

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA SÍNTESE DE
FICOCIANINA POR *Nostoc* sp. E *Anabaena variabilis*

Warley Rosa Cunha

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA SÍNTESE DE
FICOCIANINA POR *Nostoc* sp. E *Anabaena variabilis*

Warlley Rosa Cunha

Prof.^a Dr.^a Juliana de Souza Ferreira
Faculdade de Engenharia Química/UFU

Msc. Arthur Godoy Cottas
Doutorando do PPGEQ/FEQ/UFU

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA SÍNTESE DE
FICOCIANINA POR *Nostoc* sp. E *Anabaena variabilis*

Warlley Rosa Cunha

Prof.^a Dr.^a Juliana de Souza Ferreira
Faculdade de Engenharia Química/UFU

Msc. Arthur Godoy Cottas
Doutorando do PPGEQ/FEQ/UFU

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Coordenador do Curso

Uberlândia - MG
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA SÍNTESE DE
FICOCIANINA POR *Nostoc* sp. E *Anabaena variabilis*

Warley Rosa Cunha

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Prof.^a Dr.^a Juliana de Souza Ferreira
Faculdade de Engenharia Química/UFU

Uberlândia, 18 de Dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Prof.^a Dr.^a Juliana de Souza Ferreira e ao Msc. Arthur Godoy, por tornar possível a realização dessa pesquisa, por orientar e trabalhar em conjunto.

Agradeço por esta universidade e pelo ambiente, principalmente pelos laboratórios da Faculdade de Engenharia Química que tanto me proporcionou. Aos órgãos de fomento (FAPEMIG, CNPq, CAPES), pelo auxílio financeiro para o projeto.

Aos meus pais e familiares pelo apoio e compreensão. Um agradecimento especial ao Marcos Fernandes, um dos pontos de apoio mais fortes que tive durante o curso.

Gratidão pelos amigos que este curso proporcionou, principalmente ao Germano Yoneda, Lara Alves e Victória Finzi.

Verdadeiramente grato.

RESUMO

Cianobactérias são um grupo de microrganismos autótrofos fotossintetizantes capazes de produzir diversos compostos de interesse comercial, como álcoois, ácidos orgânicos e pigmentos. Estes microrganismos possuem vários tipos de pigmentos, como clorofila a, b e c, betacaroteno e ficobiliproteínas (FBP) e, dentre as FBP, destaca-se a ficocianina (FC), que é um pigmento de cor azulada. Esta proteína tem propriedades fluorescentes que são usadas em kits de imunoensaio e na indústria alimentícia como o agente de coloração natural. Com finalidade de investigar o efeito da composição do meio de cultivo em relação ao aumento da concentração celular e à obtenção de FC da cepa de *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp., foi avaliada a suplementação ao meio de cultivo basal (BG11₀) com diferentes concentrações de glicose (0 a 10 g/L) e de nitrato de sódio (0 a 5 mM). Os melhores resultados obtidos foram com o meio enriquecido com glicose 2 g/L e nitrato de sódio 5 mM, obtendo-se 0,28 g/L de célula e 18,6 µg/mL de FC para *Anabaena variabilis* em 10 dias e de 0,56 g/L de célula e 48,73 µg/mL de FC para *Nostoc* sp. em 14 dias. O aumento da concentração celular foi de aproximadamente 2 vezes para ambas cepas, e para a concentração de FC cerca de 50% para *Nostoc* sp. e 29% para *Anabaena variabilis* de aumento em relação ao meio basal.

Palavras-chave: Cianobactérias, Fotofermentação, Ficocianina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CIANOBACTÉRIAS	1
1.2. FICOBILIPROTEÍNAS	2
1.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO	4
2. OBJETIVOS.....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. MATERIAL	7
3.2. METODOLOGIA	7
3.2.1. Manutenção das cianobactérias	7
3.2.2. Avaliação do efeito da suplementação do meio com fonte de carbono e de nitrogênio na produção de ficocianina.....	8
3.2.3. Métodos Analíticos.....	11
3.2.3.1. Concentração celular	11
3.2.3.2. Concentração de açúcares.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.3.3. Concentração de ficocianina.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Avaliação do efeito da concentração de glicose e nitrato de sódio na suplementação do meio basal BG11 ₀ no cultivo de <i>Nostoc</i> sp.	13
4.2. Avaliação do efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio na suplementação do meio controle BG11 ₀ no cultivo de <i>Anabaena variabilis</i>	20
5. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO 1	32
ANEXO 2	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são organismos procariontes, unicelulares e fotossintéticos encontradas na presença de luz, com as formas unicelular, multicelular ou filamentosa (WHITTON; POTTS, 2012). São classificadas como microalgas e pertencem ao Filo *Chlorophyta*, pois possuem clorofila e pigmentos fotossintéticos, como as ficobiliproteínas (FBP), responsáveis pela capacidade de captura de energia luminosa e iniciar o processo de fotossíntese (OLAIZOLA, 2003). Estes microrganismos têm grande importância histórica na evolução da Terra, pois estima-se que eles participaram na oxigenação da atmosfera (KASTING; SIEFERT, 2002).

O *habitat* destes microrganismos varia de áreas superficiais do solo até grandes ou pequenos reservatórios de água poluídos ou não, indicando baixo custo de cultivo. Em geral, as cianobactérias realizam fotossíntese, utilizando energia luminosa e CO₂ como fonte de carbono, majoritariamente. Porém, algumas cepas de cianobactérias assimilam, dependente da luz, nutrientes de compostos orgânicos para manutenção da vida das mesmas (PRASANNA et al., 2004). Esta vantagem vem sendo estudada, para a maior produção e obtenção de biomassa, exopolissacarídeos e pigmentos, como as ficobiliproteínas (HALLENBECK, 2012).

Além disso, as cianobactérias demonstraram crescimento fotoheterotrófico na presença e na ausência de luz, pois são fotoautotróficas não obrigatórias e podem crescer em ambientes autotrófico, mixotrófico e heterotrófico (SKLERYK et al., 2002). Ainda pode-se citar que muitas cepas, assim como a *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp, possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em forma de heterocisto, camadas com paredes espessas, que dificultam a troca de gases e mantém o meio intracelular essencialmente anaeróbico. (STAL, 2003; WHITTON; POTTS, 2012). Esta característica adaptativa corrobora com as evidências fósseis

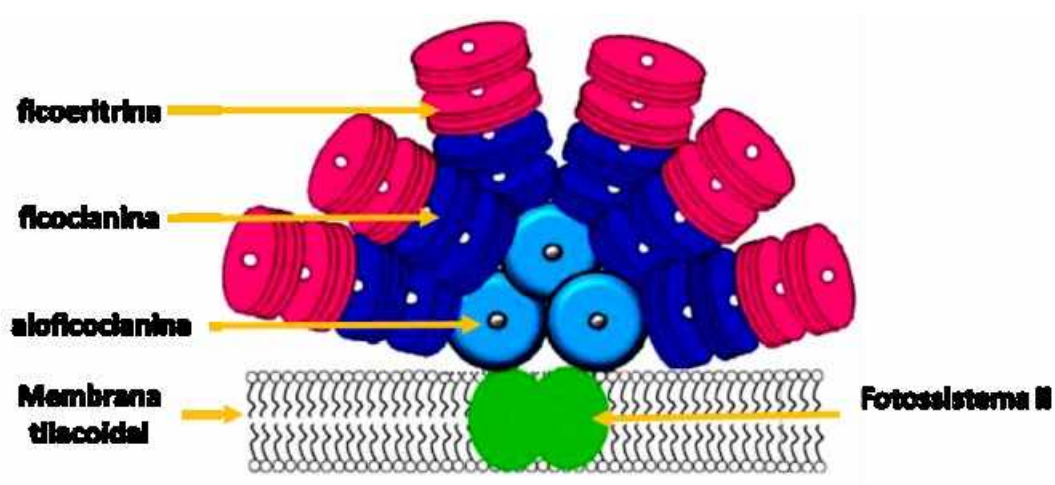
encontradas nas cianobactérias indicando origem há mais de 3500 milhões de anos (SCHOPF, 1993).

As cianobactérias dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena* produzem uma diversidade de produtos, sendo as toxinas os mais conhecidos (JAISWAL et al., 2008). Apesar disso, estudos vêm sendo realizados analisando o potencial destes microrganismos na produção de compostos bioativos, como peptídeos, ácidos graxos e alcaloides com ações, antifúngicas, antitumorais, antivirais e outras (TAN, 2007; SCHRADER; DAYAN, 2009).

