

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Avaliação da interação entre bactérias e microrganismos fotossintetizantes

Évellin do Espírito Santo

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Marina Ishii

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Avaliação da interação entre bactérias e microrganismos fotossintetizantes

Évellin do Espírito Santo

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Co-orientadora: Profa. Dra. Marina Ishii

São Paulo

2020

Évellin do Espírito Santo

Avaliação da interação entre bactérias e microrganismos fotossintetizantes

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Orientador / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2021.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

E77a Espírito Santo, Évellin do
Avaliação da interação entre bactérias e
microrganismos fotossintetizantes / Évellin do
Espírito Santo. - São Paulo, 2020.
139 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica -
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de
Coorientador: Ishii, Marina

1. Bioquímica industrial. 2. Co-cultura. 3.
Biotecnologia. 4. Microbiologia industrial. 5.
Biomassa microbiana. I. T. II. Carvalho, João
Carlos Monteiro de, orientador. III. Ishii, Marina,
coorientador.

Aos meus pais Cleusa e Sérgio,
que sempre cuidaram da minha educação e formação.
Orgulhosamente dedico esta conquista a vocês.

AGRADECIMENTOS

Todo o trabalho e dedicação desses dois últimos anos resultaram nessa dissertação, tive a oportunidade de encontrar pessoas que me ensinaram e auxiliaram nessa trajetória.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos e sua valiosa orientação, pautada pelo respeito, pela motivação e pelo conhecimento, o que foi fundamental para o meu crescimento profissional e desenvolvimento do conhecimento científico. Também me mostrou que a importância do desenvolvimento da inteligência emocional, obrigada por constantemente dizer que: “tudo no final sempre dá certo”; e de fato dá.

À co-orientação da Profa. Dra. Marina Ishii, por todos os ensinamentos nessa empreitada, pela confiança e incentivo durante todos esses anos. E também, na supervisão do Estágio em Docência pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos meus amigos que encontrei durante essa jornada: Elizandra, por acreditar no meu potencial, pela paciência em me ensinar e sempre me incentivar a perseguir meus objetivos, você me inspira. Duda, Lilian e Douglas, pela experiência que vocês compartilham comigo, dando conselho e apoio, e claro, pelo companheirismo e amizade. Maria Clara, Júlia, Carol e Giovana pelo companheirismo diário, risadas, amizade, carinho em tornar meus dias mais alegres, eu aprendo muito com vocês. Lauris e Lina por agregar tanto valor cultural, pelo companheirismo diário, compartilhando os momentos de alegria e tensão, obrigada por todos os ensinamentos e auxílio. Eleane, pelos ensinamentos e convivência.

Ao César, pelos ensinamentos na área de estatística e pelas grandes conversas.

Aos técnicos Larissa e Gledson, pelo companheirismo e estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À minha família que tanto amo! Meus pais, Sérgio e Cleusa, por todo o amor, dedicação e proteção, pelos momentos de alegria, e também pelo incentivo ao estudo. Minha irmã Suellen, por ser minha inspiração durante toda a minha infância. Ao carinho infinito que tenho pelos meus avós, Elza e Ismael, Antônio (*in memoriam*) e Adelaide. Minha avó Elza sempre diz: “Sorria porque a vida é alegria!”, essa frase me dá a força necessária para seguir nos momentos mais difíceis.

Ao Rafael que sempre acreditou na realização dessa grande etapa, obrigada por constantemente me auxiliar tecnicamente, por incentivar e demonstrar-se orgulhoso com o meu trabalho. Além de me acalmar em momentos de tensão, e trazer alegria nos momentos juntos.

Ao Adriano Moreno por incentivar novas habilidades, e mostrar o quanto sou capaz. A admiração que sinto por você é infinita.

E as minhas amigas de longa data, Luiza e Ângela, por estarem sempre presentes com palavras de incentivo.

“O que eu penso, não muda nada além do meu pensamento, o que eu faço a partir disso, muda tudo.”

Leandro Karnal

A beleza da ciência é do início ao fim, a importância é óbvia e cada dificuldade só a torna mais interessante.

Às vezes a simplicidade é a máxima sofisticação, já que a partir dela podemos fazer muito, e assim mudar o mundo.

Realidade universal capaz de salvar vidas, melhorar o meio ambiente, criar novas tecnologias, modificar a história e acabar com preconceitos.

O método científico é assertivo, conjunto de conceitos teóricos, práticos e observacionais. De fato, a opinião de ninguém refuta a ciência!

Própria autora

RESUMO

ESPIRITO SANTO, E. **Avaliação da interação entre bactérias e microrganismos fotossintetizantes.** (Dissertação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. **2020.**

Microrganismos fotossintetizantes se diferenciam quanto à origem, composição química e morfologia, requerem essencialmente para o seu crescimento água, luz, dióxido de carbono, bem como outros nutrientes inorgânicos. Os consórcios com bactérias heterotróficas representam um relacionamento simbiótico, que podem favorecer o crescimento de ambos os microrganismos. Mediante este panorama, este trabalho teve por objetivo isolar e identificar bactérias presentes em meio de cultivo de *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, produtoras de carotenoides, e *Arthrospira platensis*, que possui alto teor proteico. Com isso, verificou-se que a viabilidade do aumento do crescimento microalgal a partir de co-culturas depende da bactéria utilizada e sua concentração inicial, bem como as combinações com mais bactérias. Destacou-se a co-cultura com *Bacillus pumilus* e *Bacillus atrophaeus*, cada um com concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹, com valor de concentração final de *D. salina* de $4,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹, enquanto que no meio padrão a concentração final foi de $1,3 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Houve um crescimento bacteriano acentuado coincidindo com a morte microalgal, o que significa que as bactérias utilizaram as células mortas como fonte de matéria orgânica para o seu crescimento. Foram também avaliadas as influências dos extratos de bactéria e microalga nos cultivos microbianos. Foi realizada a adição de 0,5% de extrato de bactéria (*B. atrophaeus* ATCC 9372) para aumentar o crescimento de biomassa de diferentes microalgas. As concentrações finais de *D. salina* axênica e não axênica cultivadas com a adição deste extrato foram de $1,6 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e $1,7 \times 10^7$ células.mL⁻¹, respectivamente. A *Chlorella vulgaris* em meio modificado atingiu a concentração de 1,55 g.L⁻¹, enquanto em meio padrão a concentração final foi de 0,67 g.L⁻¹. Quando se utilizou o extrato proveniente microalga *C. vulgaris* como fonte de nitrogênio orgânico em meio de cultura de *B. atrophaeus* ATCC 9372, obteve-se uma concentração final da bactéria de $1,9 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹.

Palavras-chave: microalga, bactéria, co-cultura, extrato, biomassa.

ABSTRACT

ESPIRITO SANTO, E. **Evaluation of interaction between bacteria and photosynthetic microorganisms.** (Master's thesis) – Faculty of Pharmaceuticals Sciences, University of São Paulo. São Paulo, Brazil. **2020.**

Photosynthetic microorganisms differ in origin, chemical composition and morphology, essentially requiring water, light, carbon dioxide for their growth, as well as other inorganic nutrients. Consortia with heterotrophic bacteria represent a symbiotic relationship, which can favor the growth of both microorganisms. Taking in account this background, this study aimed to isolate and identify bacteria present in the culture medium of *Dunaliella salina* and *Haematococcus pluvialis*, producers of carotenoids, and *Arthrospira platensis*, which presents high protein content. Thus, it was found that the viability of increasing microalgal growth from co-cultures depends on the bacterium used and its initial concentration, as well as the combinations with more bacteria. The highlight was co-culture with *Bacillus pumilus* and *Bacillus atrophaeus*, each with an initial concentration of 10^2 UFC.mL⁻¹, with a final concentration value of 4.1×10^6 cells.mL⁻¹, whereas in the medium standard the final concentration was 1.3×10^6 cells.mL⁻¹. There was a marked bacterial growth coinciding with the microalgal death, which means that the bacteria used dead cells as a source of organic matter for their growth. The influences of bacterial and microalgae extracts on microbial cultures were also evaluated. The 0.5% bacterial extract (*B. atrophaeus* ATCC 9372) was added to increase the biomass growth of different microalgae. The final concentrations of axenic and non-axenic *D. salina* cultivated with the addition of this extract were 1.6×10^7 cells.mL⁻¹ and 1.7×10^7 cells.mL⁻¹, respectively. *Chlorella vulgaris* in modified medium reached a concentration of 1.55 g.L⁻¹, while in standard medium the final concentration was 0.67 g.L⁻¹. When the extract from microalgae *C. vulgaris* was used as a source of organic nitrogen in *B. atrophaeus* ATCC 9372 culture medium, a final bacterial concentration of 1.9×10^7 UFC.mL⁻¹ was obtained.

