperosmotic stress resistance in cyanobacteria. *Russ. J. Gen.* 41(12): 1311-1321.
- Kirroliaa, A., Bishnoia, R.N., Singh, N., 2011. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *J. Algal Biomass Utln.* 2: 28-34.
- Kirst, G. O., 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 21-53.
- Kobayashi, M., 2003. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioproc.* 8: 322-330.
- Lavín, P.L. & Lourenço, S.O., 2005. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures. *Brazilian Journal of Oceanography* 53: 55-67.
- Lee, R.E., 2008. *Phycology*. 4th ed. Cambridge University Press, UK, 547p.
- Lemoine, Y. & Schoefs, B., 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: amultifunctional response to stress. *PsynR* 106: 155-177.
- Lourenço, S.O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 606p.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, C. & Vonshak, A., 2002. Effects of salinity on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiol. Plant.* 114: 405-413.

- Mahajan, S. & Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139-158.
- Markou, G., Nerantziz, E., 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*. 31: 1532-1542.
- Moradi, M. & Ismail, A.M., 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS – Scavenging systems to salt stress. During seedling and reproductive stages of Rice. *Ann. Botany* 99: 1161-1173.
- Muller-Feuga A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12: 527-534.
- Myklestad, S. & Haug, A., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 125-136.
- Nakas, J.P., Schaedle, M., Parkinson, C.M., Coonley, C.E., Tanenbaum, S.W., 1983. System development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 1017-1023.
- Neumann, D., Nover, L., Parthier, B., Rieger, R., Scharf K.D., Wollgiehn, R., Nieden, U.Z., 1989. Heat-shock and other stress response systems of plants. *Biol. Zentralbl.* 108: 1-146.
- Nobre, B.P., Villalobos, F., Barragán, B.E., Oliveira, A.C., Batista, A.P., Marques, P.A., Mendes, R.L., Sovová, H., Palavra, A.F., Gouveia, L., 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga - extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresour Technol* 135:128-36.
- Norsker, N.H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnol Adv.* 29: 24-7.
- Parida, A.K. & Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox. Environ. Safe.* 60: 324-349.
- Pereira, R.C., Soares-Gomes, A., 2002. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 382p.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45: 11-36.
- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H.A., Friesen, R.H.E., Moe, P.C. & Van Der Heide, T., 2002. How do membrane protein sense water stress? *Mol. Microbiol.* 44(4): 889-902.

- Porra, R.J., Thompson, W.A. & Kriedemana, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 975: 384-394.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635-48.
- Rai, A.K. & Abraham, G., 1993. Salinity tolerance and growth analysis of the cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Bulletin of Environmental contamination and Toxicology* 51: 724-731.
- Rai, A.K., 1990. Biochemical characteristics of photosynthetic response to various external salinities in halotolerant and fresh-water cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 69: 177-180.
- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A., 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.* 98: 560-564.
- Razon L.F., Tan R.R., 2011. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. *Appl. Energy.* 88: 3507-3514.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30: 972-979.
- Richmond, A., 1986. *Cell response to environmental factors*. In: A. Richmond (ed.). Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, pp. 69-99.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256: 377-388.
- Sathish, A., Sims, R.C., 2012. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. *Bioresource Technology* 118, 643-647.
- Schaefer, M.R. & Golden, S.S., 1989. Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *J. Bacteriol.* 171: 3973-3981.
- Schubert, H. & Hagemann, M., 1990. Salt effects on 77k fluorescence and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters* 71: 169-172.
- Schubert, H., Fulda, S. & Hagemann, M. 1993. Effects of adaptation to different salt concentrations on photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6083. *J. Plant Physiol.* 142: 291-295.

- Silva, A.F., 2003. *Influência da deficiência de nitrogênio sobre a composição da biomassa e a atividade fotossintética de Hillea sp. (Chryptophyceae)*. Rio de Janeiro, 73 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D., 2011. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresour Technol* 102: 26-34.
- Skjånes, K., Rebours, C., Lindblad, P., 2012. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33: 172-215.
- Soratana, K. & Landis, A.E., 2011. Evaluating industrial symbiosis and algae cultivation from a life cycle perspective. *Bioresour. Technol.* 102: 6892-6901.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.
- Sudhir, P. & Murthy, S.D.S., 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42: 481-486.
- Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W. & Murata, K., 2011. *Energy Environ. Sci.* 4: 2575-2581.
- Talebi, A.F., Tabatabaei, M., Mohtashami, S.K., Tohidfar, M., Moradi, F., 2013. Comparative salt stress study on intracellular ion concentration in marine and salt-adapted freshwater strains of microalgae. *Not. Sci. Biol.* 5: 309-315.
- Tarchevsky, I.A., 2002. Plant cell signaling systems. Moscow, Science, 294p.
- Tomaselli, L., Torzillo, G., Giovanetti, L., Pushparaj, B., Bocci, F., Tredici, M., Pupuazzo, T., Balloni, W. & Meterassi, R., 1987. Recent research on *Spirulina* in Italy. *Hydrobiol.* 151: 79-82.
- Uriarte, I., Farias, A., Hawkins, A.J.S. & Bayne, B.L., 1993. Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella primilecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen. *J. Appl. Phycol.* 5: 447-453.
- Utting, S.D., 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.* 4: 175-190.
- Verma, K. & Mohanty, P., 2000. Changes of the photosynthetic apparatus in *Spirulina cyanobacterium* by sodium stress. *Z. Naturforsch.* 55C: 16-22.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D., 1989. Fatty acid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.

- Vonshak, A.N., Kancharaksa, B. Bunang & M. Tanticharoen, 1996. Role of Light and Photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacteria *Spirulina platensis* to salinity stress. *J. Appl. Phycol.* 8: 119-124.
- Warr, S.R.C., Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R. & Stewart, W.D.P., 1985. Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. *Planta* 163: 424-429.
- Webb, K.L., Chu, F.L.E., 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition World Mariculture Society Sp. Publ. No. 2. Louisiana State University, pp. 272-291.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant. Physiol.* 144: 307-313.
- Wikfors, G.H., Ohno, M., 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J. Phycol.* 37: 968-974.
- Yaşar, D., 2007. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272: 717-722.
- Yuan, J.P., Peng, J., Yin, K. & Wang, J.H., 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res* 55: 150-165.
- Yuan, X., Shi, X., Zhang, D., Qiu, Y., Guo, R., Wang, L., 2011. Biogas production and microcystin biodegradation in anaerobic digestion of blue algae. *Energy Environ. Sci.* 4: 1511-1515.
- Zar, J. H. (1996). *Biostatistical Analysis*. 3rd ed., Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, USA, 920p.