1.2. FICOBILIPROTEÍNAS

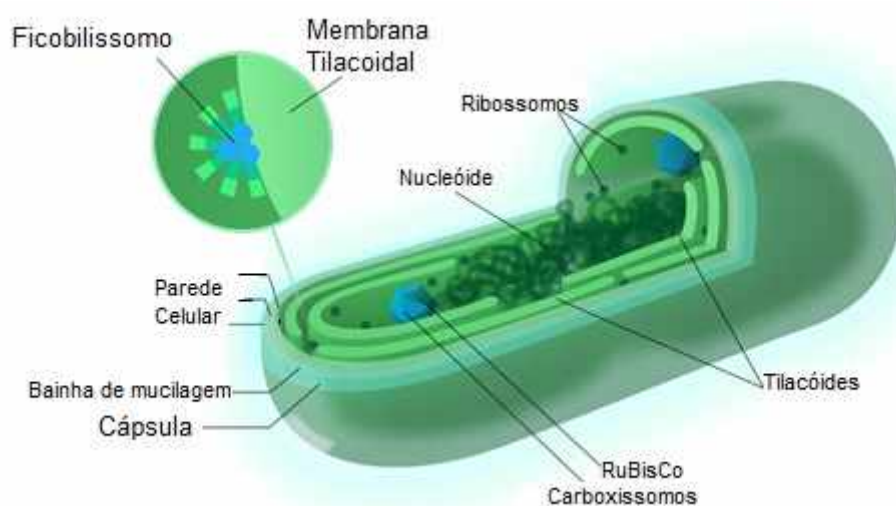
As cianobactérias possuem um sistema composto por fotossistemas I, II e clorofila a, além de apresentarem também outros pigmentos denominados ficobiliproteínas. As três principais ficobiliproteínas encontradas nas cianobactérias são: ficoeritrina (FE, $\lambda_{\text{max}} = \sim 540 - 570$ nm, vermelho), ficocianina (FC, $\lambda_{\text{max}} = \sim 610 - 620$ nm, azul) e aloficocianina (AFC, $\lambda_{\text{max}} = \sim 600 - 680$ nm, azul). Uma representação de um ficobilissomo é apresentada na Figura 1.

Figura 1-Estrutura do Ficobilissomo



Fonte: Adaptado de Sonani *et al.* (2016).

A ficobiliproteína de maior destaque e quantidade é a ficocianina, que possui coloração azul, e devido essa importância na sua coloração, as cianobactérias receberam o nome de algas azuis (STAL, 2007). As ficobiliproteínas são encontradas em uma estrutura complexa chamada membrana tilacoidal, que possui papel importante na captação de luz e transferência de energia para a reação de fotossíntese (VISKARI; COLYER, 2003; RASTOGI et al., 2015). Uma representação visão geral da organização de cianobactérias e da membrana tilacoidal é apresentada na Figura 2.



Fonte: Adaptado de Ducat *et al.* (2011).

A energia transferida por estes sistemas tem início na FE, segue em FC, AFC e clorofila a, com cerca de 90% de eficiência no fluxo de transferência da energia captada (PORTER et al., 1978). Além disso, as ficobiliproteínas representam até cerca de 60% do conteúdo total de proteína da célula (VISKARI; COLYER, 2003) e apresentam papel importante no estoque de nitrogênio, pois aparentemente sofrem degradação em baixas concentrações de nitrogênio ou alta intensidade de luz (SLOTH et al., 2006).

Das diversas aplicações das FBP, uma destas é o uso como corantes naturais. Os corantes desempenham papel importante na indústria alimentícia substituindo parcial ou completamente os corantes artificiais, agregando valor nutricional e redução de toxicidade dos alimentos (PRADO e GODOY, 2009, ORES, 2014).

As ficobiliproteínas possuem grande importância como ferramenta para o diagnóstico de doenças, agindo como marcadores fluorescentes em imunoenaios, citometria de fluxo, detecção de espécies reativas de oxigênio, histoquímica e atuando como agentes terapêuticos. (RODRIGUES, 2015, HEMLATA *et al.*, 2018).

1.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As formas de alterar a concentração de ficobiliproteínas mais estudadas estão entre a modificação da fonte de carbono, de nitrogênio e de luz no cultivo das cianobactérias (FAY, 1983). A fonte de carbono influencia na formação dos macronutrientes, como carboidratos, lipídeos e proteínas. O cultivo mixotrófico das cianobactérias do grupo *Nostoc*, principalmente utilizando fontes de carbono como glicose, sacarose e melaço de cana de açúcar, resulta em maior produção de ficobiliproteínas, em especial a FE apesar de apresentar menor proporção que FC (BORSARI, 2007).

O cultivo das cianobactérias em diferentes características da luz, como a qualidade e a quantidade, também pode influenciar a composição das ficobiliproteínas. Na maioria dos grupos de cianobactérias, altas taxas de intensidade luminosa causa queda do número de proteínas no ficobilissomo, do número de complexo por célula e de clorofila a (PORTER *et al.*, 1978; SENDERSKY *et al.*, 2005).

Em relação à fonte de nitrogênio, algumas espécies podem apresentar menores níveis de ficobiliproteínas na presença de fontes de nitrato, como alguns gêneros de *Nostoc* (LEE,

2017) e outras espécies apresentam menor conteúdo de FE e maior de FC, como *Calothrix* sp. (LIOTENBERG, 1996).

Estes fatores que influenciam a produção dos pigmentos podem ser combinados a fim de estudar o sinergismo e atingir maior síntese das proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os diferentes tipos de meio de cultura variando a concentração de fonte de carbono e de nitrogênio para definir a condição que promove a maior produção de biomassa e ficocianina nas cepas de cianobactérias *Anabaena variabilis* ATCC 29413 e *Nostoc* sp. PCC 7423.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência na produção de ficocianina e no crescimento celular, para as cianobactérias *Nostoc* sp.e *Anabaena variabilis* analisando:
 - ✓ Concentração de glicose como fonte de carbono suplementado ao meio basal (BG11₀);
 - ✓ Concentração de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio suplementado ao meio basal (BG11₀).
- Determinar a melhor condição de suplementação e a melhor porcentagem de inóculo para as duas cepas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram avaliadas duas cepas de cianobactérias, *Nostoc* sp.PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC 29413, que foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG/RS). Todos os materiais utilizados na produção dos diferentes meios, nas análises e nos ensaios foram os disponíveis comercialmente.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Manutenção das cianobactérias

O cultivo das cianobactérias foi realizado em meio BG11₀ cuja composição é apresentada nas Tabelas A.1 e A.2 do Anexo 1, preparado com água deionizada, e foram mantidas sob temperatura de 30°C, intensidade luminosa de 1533 lux com fotoperíodo de 12 h em ambiente aeróbico, sendo o repique realizado a cada 15 dias.

As cianobactérias foram cultivadas em frascos de Erlenmeyers de 125, 250, 500 e 1000 mL em câmaras de fotoperíodo adaptadas com lâmpadas fluorescentes. As células foram transferidas para outros frascos de Erlenmeyers em uma concentração conhecida para os ensaios de diferentes meios de cultura.

Para realizar o repique e o preparo dos ensaios de fermentação, toda a vidraria e os meios de cultivo utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min, a fim de evitar uma possível contaminação. Os frascos foram inoculados em Câmara de Fluxo Laminar de segurança biológica com superfície interior descontaminada com álcool 70% e luz ultravioleta por 15 min.

As duas cepas foram usadas nos ensaios para: (i) investigação do efeito da suplementação de fonte de carbono e (ii) de nitrogênio na produção de ficocianina e concentração celular por cianobactérias por fotofermentação.

3.2.2. Avaliação do efeito da suplementação do meio com fonte de carbono e de nitrogênio na produção de ficocianina

Foram avaliadas diferentes concentrações de glicose e nitrato de sódio (NaNO_3) como fonte de nitrogênio, suplementados ao meio basal para determinar a melhor condição do meio para a produção de biomassa e de ficobiliproteínas.