Keywords: microalgae, bacterium, co-culture, extract, biomass .

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Microalgas.....	25
2.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	26
2.1.2 <i>Dunaliella salina</i>	28
2.1.3 <i>Haematococcus pluvialis</i>	29
2.2 Cianobactérias.....	32
2.2.1 <i>Arthrospira platensis</i>	33
2.3 Bactérias.....	34
2.3.1 <i>Bacillus atrophaeus</i>	35
2.4 Carotenoides.....	37
2.4.1 Biossíntese de carotenoides.....	38
2.4.2 Aspecto econômico.....	41
2.5 Cultura axênica.....	42
2.6 Interação microalga-bactéria.....	43
2.6.1 Relação oxigênio e dióxido de carbono.....	44
2.6.2 Efeito inibidor em microalgas produzido por bactérias.....	45

2.6.3	Bactérias que promovem o crescimento de microalgas.....	45
2.6.4	Modificação do conteúdo lipídico intracelular de microalgas em co-cultura.....	47
2.6.5	Atividade floculante por bactéria.....	48
2.6.6	Fornecimento de nutrientes.....	49
2.6.7	Co-imobilização de microalgas por bactérias.....	50
2.7	Aplicações biotecnológicas.....	51
2.7.1	Extratos antibacterianos de microalgas.....	51
2.7.2	Suplementos alimentares e ração animal.....	52
2.7.3	Cosméticos.....	54
2.7.4	Medicamentos.....	55
3	OBJETIVO.....	57
3.1	Objetivo Geral.....	57
3.2	Objetivo Específico.....	57
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1	Microrganismos utilizados.....	59
4.2	Meios de cultivo dos microrganismos.....	59
4.3	Cultivo dos microrganismos fotossintetizantes para a obtenção do meio residual.....	63
4.4	Isolamento e identificação das bactérias presentes em meio residual de microrganismo fotossintetizante.....	64
4.5	Obtenção das suspensões de bactérias.....	64
4.6	Cultivo de bactérias isoladas.....	65
4.7	Velocidade específica de crescimento.....	65

4.8	Determinação do valor de pH, condutividade e osmolaridade.....	65
4.9	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	66
4.10	Co-cultura.....	66
4.11	Extrato de bactéria para o cultivo de microrganismos fotossintetizantes.....	67
4.11.1	Cultivo de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372.....	67
4.11.2	Preparo do extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372.....	68
4.11.3	Cultivo de microrganismos fotossintetizantes utilizando extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 como promotor de crescimento.....	68
4.12	Extrato de microrganismo fotossintetizante como fonte de proteínas para o cultivo de bactérias.....	69
4.12.1	Preparo do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i>	69
4.12.2	Cultivo de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 utilizando <i>Chlorella vulgaris</i> como fonte de nitrogênio orgânico	69
4.13	Análise da composição proximal dos extratos	70
4.13.1	Lipídios totais.....	70
4.13.2	Proteínas totais.....	70
4.13.3	Cinzas totais.....	71
4.13.4	Carboidratos totais.....	71
4.14	Análise estatística.....	71
5	RESULTADOS E DICUSSÃO.....	72
5.1	Caracterização físico-química do meio residual, isolamento e identificação de bactérias	72
5.1.1	Suspensões matrizes das bactérias e cultivos.....	78

Dissertação de Mestrado - Évellin do Espírito Santo

5.2	Co-culturas.....	80
5.3	Extratos.....	90
5.3.1	Extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372.....	90
5.3.1.1	Cultivo de <i>D. salina</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> e <i>A. platensis</i> com extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372.....	94
5.3.2	Extrato de <i>C. vulgaris</i> para uso como fonte de nitrogênio em cultivo de <i>B. atrophaeus</i>	105
5.3.2.1	Crescimento de <i>C. vulgaris</i> em fotobiorreator tubular.....	105
6	CONCLUSÕES FINAIS.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
	APÊNDICES.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microscopia do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> (Fonte: RAMARAJ; UNPAPROM; DUSSADEE, 2016).....	26
Figura 2	Esquema mostrando diferentes fases da formação da parede celular filha em <i>Chlorella vulgaris</i> : (a) fase inicial de crescimento celular; (b) fase tardia do crescimento celular; c) cloroplasto na fase de divisão; (d) fase inicial de divisão dos protoplastos; (e) fase de divisão tardia dos protoplastos; (f) fase de maturação das células filhas; (g) fase de eclosão (Fonte: Adaptado YAMAMOTO; KURIHARA; KAWANO, 2005).....	26
Figura 3	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18 xênica na fase verde (Fonte: Adaptado CEZARE-GOMES et al., 2019).....	28
Figura 4	Morfologia celular de <i>Dunaliella salina</i> sob privação de nutrientes: A) 6 dias; B) 9 dias; C) 12 dias; D) 15 dias; E) 20 dias (Fonte: Própria autora).....	28
Figura 5	Ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i> . (A) Imagens de microscopia mostrando os estágios de 1 a 32 células e o estágio flagelado. (B) Ilustração de ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i> (Fonte: Adaptado de WAYAMA et al., 2013).....	30
Figura 6	Morfologia da <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> (Fonte: Própria autora).....	33
Figura 7	Ciclo de vida da <i>A. platensis</i> (Fonte: Adaptado CIFERRI, 1983).....	33
Figura 8	Direita: Micrografia eletrônica de varredura de esporos de <i>B. atrophaeus</i> (A) e células vegetativas (B) em uma superfície de ágar. A barra de escala representa 1 mm. Esquerda: corte transversal de um esporo. A barra de escala é de 50 nm. (Fixação com	

	glutaraldeído e formaldeído em tampão de cacodilato, pós-fixação com tetróxido de ósmio, desidratação em uma série de etanol e óxido de propileno e incorporação em resina PolyEmbed 812, seguida por microscopia eletrônica de transmissão de seção delgada (Fonte: SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).....	36
Figura 9	Exemplos de estruturas químicas de carotenoides obtidos por algas (Fonte: Adaptado DUFOSSÉ et al., 2005).....	37
Figura 10	Biossíntese dos carotenoides (Fonte: Adaptado de RATLEDGE; EVANS, 1989 apud VALDUGA, 2005; EOSEON et al., 2006; YE et al., 2008 apud CEZARE-GOMES et al., 2019).....	39
Figura 11	Esquema das principais interações que podem ocorrer entre microalgas e bactérias. Seta normal: interação positiva; seta tracejada: interação negativa (Fonte: Adaptado de NATRAH et al., 2013).....	44
Figura 12	Técnicas e processos utilizados no desenvolvimento experimental.....	58
Figura 13	Crescimento bacteriano proveniente do meio residual de <i>Dunaliella salina</i> (A), <i>Haematococcus pluvialis</i> (B), e <i>Arthrospira platensis</i> (C).....	73
Figura 14	Crescimento microbiano proveniente dos meios residuais de <i>Dunaliella salina</i> apresentaram colônias amarelas (A) e colônias marrom-alaranjadas (B), a <i>Haematococcus pluvialis</i> com colônias alaranjadas (C e D) e de <i>Arthrospira platensis</i> com colônia acinzentada arredondada (E).....	73
Figura 15	Logarítmo da concentração celular (UFC.mL ⁻¹) de <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. pumilus</i> e <i>B. aurantiaca</i> em função do tempo em meio TSB, cultivados a 37°C a 150rpm por 24h.....	79