Os ensaios de fotofermentação foram realizados em batelada usando 40% de volume útil de Erlenmeyers de 125 mL com 10 ou 20% do volume de inóculo e o restante de meio e mantidos em câmara de fotoperíodo com controle de temperatura e sob iluminação com lâmpadas fluorescentes e agitação de 150 rpm em mesa agitadora.

A partir de ensaios preliminares comparando o crescimento celular e produção de ficocianina com a cepa de *Nostoc* sp. utilizando entre glicose e lactose proveniente do permeado de soro de leite foi verificado que a glicose apresentou maior eficiência (COTTAS, 2019).

O primeiro experimento consistiu na avaliação da suplementação do meio basal com diferentes concentrações da fonte de glicose e da fonte de nitrogênio, também em concentrações distintas. Empregou-se primeiro, somente a cepa de *Nostoc* sp., com inóculo de 10%, correspondendo a uma concentração celular inicial de 0,03 g/L. Foram analisados seis tipos de meio cultivo, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Suplementação ao meio basal com glicose e/ou NaNO₃ durante fermentação por *Nostoc* sp. 0,03 g/L e 10% (v/v)

Meio de cultivo	C _{glicose} (g/L)	C _{NaNO₃} (mM)
1	0	0
2	2	0
3	0	2 (0,17 g/L)
4	2	2 (0,17 g/L)
5	5	2 (0,17 g/L)
6	2	5 (0,425 g/L)

Posteriormente, com finalidade de diminuir a fase de adaptação do inóculo, foi avaliado o aumento da concentração inicial de inóculo e utilizando 20% em volume de inóculo de *Nostoc* sp, correspondendo a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L. Foram preparados 4 meios de cultivo diferentes, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Suplementação ao meio de cultivo basal utilizando fonte de carbono e/ou nitrato de sódio para *Nostoc* sp. 0,07 g/L e 20% (v/v)

Meio de cultivo	C _{glicose} (g/L)	C _{NaNO₃} (mM)
1 (controle)	0	0
2	0	2 (0,17 g/L)
3	2	2 (0,17 g/L)
4	5	5 (0,425 g/L)

Com os resultados obtidos dos ensaios utilizando a cepa *Nostoc* sp., ensaios de fotofermentação com a cepa de *Anabaena variabilis* foram realizados para, também, investigar o efeito da suplementação do meio BG11₀ com fonte de carbono e nitrogênio, usando volume de inóculo de 20% com concentração celular inicial de 0,03 g/L. Os meios de cultivo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Suplementação ao meio de cultivo utilizando fonte de carbono e/ou nitrato para *Anabaena variabilis*, 0,03 g/L e 20% (v/v)

Meio de cultivo	C _{glicose} (g/L)	C _{NaNO₃} (mM)
1 (controle)	0	0
2	2	0
3	0	2 (0,17 g/L)
4	2	2 (0,17 g/L)
5	5	2 (0,17 g/L)
6	2	5 (0,425 g/L)

Com os resultados obtidos dos ensaios utilizando a cepa *Anabaena variabilis* foram realizados, em seguida, ensaios para investigar o efeito de concentrações de açúcar inferiores a 2 g/L, na presença ou ausência da fonte de nitrogênio utilizado. Foi utilizado volume de inóculo de 20%, sendo a concentração celular inicial de 0,03 g/L. Os meios de cultivo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Suplementação ao meio de cultivo utilizando fonte de carbono e/ou nitrato para *Anabaena variabilis*, 0,03 g/L e 20% (v/v)

Meio de cultivo	C _{glicose} (g/L)	C _{NaNO3} (mM)
1 (controle)	0	0
2	0,5	0
3	1	0
4	0,5	2 (0,17 g/L)
5	1	2 (0,17 g/L)
6	1	5 (0,425 g/L)

Durante os ensaios de fotofermentação, que foram feitos em triplicatas, amostras foram retiradas para análise do crescimento celular e no último dia do ensaio, o teor de ficocianina foi quantificado após extração. O método de extração de FC utilizado foi por ciclos de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom (ver item 3.2.3.3).

3.2.3. Métodos Analíticos

3.2.3.1. Concentração celular

A análise do crescimento celular foi determinada pela densidade celular pelo método gravimétrico e por espectrofotometria a 650 nm para a cepa *Nostoc* sp. e 610 nm para *Anabaena variabilis*, comprimentos de onda pré-determinados, a partir da curva de calibração correlacionada à medida da absorbância do inóculo dos microrganismos através do espectrofotômetro (Shimadzu UV mini-1240) e a concentração de células (g/L). As curvas de concentração de célula *versus* absorbância estão dispostas em Anexo 2 (Figuras A.1 e A.2).

3.2.3.2. Concentração de ficocianina

Visto que as ficobiliproteínas são compostos intracelulares, foi necessário a realização da etapa de extração. Para a extração de FC, foi utilizado método de extração por congelamento e descongelamento combinado com ultrassom baseado do trabalho de Cottas (2019). Durante o ciclo de congelamento e descongelamento há a formação de cristais de gelo intracelulares que causam danos à célula, promovendo assim a extração de compostos intracelulares.

Utilizando uma amostra de 15 mL contida em tubo Falcon, foram realizados 5 ciclos de congelamento a (-15°C) por 1,5 h e descongelamento em banho ultrassônico a (25°C) por 30 min, utilizando como solução extratora o tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

As amostras, após extração, foram analisadas por espectrofotometria (Shimadzu UV mini-1240), de acordo com o comprimento de onda para a FBP, sendo FC – $\lambda = 615$ nm (AJAYAN et al., 2012). A concentração de FC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi calculada de acordo com a Equação 1 (BENNETT e BOGORAD, 1973):

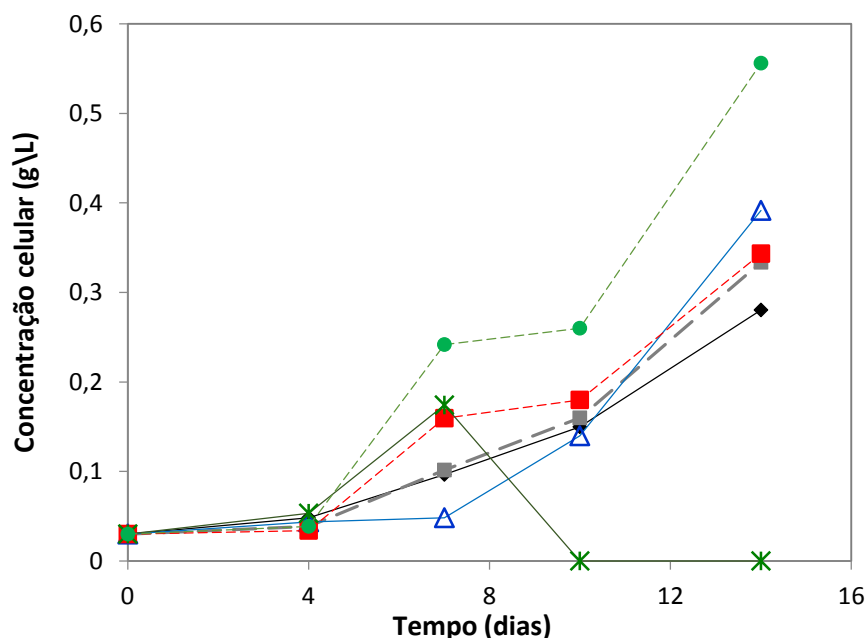
$$C_{FC} = \frac{A_{615} - 0,474(A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do efeito da concentração de glicose e nitrato de sódio na suplementação do meio basal BG11₀ no cultivo de *Nostoc* sp.

Os dados obtidos da avaliação do efeito da suplementação de fonte de nitrogênio e glicose ao meio basal em diferentes concentrações, para a cepa de *Nostoc* sp., utilizando inóculo de 10% (v/v) com concentração inicial de células de 0,03 g/L por 14 dias, estão mostrados na Figura 3.

Figura 3 - Crescimento celular com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. para inóculo de 10% (v/v), em função do tempo. Controle (◆), Glicose 2 g/L (■), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 2 mM (*), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (●)



Observa-se na Figura 3, que todos os meios suplementados apresentaram concentração celular superior ao controle a partir do sétimo dia, com exceção do meio com glicose 5 g/L + nitrato 2 mM no ponto final.

Analisando os meios em que foram adicionados somente glicose (2 g/L) ou nitrato de sódio (2 mM), o maior aumento da concentração celular ocorreu para o meio enriquecido com a fonte de nitrogênio isolada, sendo 0,39 g/L, e para o meio com glicose a concentração celular foi 0,33 g/L ao final do ensaio. Quando analisada a suplementação de ambos ao meio, a concentração final de células foi de 0,34 g/L, indicando que esta proporção é insuficiente para aumentar a concentração celular quando comparado com meio suplementado somente com glicose.

O meio com concentração de nitrato 2mM e concentração de glicose de 5 g/L, apresentou morte celular após o 7º dia, indicando possível inibição pelo excesso de substrato. Porém, ao aumentar a concentração de nitrato para 5 mM com concentração de glicose em 2 g/L, observa-se uma concentração de células superior atingindo 0,56 g/L.

Com relação à produção de FC, analisou-se a concentração ao final do ensaio, com os dados dispostos na Figura 4.

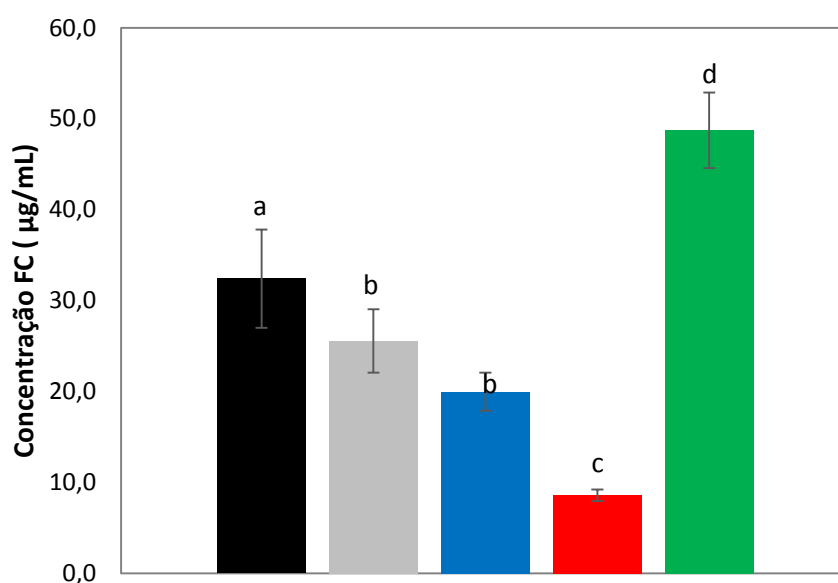
Nota-se que nas suplementações isolada e conjunta de glicose 2 g/L e nitrato 2 mM não foi verificado aumento da concentração de FC em relação ao meio controle, apesar de relatado na literatura o efeito positivo de uma fonte de carbono (Lebedeva et al., 2005). Já o meio com glicose 2 g/L e NaNO₃ 5 mM possibilitou o aumento da concentração de FC cerca de 50% em relação ao meio controle, apresentando 48,73 µg/mL.

Diferentes autores estudaram diferentes comportamentos para a adição de glicose ou fontes de nitrogênio, como nitrato. Entretanto, a combinação da suplementação com os dois compostos não foi muito investigada.

Khattar et al. (2015), analisando a produção de *Anabaena fertilissima* com adição de glicose 5 g/L ao meio controle provocou redução de 40% na concentração de FC, e obtiveram

46,5 % e 32 % de aumento na produção de FC adicionando nitrato 2 mM e 5 mM de nitrato ao meio cultivo controle, respectivamente.

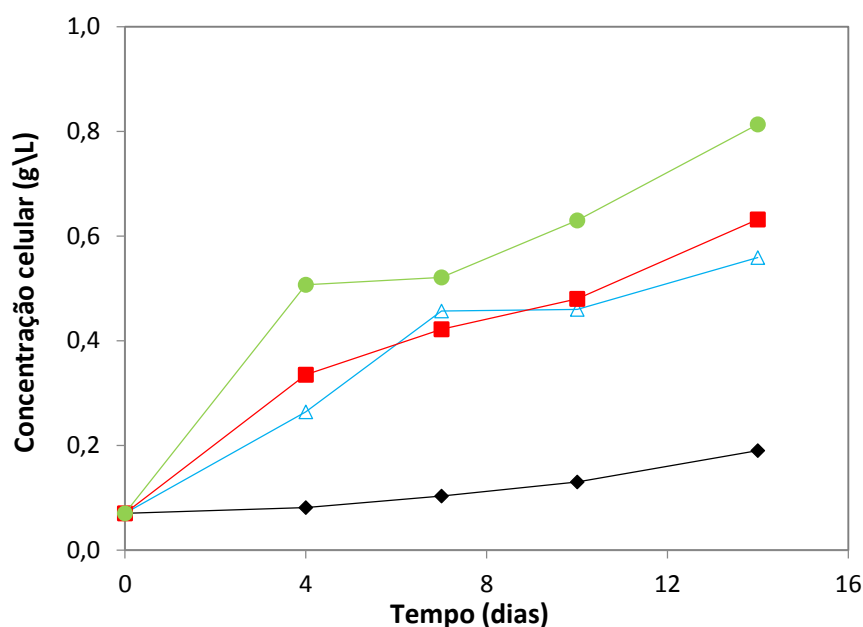
Figura 4 - Concentração de FC nos ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. com inóculo de 10% (v/v) para 14 dias de cultivo. Controle(■), Glicose 2 g/L (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L+ Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (■).



Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

A partir destes dados, considerou-se aumentar a concentração celular inicial do inóculo para 0,07 g/L utilizando 20% (v/v) para fins de diminuir a fase de adaptação, repetindo algumas condições e analisando o efeito de 5 g/L de glicose combinado com a fonte de nitrogênio 5 mM ao meio de cultivo, como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 5 mM (●)

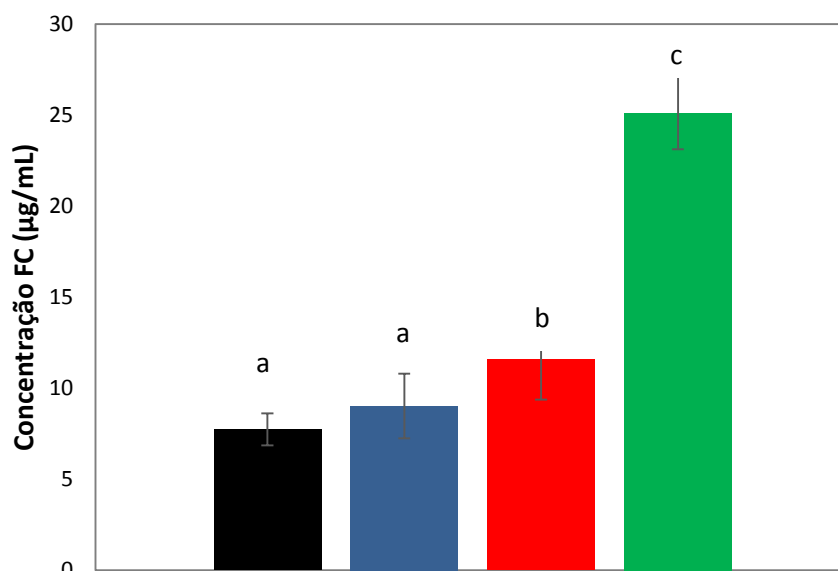


Pode-se verificar que a suplementação provocou novamente o aumento na concentração celular cerca de 10 vezes em relação ao meio controle. O meio contendo 5 g/L de glicose e 5 mM de nitrato de sódio apresentou concentração celular superior, em torno de 30% em relação ao meio de 2g/L de glicose e 2 mM de nitrato, salientando que esta suplementação beneficia a produção de biomassa, apresentando uma concentração final de 0,63 g/L.

Observa-se que, a concentração celular utilizando o meio contendo 2 g/L de glicose e 2 mM de nitrato de sódio em 20% (v/v) obteve uma concentração de 0,63 g/L que foi superior em relação ao meio suplementado apenas com nitrato 2 mM, com comportamento contrário ao obtido do ensaio com 10 % (v/v) inóculo.

Em relação à concentração de FC, mostra-se na Figura 6 os resultados obtidos ao final do cultivo.