- Figura 16** Logarítmo Neperiano da concentração celular (UFC.mL⁻¹) em função do tempo, no período de crescimento exponencial, de *B. atrophaeus*, *B. pumilus* e *B. aurantiaca* em meio TSB, cultivados a 37°C a 150rpm por 24h..... 79
- Figura 17** Concentração de \blackrightarrow *D. salina* axênica (concentração inicial de 10⁴ células.mL⁻¹) e de co-culturas de *D. salina* (concentração inicial de 10⁴ células.mL⁻¹) com \blacksquare *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10² UFC.mL⁻¹); \blacktriangle *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10⁴ UFC.mL⁻¹); \times *B. pumilus* (concentração inicial de 10² UFC.mL⁻¹); \ast *B. pumilus* (concentração inicial de 10⁴ UFC.mL⁻¹). Cultivos realizados em condições de luminosidade de 20 (\pm 10) μ mol fótons . m⁻². s⁻¹, 25°C a 110 rpm..... 81
- Figura 18** A) célula de *D. salina* axênica íntegra; B) conteúdo intra celular extravasado devido a lise da membrana celular de *D. salina*..... 82
- Figura 19** Logarítmo da concentração de células de \blackrightarrow *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10² UFC.mL⁻¹); \blacksquare *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10⁴ UFC.mL⁻¹); \blacktriangle *B. pumilus* (concentração inicial de 10² UFC.mL⁻¹); \times *B. pumilus* (concentração inicial de 10⁴ UFC.mL⁻¹) em cultivos em co-cultura com *D. salina*. Cultivos realizados em condições de luminosidade de 20 (\pm 10) μ mol fótons . m⁻². s⁻¹, 25°C a 110 rpm..... 83
- Figura 20** Curvas de crescimento de \blackrightarrow *D. salina* axênica (concentração inicial de 10⁵ células.mL⁻¹) e de co-culturas de *D. salina* (concentração inicial de 10⁵ células.mL⁻¹) com \square *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10² UFC.mL⁻¹); \blacktriangle *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10⁴ UFC.mL⁻¹); \times *B. pumilus* (concentração inicial de 10² UFC.mL⁻¹); \ast *B. pumilus* (concentração inicial de 10⁴ UFC.mL⁻¹); \bullet *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10¹ UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (1

concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹); $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹). Cultivos realizados em condições de luminosidade de $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm.....

85

- Figura 21** Concentração de células de $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); $\text{---}\blacksquare\text{---}$ *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); $\text{---}\blacksquare\text{---}$ *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); $\text{---}\ast\text{---}$ *B. atrophaeus* e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹); $\text{---}\bullet\text{---}$ *B. atrophaeus* e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹) em cultivos em co-cultura com *D. salina*. Cultivos realizados em condições de luminosidade de $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm.....
- Figura 22** *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ (controle) cultivadas a $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
- Figura 23** 1) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); 2) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹) cultivadas a $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
- Figura 24** 1) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); 2) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹) cultivadas a $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
- Figura 25** 1) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹, *B. atrophaeus* (1 concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹); 2) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹, *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (concentração

	inicial de 10^2 UFC.mL ⁻¹) cultivadas a 80 (± 10) μ mol fótons m ⁻² . s ⁻¹ ...	89
Figura 26	Curva de crescimento da biomassa de <i>B. atrophaeus</i> (g.L ⁻¹), concentração de açúcares redutores totais (ART) (g.L ⁻¹) e valor de pH em função do tempo de cultivo à 30°C.....	91
Figura 27	Curva de crescimento da biomassa de <i>B. atrophaeus</i> (g.L ⁻¹), concentração de açúcares redutores totais (ART) (g.L ⁻¹) e valor de pH em função do tempo de cultivo à 37°C.....	92
Figura 28	Logarítmo Neperiano da concentração celular (g.L ⁻¹) de <i>B. atrophaeus</i> e função do tempo para temperaturas de 30°C e 37°C....	94
Figura 29	Curva de crescimento de <i>D. salina</i> axênica (A) e xênica (B), comparando o meio f/2 e f/2 + E (extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372) de concentração celular (células.mL ⁻¹) por até 26 dias.....	96
Figura 30	Valores de pH dos cultivos das cepas de <i>D. salina</i> axênica (A) e xênica (B) em meio padrão f/2 e em meio modificado (f/2 + E).....	98
Figura 31	Velocidade específica do cultivo da cepa de <i>D. salina</i> axênica em meio padrão f/2 e em meio modificado (f/2 + E).....	98
Figura 32	Velocidade específica do cultivo da cepa de <i>D. salina</i> xênica em meio padrão f/2 e em meio modificado (f/2 + E).....	99
Figura 33	Curva de crescimento de <i>C. vulgaris</i> comparando o meio Bold e Bold + E (extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372).....	100
Figura 34	pH do cultivo da cepa de <i>C. vulgaris</i> em meio padrão Bold e em meio modificado (Bold + E).....	100
Figura 35	Velocidade específica do cultivo da cepa de <i>C. vulgaris</i> em meio padrão Bold e em meio modificado (Bold + E).....	101
Figura 36	(A) <i>D. salina</i> na fase verde em meio f/2 modificado; (B) <i>D. salina</i> em carotenogênese no meio padrão, em 24 dias de cultivo.....	102

Figura 37	<i>C. vulgaris</i> cultivada em meio com extrato bacteriano (A) comparado ao meio padrão (B).....	102
Figura 38	Curva de crescimento de <i>A. platensis</i> comparando o meio Schlösser e Schlösser + E (extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372).....	103
Figura 39	Velocidade específica do cultivo da cepa de <i>A. platensis</i> em meio padrão Schlösser e em meio modificado (Schlösser + E).....	104
Figura 40	Curva de crescimento de <i>H. pluvialis</i> comparando o meio Bold e Bold + E (extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372).....	104
Figura 41	Valores de pH dos cultivos das cepas de <i>H. pluvialis</i> em meio padrão Bold e em meio modificado com extrato bacteriano (Bold + E).....	105
Figura 42	Concentração celular de <i>C. vulgaris</i> em função do tempo em cultivo em fotobiorreator tubular por processo semi-contínuo, com fração de corte de 80%. Foram realizados cortes nos instantes 7, 14 e 18 dias.....	106
Figura 43	Figura 43. Crescimento de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 em meio padrão (TSB1) e extrato lisado de <i>C. vulgaris</i> , aclimatados em meio TSB por 24 horas, e em meio padrão não aclimatado (TSB2).....	109
Figura 44	Curva de calibração de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372, relacionando absorbância (600nm) e concentração em massa seca (g.L ⁻¹).....	138
Figura 45	Curva de calibração de <i>Chlorella vulgaris</i> , relacionando absorbância (682nm) e concentração em massa seca (g.L ⁻¹).....	139
Figura 46	Curva de calibração de <i>Arthrospira platensis</i> , relacionando absorbância (560nm) e concentração em massa seca (g.L ⁻¹).....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquema experimental indicando a concentração inicial de cada microrganismo nos cultivos de co-cultura*.....	67
Tabela 2	Valores de absorvância (600nm), pH, osmolaridade e condutividade do meio residual de <i>Dunaliella salina</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> e <i>Arthrospira platensis</i> incubados a 100 rpm, a 37° C por 3 dias	72
Tabela 3	Características diferenciais das bactérias isoladas e identificadas (Adaptado: RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015; SHIVAJI et al., 2006; GORDON, 1977, KARMAKAR et al., 2019; CCUG, 2001).....	76
Tabela 4	Valores de pH dos cultivos em co-culturas de <i>D. salina</i> axênica com <i>Bacillus atrophaeus</i> e <i>Bacillus pumilus</i> com concentrações iniciais de 10 ² e 10 ⁴ células.mL ⁻¹ cultivadas a 25°C, e com 20 (±10) μmol fótons m ⁻² . s ⁻¹	84
Tabela 5	Valor de pH das co-culturas de <i>D. salina</i> axênica com inóculos iniciais de 10 ⁵ células.mL ⁻¹ cultivadas a 80 (±10) μmol fótons m ⁻² . s ⁻¹	87
Tabela 6	Osmolaridade durante os cultivos de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 para produção de extrato, de 30° C e 37° C.....	93
Tabela 7	Composição proximal do extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372....	94
Tabela 8	Valores médios de concentração de <i>D. salina</i> axênica com concentração inicial de 10 ⁵ células.mL ⁻¹ em meio f/2, em meio f/2 em co-cultura de <i>B.atrophaeus</i> e <i>B. pumilus</i> (concentração inicial de 10 ² UFC.mL ⁻¹), e em meio modificado em meio f/2 com 0,5% de extrato de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372.....	95
Tabela 9	Valor de pH dos cultivos das cepas de <i>A. platensis</i> em meio padrão Schlösser e em meio modificado com extrato bacteriano	

	(Schlösser + E).....	103
Tabela 10	Composição proximal do meio TSB e do extrato de <i>C. vulgaris</i>	108
Tabela 11	Composição do meio de cultura TSB e do meio modificado, com uso de extrato de <i>C. vulgaris</i>	108
Tabela 12	Valor de pH do cultivo de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 em meio de <i>C. vulgaris</i> comparada ao TSB 1 (inóculo cultivado em meio TSB) e TSB 2 (inóculo cultivado em meio sólido com meio PCA) em 24 horas a 37° C.....	111
Tabela 13.	Quantidade de aminoácidos em gramas por 100 g de proteínas de <i>C. vulgaris</i> , <i>D. salina</i> , <i>H. pluvialis</i> e <i>A. platensis</i> comparados a soja e triptona.....	112

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa
CO ₂	dióxido de carbono
DO	densidade ótica
g	grama
h	hora
L	litro
m	metro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mN/m	miliNewton por metro
O ₂	gás oxigênio
Osm/kg	osmol por quilograma
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	unidade formadora de colônia
s	segundo
μS/cm	microSiemens por centímetro
° C	graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

Na última década, as microalgas verdes ganharam interesse como fonte de diferentes biocompostos (LOPEZ; MAGDALENO; STEPHANO, 2017) com alto valor agregado, como carotenoides e ácidos graxos insaturados. Existe uma alta demanda por carotenoides naturalmente sintetizados, como β -caroteno e luteína nos mercados globais (WICHUK; BRYNJÓLFSSON; FU, 2014).