Figura 6 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. com inóculo de 20% (v/v) em 14 dias. Controle (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 5 mM (■)



Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

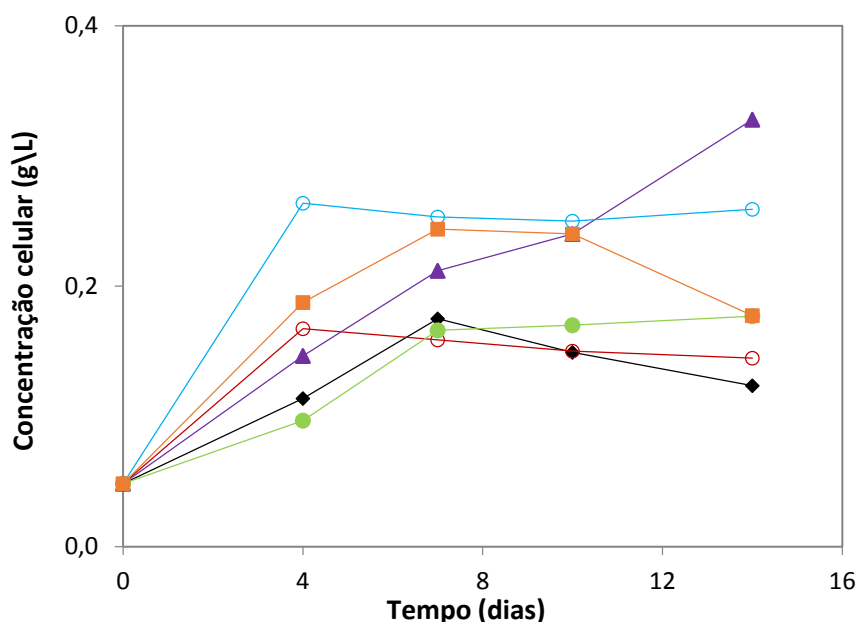
A Figura 6 indica que o efeito da suplementação de nitrato e glicose simultaneamente em ensaios com 20% (v/v) de inóculo com concentração celular de 0,07 g/L, favoreceram o aumento da concentração de FC para o meio contendo 2 g/L de glicose e 2 mM (11,59 µg/mL) podendo estar relacionado com a proporção de inóculo/meio.

Acredita-se que, com uma concentração celular adequada, a suplementação ao meio BG11₀ nestas proporções colaboraram tanto para o crescimento celular como para produção de ficocianina, obtendo 25,11 µg/mL com o meio contendo 5 g/L glicose e 5 mM de nitrato de sódio, 3,2 vezes superior ao teor encontrado usando meio basal.

Experimentos com alta concentração de 10 g/L de glicose, com presença de 2, 5 e 10 mM de NaNO₃, mostraram morte celular com 4 dias de ensaio, provavelmente pelo excesso de concentração da fonte de carbono (glicose) no meio de cultivo ou por concentração celular

inicial inadequada (COTTAS, 2019). Por isto, outro ensaio investigando concentrações menores entre 0,5 e 2 g/L glicose também foram realizados com a *Nostoc* sp. com concentração celular inicial de 0,05 g/L e estão dispostos na Figura 7.

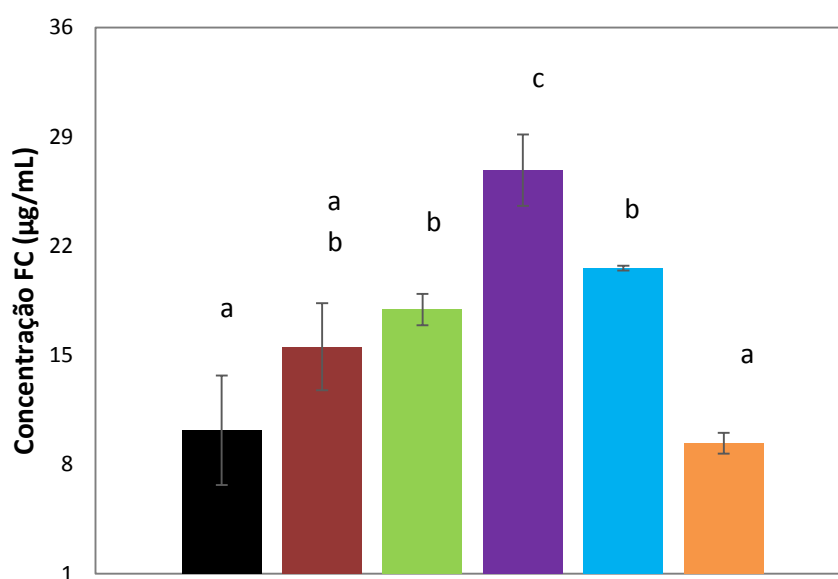
Figura 7 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Glicose 0,5 g/L (○), Glicose 1 g/L (●), Glicose 0,5 g/L + Nitrato 2 mM (▲), Glicose 1 g/L + Nitrato 2 mM (○), Glicose 1 g/L + Nitrato 5 mM (■).



A partir da análise da Figura 7, verificou-se que em 14 dias, todas as condições de suplementação também provocaram aumento na concentração celular superior ao meio controle (BG11₀), mostrando que tanto as fontes de nitrogênio quanto as de carbono melhoraram o crescimento da biomassa. Também é possível verificar que a melhor condição foi obtida com suplementação de 0,5 g/L de glicose e 2 mM de nitrato (0,33 g/L), aproximadamente 3 vezes maior que a concentração do meio controle. Os resultados mostraram que, à medida que as concentrações de glicose e nitrato aumentam, uma inibição do crescimento de biomassa foi observada.

Em relação à concentração de FC, mostram-se na Figura 8 os resultados obtidos ao final do cultivo.

Figura 8 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. com inóculo de 20% (v/v) em 14 dias. Controle (■), Glicose 0,5 g/L (■), Glicose 1 g/L (■), Glicose 0,5 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 1 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 1 g/L + Nitrato 5 mM (■).



Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

Em relação obtenção de ficocianina por *Nostoc* sp., como mostrado na Figura 8, em 14 dias de fermentação a suplementação que promoveu crescimento celular superior também favoreceu o maior teor de FC, sendo glicose 0,5 g/L e nitrato de sódio 2 mM, atingindo 26,86 µg/mL de FC, que representa 2,6 vezes maior que a condição de controle.

Segundo Borsari et al. (2007) e Lee et al. (2017), tanto a suplementação isolada de glicose quanto a adição apenas da fonte de nitrogênio, favoreceram o aumento na concentração de FC, que corrobora com os dados destes ensaios.

Os ensaios com melhores resultados para inóculo de 20%, tiveram razão de 0,34 g nitrato/g glicose, com maior crescimento celular (0,33 g/L) e concentração de FC (26,86 µg/mL) para 0,5 g/L de glicose e 2 mM de nitrato.

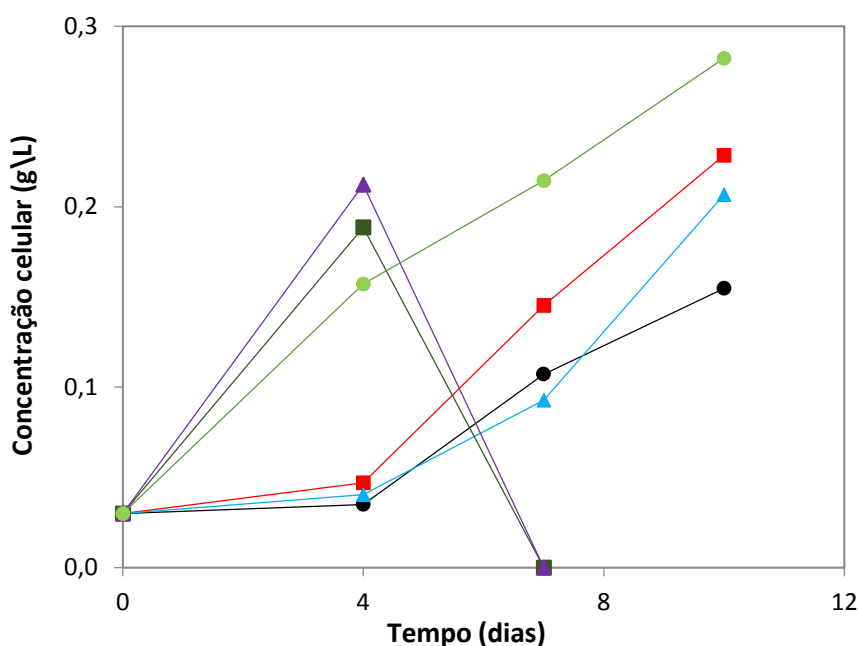
Além disso, ao analisar os dados do ensaio com 10% (v/v) de inóculo, observa-se que uma razão de 0,21 g nitrato/g glicose também obteve resultados superiores que as demais proporções e condições de cultivo. Não é possível afirmar que, quanto maior esta razão, melhor será a produção de FC e o crescimento celular, visto que um dos ensaios com 20% de inóculo apresentou razão de 0,42 (meio contendo 1 g/L de glicose e 5 mM de nitrato de sódio) resultou em baixas concentrações de FC e biomassa. Isso demonstra que o melhor intervalo da razão nitrato/glicose é entre 0,21 e 0,34 g nitrato/g glicose. Para o caso da razão mais baixa (0,03), houve morte celular (5 g/L de glicose e 2 mM de nitrato), provavelmente devido a inibição de crescimento celular.

4.2. Avaliação do efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio na suplementação do meio controle BG11₀ no cultivo de *Anabaena variabilis*

Com os dados obtidos nos ensaios para maior produção de FC por *Nostoc* sp., considerou-se realizar experimentos analisando os mesmos parâmetros para *Anabaena variabilis*, o volume de inóculo de 20 % (v/v), com concentração celular inicial de 0,03 g/L, em ensaios de 10 dias.

Os resultados para avaliação da suplementação do meio basal com fonte de nitrogênio e com glicose, são mostrados na Figura 9.

Figura 9 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Anabaena variabilis* para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Nitrato 2 mM (▲), Glicose 2 g/L (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (●), Glicose 5 g/L + Nitrato 2 mM (▲)



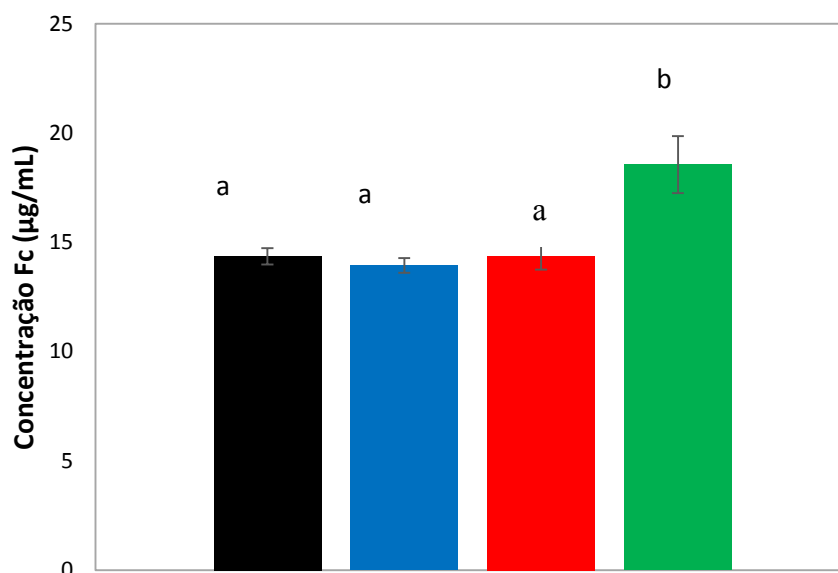
Analisando a Figura 9 observa-se que as suplementações aumentaram a concentração celular em relação ao meio controle a partir de 10 dias, com exceção dos meios contendo 5 g/L glicose + 2 mM nitrato de sódio e 2 g/L glicose + 2 mM nitrato de sódio, pois apresentaram morte celular a partir de 4 dias. Este último meio apresentou resultado diferente quando comparado a mesma condição de 2 g/L de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para a cepa de *Nostoc* sp., à qual apresentou concentração celular maior que do controle, indicando uma diferença relacionada às espécies, que podem ter metabolismos diferentes de acordo com a composição do meio.

Apesar disso, assim como nos ensaios com a cepa *Nostoc* sp. uma das melhores condições obtida foi para 2 g/L de glicose e 5 mM de nitrato apresentando concentração celular

final de 0,28 g/L utilizando a *Anabaena variabilis*, sendo 50% maior que a concentração do meio controle.

A respeito do teor FC produzido por *Anabaena variabilis*, os resultados estão dispostos na Figura 10.

Figura 10 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Anabaena variabilis* com inóculo de 20% em 10 dias. Controle (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (■)



Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

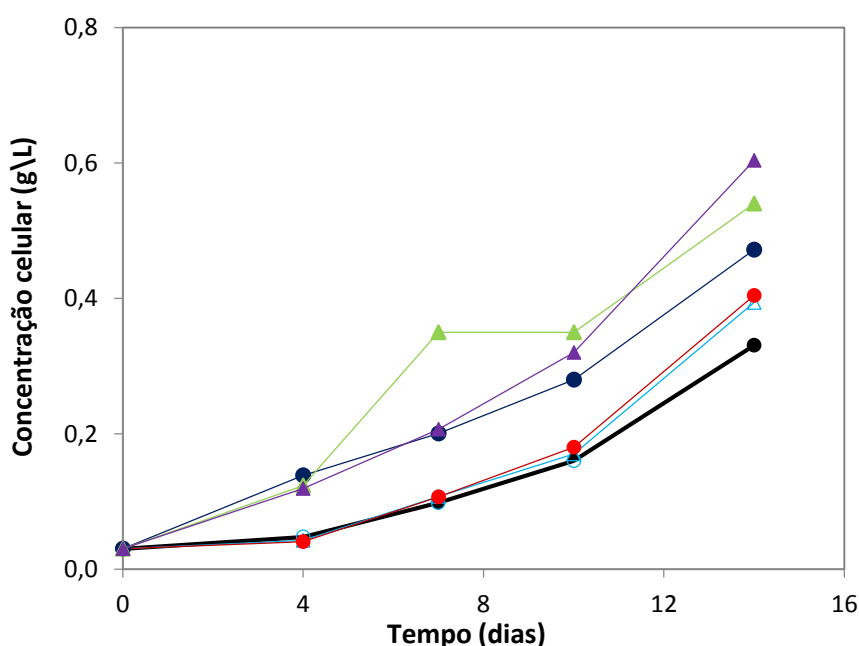
Pela análise da Figura 10 nota-se que a produção de FC é favorecida com o meio que contém glicose 2 g/L com nitrato 5 mM e 20% de inóculo, obtendo-se 18,6 µg/mL, que também foi observado para o ensaio com a cepa de *Nostoc* sp. com 10% de inóculo, corroborando ser uma das concentrações a serem utilizadas para aumentar a concentração de FC para estas espécies.

Verifica-se também que, a suplementação isolada de glicose (2 g/L) ou de nitrato de sódio (2 mM) não influenciou a concentração de FC por *Anabaena variabilis*, sendo que o teor

apresentado, cerca de 14 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou diferença significativa destas condições em relação ao meio basal.

Para investigar concentrações menores de glicose, entre 0,5 e 2 g/L, foram também realizados experimentos com a cepa *Anabaena variabilis* com concentração celular inicial de 0,03 g/L e estão dispostos na Figura 11.

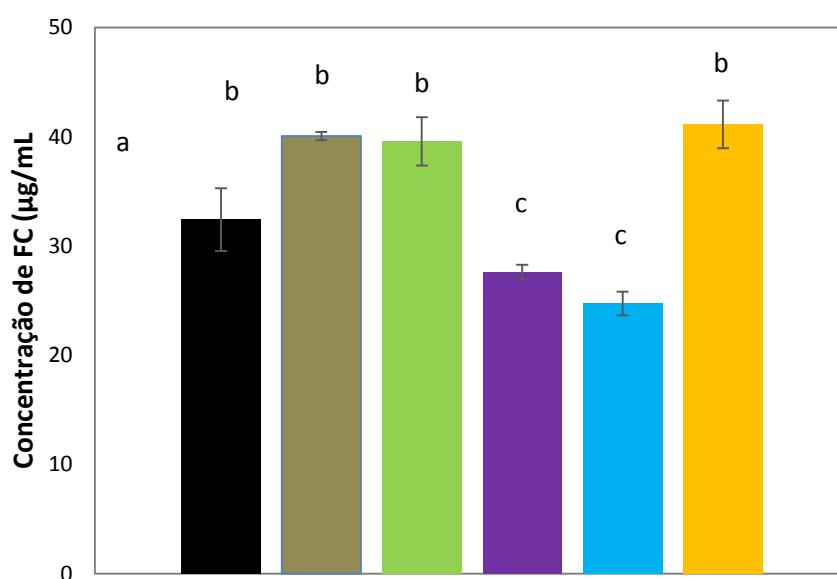
Figura 11 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Anabaena variabilis* para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Glicose 0,5 g/L (△), Glicose 1 g/L (■), Glicose 0,5 g/L + Nitrato 2 mM (●), Glicose 1 g/L + Nitrato 2 mM (▲), Glicose 1 g/L + Nitrato 5 mM (▲)



A partir da análise da Figura 11 verificou-se que, assim como nos ensaios anteriores, estas suplementações tendem a aumentar a concentração celular em relação ao meio controle. É possível verificar que a melhor condição foi obtida com suplementação de 1 g/L de glicose e 5 mM de nitrato (0,61 g/L), cerca de 2 vezes maior que a concentração do meio controle.