As espécies de microrganismos fotossintetizantes mais cultivadas para a obtenção de biomassa e extração de produtos são das espécies *Dunaliella salina* Teodoresco, na obtenção de betacaroteno, *Haematococcus pluvialis* Flotow como fonte de astaxantina, *Chlorella* Beyerinck e *Arthrospira* Stizenberger usados como aditivos alimentares (BECKER, 2004), sendo recursos importantes para a produção de novos produtos biofarmacêuticos no futuro (CARRASCO-REINADO et al., 2019), e fonte de potenciais moléculas para uma ampla variedade de medicamentos, cosméticos, alimentos e rações animais (RAHMAN et al., 2020).

Entretanto, a produtividade de carotenoides em microalgas tem sido historicamente baixa, e a viabilidade econômica da biotecnologia de microalgas é limitada pelos custos de processamento e eficiência fotossintética, bem como pela produtividade em células (WICHUK; BRYNJÓLFSSON; FU, 2014). Os principais desafios são o alto custo de operação, infraestrutura e manutenção, seleção de linhagens de algas com alto teor de proteínas, desidratação e colheita em escala comercial (RAHMAN et al., 2020).

O desenvolvimento de tecnologias inovadoras e sustentáveis com insumos mínimos de energia é necessário para o cultivo em larga escala (RAHMAN et al., 2020). Aliada as tecnologias baseadas em co-culturas, as bactérias são capazes de produzir componentes celulares que detectam e respondem a sinais físicos para aperfeiçoar suas funções (DUFRENE; PERSAT, 2020). Sendo assim, podem realizar alterações fisiológicas em microalgas, alternativa viável para o crescimento de biomassa (KOUZUMA; WATANABE, 2015).

A biomassa de microalgas é considerada um dos pilares fundamentais para a economia sustentável, fornecendo mais recursos alimentares sem a necessidade de mais terras agrícolas e ajudando a resolver os dilemas do esgotamento de combustíveis fósseis (CARRASCO-REINADO et al., 2019).

Com grande potencial comercial (SUI et al., 2019), pelo menos 145 espécies de microalgas são usadas em todo o mundo (GUJAR et al., 2019). A *Persistence Market Research* (2018) compilou um relatório no qual estima-se que taxa de crescimento anual composta no mercado global de microalgas no período de 2017 a 2026 seja de 4,6%. A *Arthrospira* e a *Chlorella* permanecerão nos principais segmentos de produtos, liderando o mercado global durante o período, com mais de 80% da participação. Neste mercado haverá uma expansão mais rápida da América do Norte, seguida pela Europa e Ásia-Pacífico.

Dessa forma, devido ao seu potencial de produção, inclusive amparado por vários processos já instalados em países como Austrália, Índia e China (BOROWITZKA, 2013), há necessidade de estudos envolvendo microrganismos fotossintetizantes, o que pode contribuir para sua produção em nosso país. Segundo a EMBRAPA (2016), o Brasil possui biodiversidade microalgal, e seu cultivo é favorecido por sua extensão territorial, pela disponibilidade de água e a alta incidência de radiação solar. Essas características edafoclimáticas são importantes para o país tornar-se uma figura ativa no cenário de biofábricas, utilizando microalgas para a produção de inúmeros ativos alinhados ao novo contexto de economia circular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microalgas

Microalgas são microrganismos autotróficos, unicelulares, eucarióticos, que se reproduzem principalmente de forma assexuada, além de se diferenciarem quanto à origem, composição química e morfologia (COLL, 2006). Podem ser agrupadas em várias categorias de acordo com a coloração (vermelho ou verde), e dependendo da fonte de energia utilizada, podem ser cultivadas em condições autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas (BAICHA et al., 2016). São seres fotossintetizantes que requerem para o seu crescimento: água, luz, dióxido de carbono (CO₂), e nutrientes inorgânicos (PELIZER; CARVALHO; MORAES, 2015).

Através do processo de fotossíntese, as microalgas usam a luz solar para produzir óleos e açúcares de maneira mais eficiente do que as plantas (BAICHA, 2016), porque muitas espécies crescem mais rapidamente que plantas terrestres, fato que possibilita obter maior quantidade de biomassa; a natureza unicelular da microalga assegura uma biomassa com a mesma composição bioquímica, o que não ocorre com plantas terrestres, em que os compostos são produzidos em partes específicas como: frutos, folhas, sementes ou raízes; e com a manipulação das condições ambientais de cultivo é possível induzir a síntese e o acúmulo de altas taxas de proteínas, carboidratos, e lipídios (RICHMOND, 1990). Além disso, por possuírem a capacidade de consumir CO₂ durante esse processo, suas condições de crescimento são muito estudadas por contribuir para a redução do efeito estufa (BUI; TRAN; CHEN, 2016). Seu rendimento de produção não é apenas alto, mas também ambientalmente amigável (BARKA; BLECKER, 2016). A temperatura e o valor de pH devem estar na faixa de tolerância da microalga cultivada, que pode variar entre gêneros e espécies. As microalgas, em sua diversidade, são organismos muito flexíveis quanto ao *habitat*, sendo encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres, quanto em ambientes aquáticos de água doce e salgada (FRANCO et al., 2013).

Microalgas são as fontes mais produtivas de nutrientes do mundo. Existe um interesse crescente em microalgas, devido à sua capacidade de concentrar nutrientes essenciais e substâncias funcionais (BARKA; BLECKER, 2016).

2.1.1 *Chlorella vulgaris*

As espécies do gênero *Chlorella* da ordem *Clorococcales* possuem morfologia esférica ou elipsoidal (Figura 1), com cerca de 2 a 10 μm de diâmetro, não possuem flagelos e a reprodução é por autoesporo, sendo de forma assexuada e rápida (GHASEMI et al., 2011; SAFI et al., 2014a).

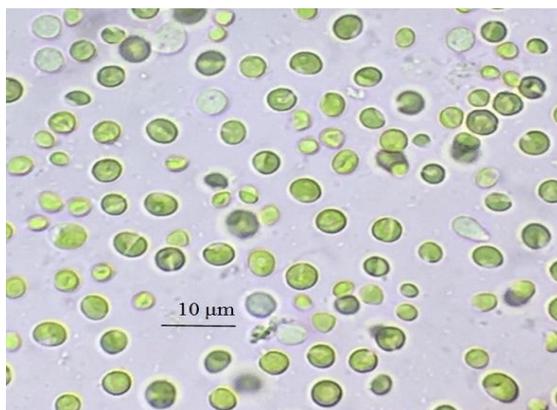


Figura 1. Microscopia do cultivo de *Chlorella vulgaris* (Fonte: RAMARAJ; UNPAPROM; DUSSADEE, 2016).

A rigidez da parede celular preserva a integridade da célula, e é basicamente uma proteção contra invasores a um ambiente hostil. Porém, essa rigidez varia de acordo com cada fase de crescimento (Figura 2) (SAFI et al., 2014a).

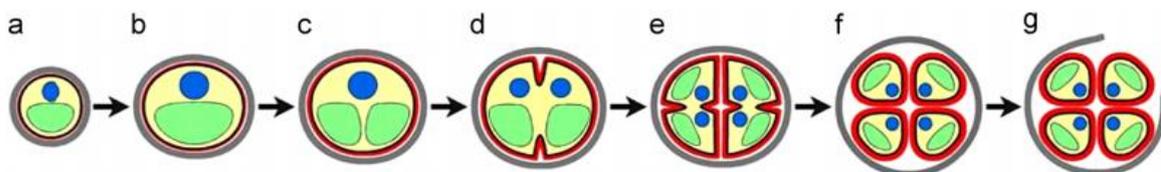


Figura 2. Esquema mostrando diferentes fases da formação da parede celular filha em *Chlorella vulgaris*: (a) fase inicial de crescimento celular; (b) fase tardia do crescimento celular; (c) cloroplasto na fase de divisão; (d) fase inicial de divisão dos protoplastos; (e) fase de divisão tardia dos protoplastos; (f) fase de maturação das células filhas; (g) fase de eclosão (Fonte: Adaptado YAMAMOTO; KURIHARA; KAWANO, 2005).

Então, durante sua formação inicial em autosporângios, a parede celular recém-formada permanece frágil, formando uma fina camada unilaminar densa de 2 nm. A parede celular da célula filha aumenta gradualmente de espessura até atingir 17–21 nm após a maturação, onde uma microfibrilaridade é formada em uma camada do tipo quitosana composta por glucosamina, responsável por sua rigidez. No estágio maduro, a espessura e a composição da parede celular não são constantes porque podem mudar de acordo com as diferentes condições de crescimento (SAFI et al., 2014a).

O valor de pH ótimo para o crescimento é de 7,0 a 7,5, e a temperatura de 25° C a 30° C (CHOI; LEE, 2011). Em relação ao cultivo heterotrófico, demonstrou levar a uma maior produtividade de biomassa e, portanto, pode ser considerado mais produtivo do que a produção baseada somente em crescimento fotoautotrófico (CANELLI et al., 2020).

Espécies de microalgas com alta estabilização de CO₂ possuem a capacidade de minimizar o custo do tratamento de gases oriundos da queima de combustíveis fósseis. Para fixação de CO₂ com a velocidade de consumo desse gás na faixa de 0,73 a 1,79 g.L⁻¹.d⁻¹, as espécies de *Chlorella* podem ser alternativas adequadas. Além disso, os compostos orgânicos voláteis presentes na corrente de ar não afetam a assimilação de CO₂ das espécies de *Chlorella*. A velocidade de crescimento das microalgas indica que a assimilação de CO₂ e produtividade de biomassa estão positivamente correlacionadas com a capacidade de serem utilizadas na biomitigação de CO₂. Assim, para maximizar a fixação, deve-se obter maior produtividade de biomassa (BARAHOEI et al., 2020).

McClure e colaboradores (2019) quantificaram o efeito das condições operacionais na produção de luteína usando *Chlorella vulgaris* em escala piloto. Verificou-se que baixas intensidades de luz e níveis relativamente altos de nitrato no meio levaram a luteína a altas concentrações, ao mesmo tempo em que o aumento da intensidade da luminosidade aumenta as concentrações celulares, podendo ser operados em modo semi-contínuo por 32 dias com o desempenho geral do sistema sendo consistente ao longo desse tempo.

2.1.2 *Dunaliella salina*

A *Dunaliella salina* é uma microalga de coloração verde, com diâmetro de 10 µm (Figura 3), pertencente à classe *Chlorophyceae* (ZHANG et al., 2015). Destaca-se por ser halotolerante, com capacidade de crescimento em salinidade de 0,05 a 5,0 M de NaCl e mantém concentrações de sódio intracelular relativamente baixas, mesmo em alta salinidade. A *Dunaliella* acumula grande quantidade de glicerol no meio intracelular, ao passo que o nível deste composto é encontrado proporcional e osmoticamente equivalente à concentração do NaCl externo e, cerca de 8 M ou 55% da massa seca da célula em NaCl saturado. A Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*G3pdh*) é uma enzima importante na via metabólica da síntese de glicerol. O acúmulo de glicerol é proporcional ao aumento da salinidade, e a célula também pode diminuir ou aumentar rapidamente o conteúdo de glicerol para se adaptar ao choque hiposmótico ou hiperosmótico (CHEN et al., 2011).

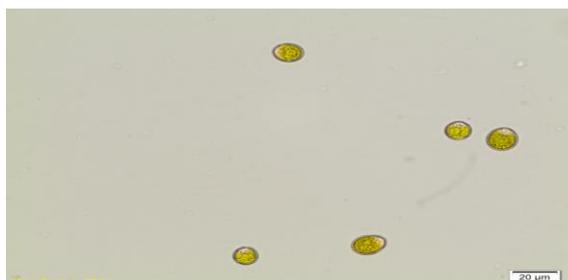


Figura 3. *Dunaliella salina* CCAP 19/18 xênica na fase verde (Fonte: Adaptado CEZARE-GOMES et al., 2019).

As células dessas microalgas não contêm paredes celulares rígidas, sendo circundadas por uma membrana fina e elástica (MAI et al.; 2017). A microscopia mostra o acúmulo de carotenoides de *D. salina* quando há a privação nutricional na fase estacionária (Figura 4).



Figura 4. Morfologia celular de *Dunaliella salina* sob privação de nutrientes: A) 6 dias; B) 9 dias; C) 12 dias; D) 15 dias; E) 20 dias (Fonte: Própria autora).

O formato da célula pode ser alterado, tornando-se esféricas devido a condições desfavoráveis, e o tamanho celular pode variar devido à intensidade luminosa (MAI et al., 2017). Quando sofrem um estresse abiótico tornam-se laranjas devido à superacumulação de β -caroteno no interior do plastídio (TAVALLAIE et al., 2015; MAI et al., 2017), de modo que tal quantidade pode corresponder à cerca de 14% da massa seca (SRINIVASAN et al., 2018). Esta microalga pode ser utilizada como aditivo alimentar, antioxidante, e precursora da vitamina A (RAMÍREZ-MÉRIDA et al., 2015)

Embora o cultivo comercial de *Dunaliella salina* ocorra em culturas ao ar livre, o uso de fotobiorreator tubular fechado foi proposto para esta produção associado ao processo semi-contínuo, no qual atingiu $328,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de carotenoides por mês, que representaram 10% da massa seca, sendo que 90% do total de carotenoides era β -caroteno (PRIETO; CAÑAVATE; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2011).

Os fotobiorreatores fechados geralmente elevam as concentrações celulares comparadas às obtidas em tanques abertos, havendo menos problemas de contaminação, o que promete ser um processo viável para a produção de carotenoides. No processo semi-contínuo, adiciona-se o meio de cultura e o inóculo ao biorreator. Depois do final do processo, parte do meio de cultura é removido, sendo substituído pelo mesmo volume de meio fresco. A vantagem desse processo é operar o biorreator por longos períodos sem a necessidade de preparar um novo inóculo, e a produtividade pode ser maior do que o processo de batelada, por trabalhar com células adaptadas ao meio de cultura ao longo do tempo (CEZARE-GOMES et al., 2019). O intervalo de pH para o cultivo deve ser entre 6,0-9,0 (YING et al., 2014).

2.1.3 *Haematococcus pluvialis*

A microalga verde do gênero *Haematococcus* descrito por Flotow (1844) é unicelular, de água doce, pertencente à classe *Chlorophyceae* (KIM et al., 2015; BA et al., 2016). É biflagelada, amplamente relatado como tendo reprodução

assexuada por esporocisto para formar 8-16 zoósporos, sendo seu ciclo de vida apresentado na Figura 5 (KIM et al., 2016).

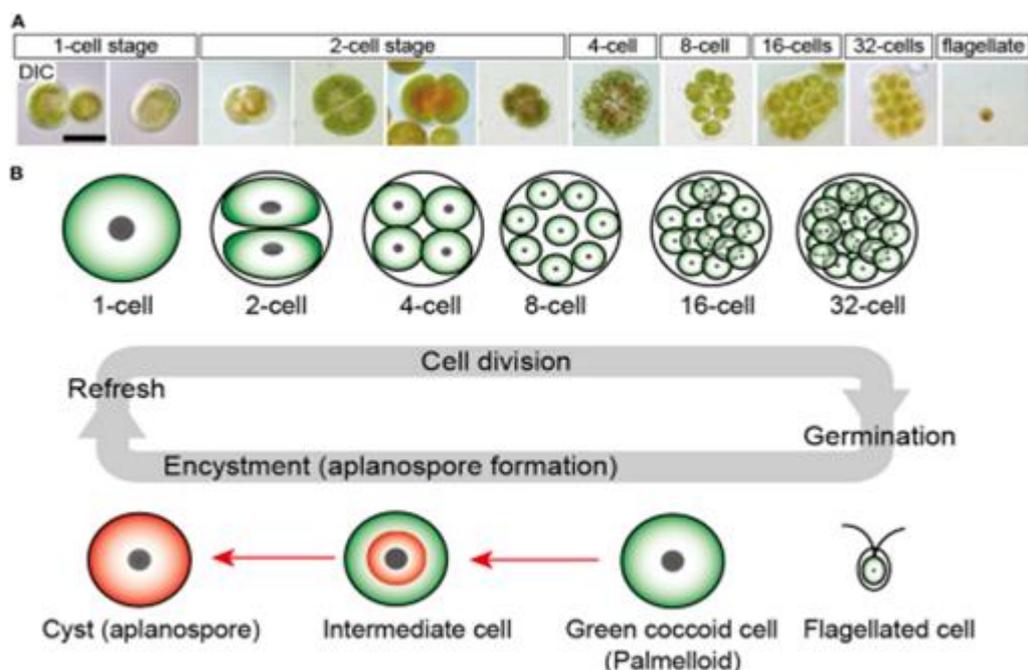


Figura 5. Ciclo de vida de *H. pluvialis*. (A) Imagens de microscopia mostrando os estágios de 1 a 32 células e o estágio flagelado. (B) Ilustração de ciclo de vida de *H. pluvialis* (Fonte: Adaptado de WAYAMA et al., 2013).