Em relação à concentração de FC, mostram-se na Figura 12 os resultados obtidos ao final do cultivo.

Figura 12 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Anabaena variabilis* com inóculo de 20% em 14 dias. Controle (■), Glicose 0,5 g/L (■), Glicose 1 g/L (■), Glicose 0,5 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 1 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 1 g/L + Nitrato 5 mM (■).



Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

Analisando a Figura 12, a condição de cultivo que promoveu maior crescimento celular também favoreceu a maior produção de FC (glicose 1 g/L e nitrato de sódio 5 mM), atingindo 41,13 µg/mL de FC. As suplementações de 0,5 e 1,0 g/L de glicose com concentração de nitrato de sódio 2 mM não resultaram em incremento na produção de FC em relação ao meio basal, provavelmente, por apresentar baixa concentração de substrato para uma alta concentração celular.

Os ensaios com melhores resultados para a cepa *Anabaena variabilis*, tiveram razão de 0,42 g nitrato/g glicose, com maior crescimento celular (0,61 g/L) e concentração de FC (41,13

$\mu\text{g/mL}$) para 1 g/L de glicose e 5 mM de nitrato com 10 dias de fermentação. Outra suplementação de destaque foi utilizando 2 g/L de glicose e 5 mM de nitrato de sódio, apresentando razão de 0,21 g nitrato/g glicose, obtendo resultados superiores as demais proporções e condições de cultivo ao final de 10 dias, para uma determinada concentração celular final. Isso demonstra que o melhor intervalo da razão nitrato/glicose é entre 0,21 e 0,42 g nitrato/g glicose, para uma concentração celular adequada.

De acordo com a avaliação da suplementação ao meio basal, verifica-se que a adição de nitrato ou glicose de forma isolada, não influenciou significativamente para aumentar a síntese de FC. O meio contendo 2 g/L e 5 mM de nitrato de sódio (razão de 0,21 g nitrato/g glicose) é a melhor condição que coincide entre as duas cepas de cianobactérias.

Os resultados complementares da concentração celular e concentração de FC para todas as condições estudadas se encontram no Anexo 2 (Tabelas A.3 e A.4).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este estudo indicam que a suplementação ao meio BG11₀ com glicose e nitrato de sódio favoreceram o aumento na produção de biomassa e obtenção de ficocianina para as cepas de *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. Dentre estes resultados, a melhor suplementação coincidente foi obtida adicionando glicose 2 g/L e nitrato de sódio 5 mM ao meio de cultivo, obtendo-se nesta ordem 0,28 g/L de biomassa e 18,6 µg/mL de FC para *Anabaena variabilis* (20% v/v) em 10 dias e de 0,56 g/L de biomassa e 48,73 µg/mL de FC para *Nostoc* sp. (10% v/v) em 14 dias. O aumento da concentração celular foi de aproximadamente 2 vezes para ambas cepas, e para a concentração de FC cerca de 50% para *Nostoc* sp. e 29% para *Anabaena variabilis* em relação ao meio basal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436–441, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.012>
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- BORSARI, R. R. J.; MORIOKA, L. R.; RIBEIRO, M. L. L.; BUZATO, J. B. Mixotrophic growth of *Nostoc* sp. on glucose, sucrose and sugarcane molasses for Phycobiliprotein production. **Acta Scientiarum-Biological Sciences**. v. 29, n.1, p. 9-13, 2007. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v29i1.121>
- COTTAS, A. G. Avaliação do processo de produção de ficobiliproteínas de cianobactérias e purificação por sistemas aquosos bifásicos. *Dissertação de Mestrado*. Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2019.
- DUCAT, D. C.; WAY, J. C.; SILVER, P. A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. **Trends in Biotechnology**, v. 29(2), p. 95–103, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.003>
- FAY, P. **The Blue-greens (Cyanophytacyanobacteria)**. Edward Arnold. Baltimore, MD. p. 88, 1983.
- HALLENBECK, P. C. Hydrogen Production by Cyanobacteria. **Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production**. p. 15-28, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1208-3_2

- HEMLATA, AFREEN, S., FATMA, T. Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Microchaete* and its biological activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 84–89, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.012>
- JAISWAL, P.; SINGH, P. K.; PRASANNA, R. Cyanobacterial bioactive molecules: an overview of their toxic properties. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 54, n.9, p. 701-717, 2008. <https://doi.org/10.1139/W08-034>
- KASTING, J. F.; SIEFERT, J. L. Life and the evolution of Earth's atmosphere. **Science**. v. 296, p. 1066–1068, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1071184>
- KHATTAR, J. I. S., KAUR, S., KAUSHAL, S., SINGH, Y., SINGH, D. P., RANA, S., GULATI, A. Hyperproduction of phycobiliproteins by the cyanobacterium *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5 under optimized culture conditions. **Algal Research**, v. 12, p. 463–469, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.007>
- LEBEDEVA, N. V., BOICHENKO, V. A., SEMENOVA, L. R., PRONINA, N. A., STADNICHUK, I. N. Effects of glucose during photoheterotrophic growth of the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601 capable for chromatic adaptation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52(2), p. 235–241, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0036-3>
- LEE, N. K.; OH H. M.; KIM H. S.; AHN C. Y. Higher production of C-phycoerythrin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. **Bioresource Technology**. v. 227, p. 164-170, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.053>

- LIOTENBERG, S.; CAMPBELL D.; RIPPKA R.; HOUMARD, J.; DE MARSAC, N. T. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium, **Microbiology**. v. 142, p. 611–622, 1996. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-611>
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 359-466, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00076-5)
- ORES, J. DA C., AMARANTE, M. C. A. DE, KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219–227, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.133>
- PORTER, G.; TREDWELLA, C. J.; SEARLEB, G. F. W.; BARBERB, J. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact alga. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 501, p. 232-245, 1978. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90029-4)
- PRADO, M. A; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.14 (2), p. 237-250, 2003.
- PRASANNA R.; PABBY A.; SINCH P. K. Effect of glucose and light-dark environment on pigmentation profiles in the cyanobacterium *Calothrix elenkenii*. **Folia Microbiologica**.v. 49, p. 26–30, 2004. <https://doi.org/10.1007/BF02931641>
- RASTOGI, R. P.; SONANI, R. R.; PATELA, A. B.; MADAMWAR, D. Occurrence of a Functionally Stable Photoharvesting Single Peptide Allophycocyanin α -subunit (16.4

- kDa) in the Cyanobacterium *Nostoc sp.* R76DM. **RSC Advances**, v. 5, n.106, p. 87598-87608, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA14508B>
- RODRIGUES, D. B., MENEZES, C. R., MERCADANTE, A. Z., JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v. 77, p. 273–279, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.027>
- SCHRADER, K. K.; DAYAN, F. E. Antioxidant Enzyme Activities in the Cyanobacteria *Planktothrix agardhii*, *Planktothrix perornata*, *Raphidiopsis brookii*, and the Green Alga *Selenastrum capricornutum*. In: GAULT, P. M.; MARLER, H. J. **Handbook on Cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications**. Nova York: Nova Science Publishers, 2009. p. 473-484.
- SCHOPF, J. W. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. **Science**. v. 260, p. 640-646, 1993. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.640>
- SENDERSKY, E.; LAHMI, R.; SHATIEL, J.; PERELMAN, A.; SCHWARZ, R. NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 659-668, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04844.x>
- SKLERYK, R. S.; SO, A. K.; ESPIE, G. S. Effects of carbon nutrition on the physiological expression of HCO₃⁻ transport and the CO₂-concentrating mechanism in the *Cyanobacterium Chlorogloeopsis sp.* ATCC 27193. **Planta**. v. 214, p. 572-583, 2002. <https://doi.org/10.1007/s004250100640>
- SLOTH, J. K.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria*

- sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, n. 1-2, p. 168-175, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>
- SONANI, R. R.; RASTOGI, R. P.; PATEL, R.; MADAMWAR, D. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. **World Journal of Biological Chemistry**, v.7 (1), p. 100, 2016. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.100>
- STAL, L. J. Cyanobacteria: diversity and versatility - Clues to life in extreme Environments. In: J. SECKBACH. **Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**, Dordrecht: Springer, 2007. p. 661-680. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6112-7_36
- STAL, L. J. Nitrogen Cycling in Marine Cyanobacteria Mats. In: KRUMBEIN, W. E.; PATERSON, D. M.; ZAVARZIN, G. A. **Fossil and Recent Biofilms: A Natural History of Life on Earth**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 119-139.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-0193-8_7
- TAN, L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**. v. 68, p. 954-979, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.012>
- VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of Phycobiliproteins from cultured Cyanobacteria samples. **Analytical biochemistry**, v. 319, n.2, pp. 263-271, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00294-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00294-X)
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. **Kluwer Academic Publisher**, p. 778, 2012.

ANEXO 1

Composição do meio basal BG11₀ para cultivo das cianobactérias

Tabela A.1 - Componentes do meio BG11₀ e suas concentrações

Reagente	Concentração (g/100mL)	Concentração (g/L)	Volume solução mL/L
K ₂ HPO ₄	3	0,03	1mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5	0,075	1mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6	0,036	1mL
Citrato de amônio férico	0,6	0,006	1mL
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,1	0,001	1mL
Ácido cítrico	0,6	0,006	1mL
Na ₂ CO ₃	2	0,02	1mL
Solução metais traço	---	1mL	1mL

Tabela A.2 - Composição da solução de metais traço do meio BG11₀

Reagente	Concentração (g/L)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,222
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,079
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,04
H ₃ BO ₃	2,86

ANEXO 2

Curvas de calibração concentração celular *versus* absorbância

Figura A.1 – Curva de calibração para crescimento celular *Nostoc* sp.

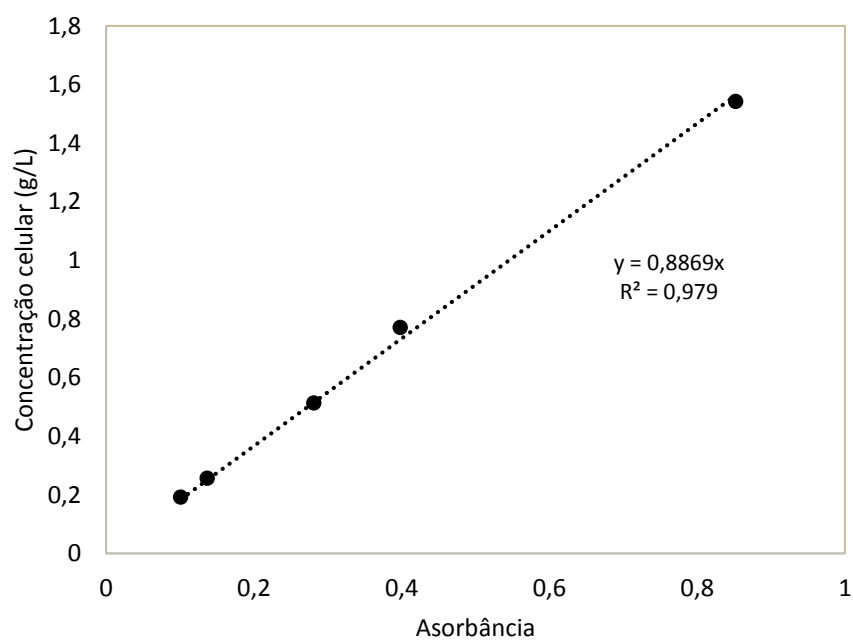


Figura A.2 – Curva de calibração para crescimento celular *Anabaena variabilis*

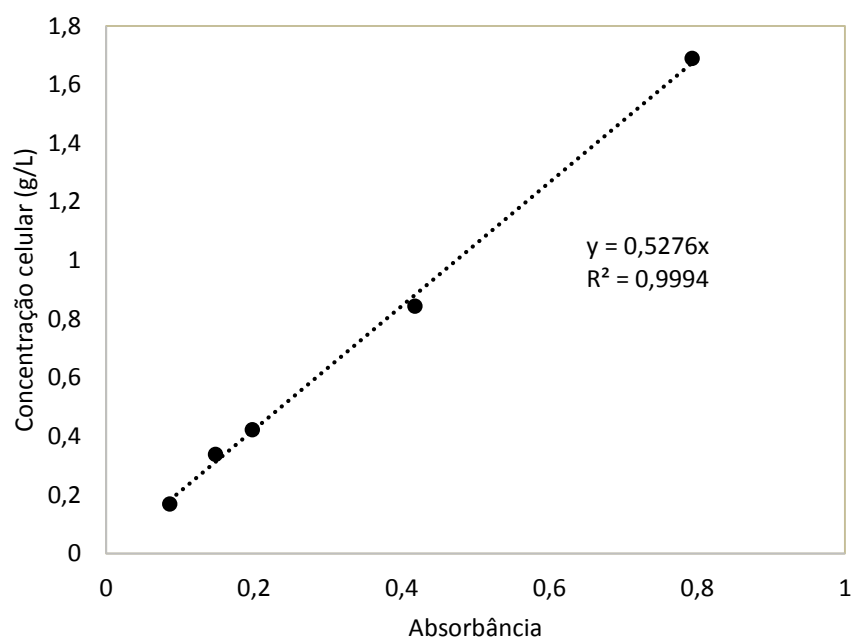


Tabela A.31 - Consolidado para avaliação do meio de cultivo para *Nostoc* sp.

Ensaio	V _{Inóculo} (% v/v)	C _{glic} (g/L)	C _{NaNO3} (nM)	Razão N/G (g nitr/g glic)	C _{celular} (g/L) 14d	C _{FC} (µg/mL) 14d
1	10	0	0	***	0,28	32,42
2	10	2	0	0	0,33	25,56
3	10	0	2	***	0,39	19,98
4	10	2	2	0,08	0,34	8,6
5	10	5	2	0,03	Nd	Nd
6	10	2	5	0,21	0,56	48,73
7	20	0	0	***	0,18	7,74
8	20	0	2	***	0,58	9,02
9	20	2	2	0,08	0,63	11,60
10	20	5	5	0,08	0,81	25,11
11	20	0	0	***	0,13	10,19
12	20	0,5	0	0	0,15	15,56
13	20	1	0	0	0,18	17,93
14	20	0,5	2	0,34	0,33	26,86
15	20	1	2	0,17	0,26	20,58
16	20	1	5	0,42	0,18	9,37

Nd – não calculado devido a perda do ensaio devido morte celular

*** – razão não existente

Tabela A.4 - Consolidado para avaliação do meio de cultivo para *Anabaena variabilis*

Ensaio	Vinóculo (% v/v)	C _{glic} (g/L)	C _{NaNO3} (nM)	Razão N/G (g nitr/g glic)	C _{celular} (g/L) 10d	C _{FC} (µg/mL) 10d	C _{celular} (g/L) 14d	C _{FC} (µg/mL) 14d
1	20	0	0	***	0,14	14,37	-	-
2	20	2	0	0	0,17	13,95	-	-
3	20	0	2	***	0,20	14,38	-	-
4	20	2	2	0,09	Nd	Nd	-	-
5	20	2	5	0,21	0,28	18,56	-	-
6	20	5	2	0,03	Nd	Nd	-	-
7	20	0	0	***	0,16	-	0,33	32,42
8	20	0,5	0	0	0,17	-	0,40	40,06
9	20	1	0	0	0,18	-	0,41	39,59
10	20	0,5	2	0,34	0,28	-	0,47	27,62
11	20	1	2	0,17	0,34	-	0,54	24,74
12	20	1	5	0,42	0,32	-	0,61	41,13

Nd – não calculado devido a perda do ensaio devido à morte celular

*** – razão não existente