Seu ciclo de vida é marcado por quatro tipos celulares distintos, nomeados zoóides móveis (ovóides; 10-20 μm), palmelóides verdes (esféricos; 20-40 μm), palmelóides intermediários e cistos vermelhos maduros (esféricos; 30-60 μm). Os zoóides móveis, 2-3 semanas após a liberação das células em repouso, rapidamente sofrem morfogênese perdendo seus flagelos, arredondando para formar, inicialmente, verdes palmelóides, depois intermediários e, finalmente, cistos vermelhos maduros cobertos com uma parede celular multicamada (1,8-2,2 μm) (KIM et al., 2016).

Este microrganismo tem um ciclo de vida atípico, na medida em que é capaz de passar de estado celular vegetativo rico em clorofilas e proteínas para um estado de cisto quando submetido a estresse. Neste estado de cisto, *H. pluvialis* é cercada por uma parede celular espessa e pode produzir altas quantidades de metabólitos secundários, incluindo carotenoides, especialmente astaxantina (BA et al., 2016). Contudo, a forma vegetativa é igualmente digna de

atenção devido à quantidade de carboidratos (40%) e proteínas (27%) (BA et al., 2016).

Quando culturas antigas são transplantadas para um meio fresco, as células cocóides sofrem divisão celular, para formar célula mãe flagelada na parede celular. Na germinação, as células flageladas se assentam e se tornam células cocóides. A luz contínua e/ou forte acelera o acúmulo de astaxantina durante o encistamento (SHAH et al., 2016).

Haematococcus acumula aproximadamente 5% da massa seca em astaxantina. Durante as últimas décadas, tanques abertos e variedades de fotobiorreatores fechados foram estabelecidos em todo o mundo, desde escala laboratorial à industrial. Os sistemas convencionais contam com problemas como a velocidade de crescimento baixa e a fácil contaminação. Além disso, as concentrações de biomassa geralmente são inferiores a 10 g.L^{-1} , o que significa que mais de 99% do volume equivale ao meio de cultura e não à biomassa. Embora a água do meio de cultura possa ser reciclada para o próximo lote, o processo também é muito dispendioso (ZHANG et al., 2014).

Em um processo semi-contínuo, a cultura foi otimizada ao substituir o meio Chu modificado pelo meio Bold. A melhoria de rendimentos neste estudo indica que é necessário avaliar a formulação de meios de cultura apropriados para aplicações biotecnológicas microalgais. Além disso, o uso de formulações otimizadas, juntamente com o estabelecimento de condições ideais de crescimento, proporcionou uma estrutura mais sólida para estudos fisiológicos dessa microalga. A obtenção de alta produtividade celular em culturas semi-contínuas através de novo meio otimizado deve servir de base para o desenvolvimento de tecnologia para a produção de astaxantina a partir de *H. pluvialis* (FÁBREGAS et al., 2000).

O valor de pH pode afetar significativamente o crescimento e a síntese celular de clorofila e carotenoides. Em termos de produção ideal de biomassa e astaxantina, o valor de pH ideal está dentro da faixa de 7,00 a 7,85. A carotenogênese é induzida nas células após exposição a maior intensidade luminosa que o ponto de saturação da luz correspondente. Contudo, o valor ótimo específico de saturação da luz difere entre os estudos, variando entre 100 a $480 \text{ } \mu\text{mol f} \acute{\text{o}}\text{tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. A irradiação ideal mais baixa foi influenciada por outras

condições de estresse, como deficiência de nutrientes ou temperatura elevada (SHAH et al., 2016).

A irradiação típica para o cultivo de *H. pluvialis* varia entre 40 e 50 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mas tendem a ser mais altas, ou seja, de 70 até 177 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para alcançar melhores taxas de crescimento. Esses valores ótimos podem ser influenciados por outros parâmetros de cultivo, como composição do meio, temperatura ou a cepa de *H. pluvialis*. Durante o estágio vegetativo do cultivo, os ciclos regulares de alternância 12h:12h, claro ou escuro, ou 16h:8h são frequentemente usados, mas as culturas de maior concentração são alcançadas com iluminação contínua (SHAH et al., 2016).

2.1 Cianobactéria

Como as plantas terrestres, as algas são organismos autotróficos. Entre as microalgas, enquanto algumas são eucarióticas e comumente identificadas como algas, outras não possuem membrana nuclear (cianobactérias) e suportam uma estrutura intermediária entre bactérias e plantas (BARKA; BLECKER, 2016).

As cianobactérias (algas verde-azuladas) são microrganismos procariotos, unicelulares ou multicelulares, sendo a maioria fotoautotrófica aeróbica. Dessa forma, necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é seu principal modo de metabolismo energético. Algumas cianobactérias mostram uma capacidade distinta de nutrição heterotrófica. Além disso, foram as primeiras a colonizar e se reproduzir em água salgada, salobra ou água doce, em fontes frias e quentes, e em ambientes extremos onde nenhuma outra microalga pode existir (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999).

2.2.1 *Arthrospira platensis*

O gênero *Spirulina* da família *Oscillatoriaceae* (CIFERRI; TIBONI, 1985) é uma cianobactéria filamentosa multicelular (CIFERRI, 1983) caracterizada por

cadeias de células em forma de espiral (Figura 6) encerradas em uma bainha fina. Dimensões da célula, grau de enrolamento e o comprimento dos filamentos variam de acordo com a espécie, mediante mudanças no crescimento ou nas condições ambientais (CIFERRI & TIBONI, 1985).



Figura 6. Morfologia da *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Fonte: Própria autora).

A *S. platensis* possui o diâmetro de 6 a 8 μm e o diâmetro da hélice de 35 a 50 μm , e um citoplasma granular contendo vacúolos gasosos e septos facilmente visíveis (CIFERRI, 1983). O pigmento verde-azulado se deve a presença da clorofila e da ficocianina (TOMASELLI; BOLDRINI; MARGHERI, 1997). A reprodução (Figura 7) é realizada pela quebra do tricoma de uma célula intercalar que ao perder seu citoplasma, as células de cianobactérias morrem (necridio), dando origem a cadeias curtas de células para que elas possam se dividir (CIFERRI & TIBONI, 1985).

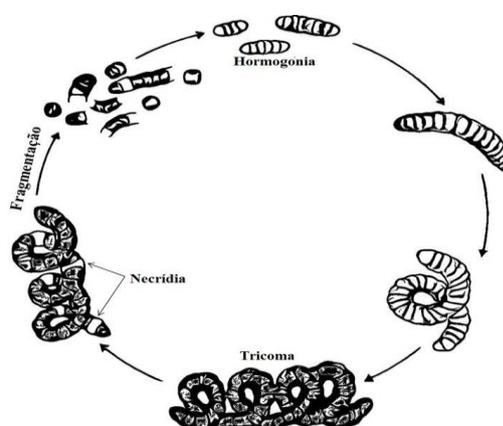


Figura 7. Ciclo de vida da *A. platensis* (Fonte: Adaptado CIFERRI, 1983).

Essa espécie foi reclassificada como *Arthrospira platensis*, a qual foi aceita oficialmente pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (TOMASELLI; BOLDRINI; MARGHERI, 1997).

Os cultivos de *A. platensis* podem ser realizados em tanques abertos (CARVALHO et al., 2012) ou em fotobiorreatores fechados (TORZILLO et al., 1986). No estudo de Ferreira et al. (2010), que trabalharam com processo descontínuo alimentado para o crescimento de *A. platensis*, foi realizado um rigoroso controle da alimentação de sulfato de amônio, que se apresentou como uma fonte de nitrogênio alternativa viável para este cultivo.

O meio de cultura padrão utilizado para essa cianobactéria é rico em íons bicarbonato e carbonato, tornando-o alcalino. A forma em que a fonte de carbono se apresenta varia de acordo com o valor de pH do meio: se o valor de pH é inferior a 6,4, o dióxido de carbono é a forma predominante. Em valores de pH entre 6,4 a 10,3, predomina o bicarbonato e acima de valor de pH 10,3, a forma predominante é o carbonato (RUSSEL, 1982). Sendo assim, o valor de pH ótimo para o crescimento desse microrganismo é registrado em 9,0 ((ISMAIEL; EL-AYOUTY; PIERCEY-NORMORE, 2016). Quando há a privação de bicarbonato no meio, as cianobactérias possuem a capacidade de acumulá-lo intracelularmente (CORNET et al., 1998).

2.1 Bactérias

São organismos procariotos, cuja composição química da parede celular é constituída por peptideoglicano, conferindo força e rigidez (PIMENTEL; DIONÍSIO; SIGNOR, 2016). Uma célula bacteriana típica é composta por cerca de 12% de nitrogênio, um importante elemento constituinte de proteínas, ácidos nucleicos e vários outros compostos (SOUSA, 2013).

Os componentes celulares permitem que as bactérias detectem e respondam a sinais físicos para aperfeiçoar suas funções. Através de técnicas biofísicas, os pesquisadores têm estudado a amplitude dos fenótipos bacterianos como a adesão, a motilidade, a formação de biofilme e a patogenicidade (DUFRÊNE; PERSAT, 2020).

2.3.1 *Bacillus atrophaeus*

O *Bacillus atrophaeus* é um bacilo Gram positivo com as seguintes características: aeróbico, mesófilo, o qual a temperatura ideal de cultivo está na faixa de 20 °C à 37 °C, não é patogênico, e também é formador de esporos (SLEPECKY; HEMPHILL, 2006), tolerando temperaturas extremas. Há relatos que a singularidade do gênero *Bacillus* consiste na sua habilidade de sobreviver à dessecação, ao calor e ao frio, e possuir condições de prontamente germinar. Estes microrganismos são amplamente distribuídos na natureza e estudados devido a sua aplicação na agricultura e na indústria (FEKETE, 2009). Há grande diversidade de cepas importantes na produção de uma variedade de produtos, incluindo alimentos fermentados, enzimas industriais, proteínas heterólogas, bioinseticidas, antibióticos, nucleotídeos, ácido poli-gama-glutâmico, D-ribose e outros produtos com aplicações comerciais (SCHALLMEY et al., 2004; SELLA VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b).

Em 1872 o gênero *Bacillus* foi estabelecido por Ferdinand Cohn e mais tarde por Koch no mesmo ano, embora Christian Gottfried Ehrenberg ser frequentemente creditado com a primeira descrição de *Bacillus subtilis* no ano de 1835, quando a bactéria foi nomeada *Vibrio subtilis*. Inicialmente, a classificação do gênero foi baseada em sua capacidade de esporular e nos aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Atualmente, o RNA ribossomal 16S - 23S são analisados para agrupar o gênero *Bacillus* em diferentes sub-agrupamentos filogenéticos (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b). O *Bacillus atrophaeus* é uma reclassificação do *Bacillus subtilis* var. *niger*, utilizado como um indicador biológico na validação e monitoramento da esterilização por calor seco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e pelo óxido de etileno (NOGAROTO; VESSONI-PENNA, 2006).

O ciclo de vida do *Bacillus* e a estrutura dos esporos são fundamentais para entender a resistência do esporo diante de agentes físicos e químicos. Este ciclo consiste em três diferentes processos fisiológicos: crescimento vegetativo, esporulação e germinação. O crescimento vegetativo é caracterizado por divisão binária simétrica que ocorre quando há nutrientes disponíveis. Enquanto a

esporulação possui vários sinais ambientais como a privação de nutrientes, aumento de minerais, pH neutro, temperatura e o aumento da densidade celular podem engatilhar a diferenciação de células vegetativas em endósporos (Figura 8) (SELLA VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b).

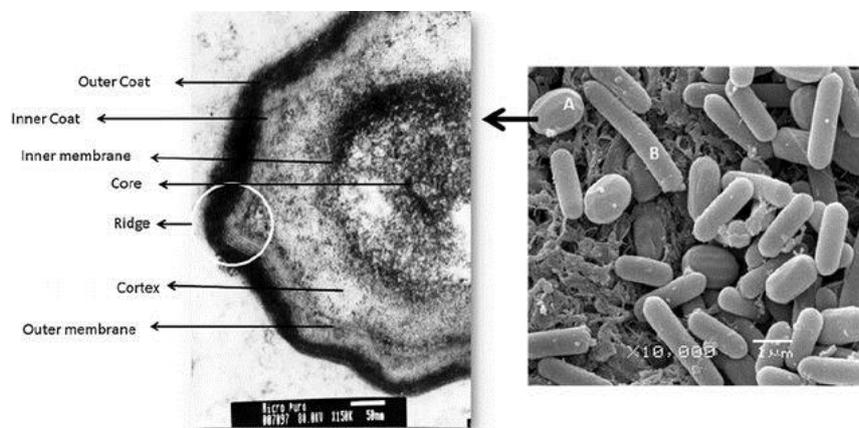


Figura 8. Direita: Micrografia eletrônica de varredura de esporos de *B. atropheus* (A) e células vegetativas (B) em uma superfície de ágar. A barra de escala representa 1 μm . Esquerda: corte transversal de um esporo. A barra de escala é de 50 nm. (Fixação com glutaraldeído e formaldeído em tampão de cacodilato, pós-fixação com tetróxido de ósmio, desidratação em uma série de etanol e óxido de propileno e incorporação em resina PolyEmbed 812, seguida por microscopia eletrônica de transmissão de seção delgada (Fonte: SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

A esporogênese em bactérias do gênero *Bacillus*, está intimamente ligada à composição do meio de cultivo, sendo que determinadas fontes de carbono podem impedir as vias metabólicas que conduzem a síntese do esporo. A relação célula/esporos, para a obtenção durante o crescimento exponencial, mostrou-se dependente da fonte de nitrogênio. Em amostras de *B. subtilis*, verificou-se que vários metabólitos como D-glicose-6-fosfato, L-glicose-6-fosfato ou compostos derivados como fosfolipídios e ácido glicerol teicóico não podiam ser interconvertidos entre si, determinando a supressão da esporogênese (RABINOVITCH; SILVA, 1973).

A massa celular aumenta quando associada com o acúmulo de peptídeos secretados pela própria bactéria, que são detectados pelos receptores da superfície celular e que promovem a ativação do regulador de SpoA mestre (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b).

Este microrganismo tem a capacidade de produzir surfactantes biológicos, também conhecidos como biosurfactantes, que é um grupo diversificado de compostos químicos tensoativos produzidos espontaneamente por microrganismos, extracelularmente ou como parte da membrana celular. São proteínas com poder de detergente, emulsificante e surfactante que diminuem a tensão superficial da água e de outros solventes. E são produzidos em culturas de *B. subtilis* usando açúcares como sacarose, glicose e lactose, óleos vegetais ou amido como fontes de carbono (DAS NEVES, 2007).

2.4 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos isoprenóides lipossolúveis. Sua estrutura básica consiste em um esqueleto de carbono simétrico e linear com uma série de ligações duplas conjugadas, que gera um sistema de ressonância de π -elétrons e corresponde à molécula cromóforo (Figura 9). Além da cor, esse recurso estrutural é responsável pela forma molecular e a reatividade química dos carotenoides (BRITTON,1995).

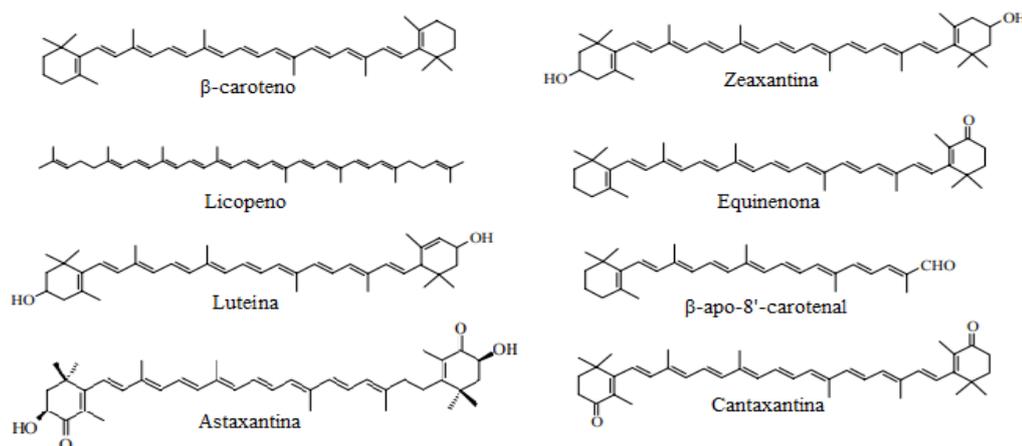


Figura 9. Exemplos de estruturas químicas de carotenoides obtidos por algas (Fonte: Adaptado DUFOSSÉ et al., 2005).

São amplamente reconhecidos como bioativos, que são comumente responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho de flores, frutas, vegetais, microrganismos e também alguns produtos de origem animal, como o salmão e a gema de ovo (BRITTON,1995).

2.4.1 Biossíntese de carotenoides

Os carotenoides são isoprenoides lipofílicos sintetizados por algumas bactérias não-fotossintetizantes e fungos, além de organismos fotossintetizantes como plantas, algas e cianobactérias (VALDUGA et al., 2009). A biossíntese de carotenoides se difere entre as espécies (VALDUGA et al., 2009; GONG; BASSI 2016). Todos os isoprenoides e carotenoides são derivados do carbono comum (C5) construindo unidades e compartilhando precursores metabólicos comuns (PANIGUA-MICHEL; OLMOS-SOTO; RUIZ, 2012).

A partir do Acetil-CoA, a via do ácido mevalônico citosólico (MVA) ou piruvato e glicerol 3 fosfato (G3P), utilizando a via plastídica metileritritol 4-fosfato (MEP), seguem para duas vias independentes para a síntese de difosfato de isopentenilo ou também chamado de pirofosfato de isopentenilo (PIP), e difosfato de dimetilalil (DMAPP) (VALDUGA et al., 2009; GONG; BASSI 2016) (Figura 10). Estudos sobre vias biossintéticas em microalgas ainda são escassos e relacionados a grupos específicos. Nos grupos de algas clorofíticas, a síntese de esteróis e carotenoides segue a via MEP (PANIAGUA-MICHEL; OLMOS-SOTO; RUIZ, 2012).

As diatomáceas marinhas *Nitzschia* sp. e *Phaeodactylum* sp. seguem o caminho do MVA para a biossíntese de esteróis citosólicos, a biossíntese de carotenoides, fitol e isoprenos é alcançada pela via 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritritol / 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose (DOXP / MEP). No caso de *Chlorella vulgaris*, a via do não-mevalonato está envolvida na biossíntese do difosfato de isopentenil após inibir a formação de brassinosteróide (PANIAGUA-MICHEL; OLMOS-SOTO; RUIZ, 2012).

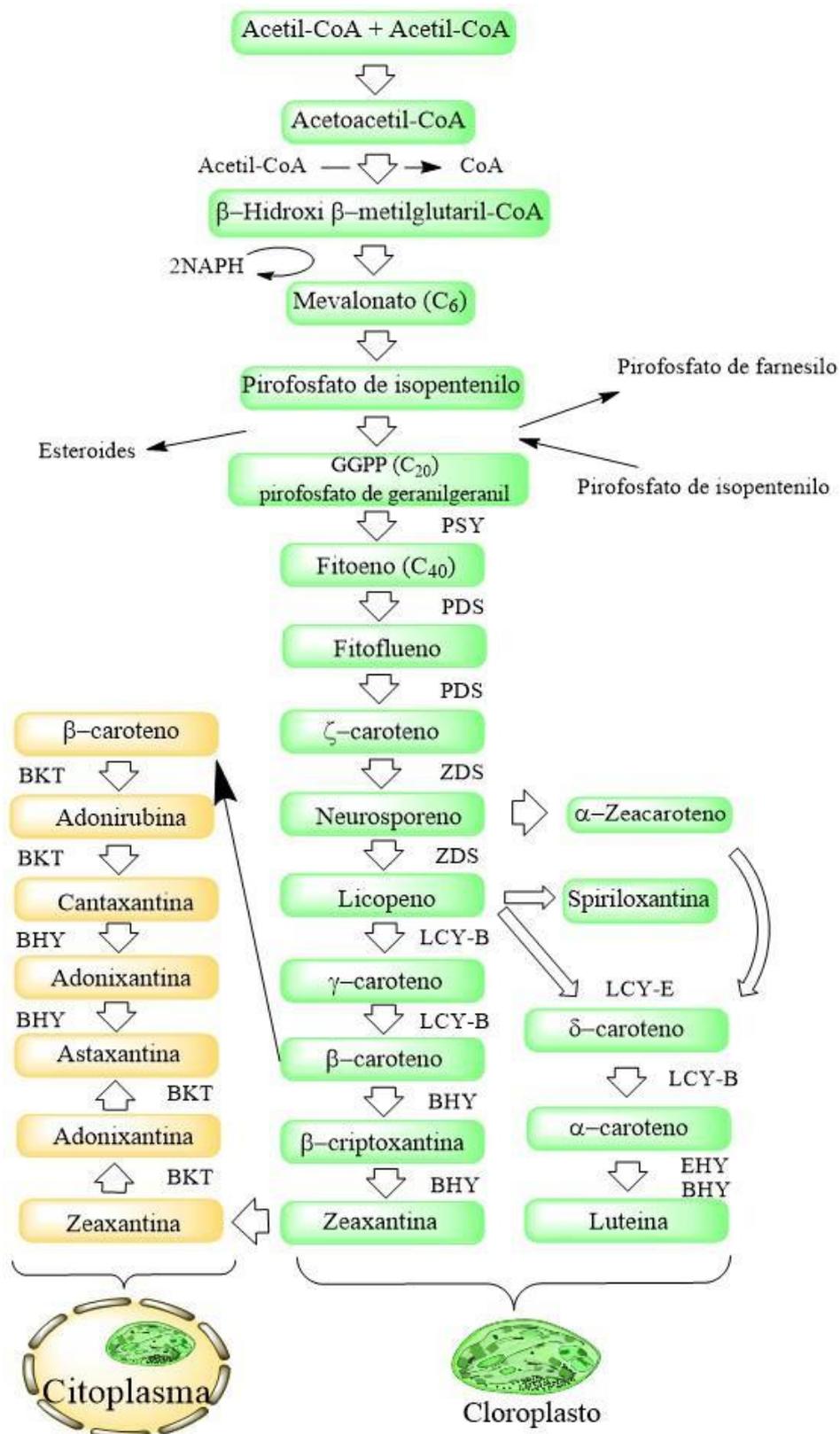


Figura 10. Biossíntese dos carotenoides (Fonte: Adaptado de RATLEDGE; EVANS, 1989 apud VALDUGA, 2005; EOSEON et al., 2006; YE et al., 2008 apud CEZARE-GOMES et al., 2019).

Em seguida, o farnesil difosfato C15 intermediário (FPP) ou difosfato de geranylgeranyl C20 (GGPP) são sintetizados na presença de enzimas por alongamento sucessivo da cadeia. Após dimerização do difosfato de geranylgeranyl, ocorre a formação do fitoeno, o primeiro composto de quarenta carbonos, ainda sem coloração. (VALDUGA et al., 2009; GONG; BASSI 2016).

A enzima fitoeno sintase (PSY) realiza a reação de entrada limitadora de taxa na biossíntese de carotenoides via organismos fotossintetizantes. Algumas algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. vulgaris*, *Volvox carteri*) e diatomáceas (*Thalassiosira pseudonana* e *Phaeodactylum tricornutum*) foram associadas a apenas uma classe do gene PSY. A duplicação recente do gene PSY foi relatada nas algas verdes *Dunaliella salina* / *bardawil*. A descoberta de duas classes de famílias de genes PSY em algumas algas sugere que a biossíntese de carotenoides nessas algas também é regulada diferencialmente em resposta ao desenvolvimento e ao estresse ambiental (PANIAGUA-MICHEL; OLMOS-SOTO; RUIZ, 2012).

Na presença de dessaturase, o ζ -caroteno pode ser formado em algas. O primeiro carotenoide colorido formado é o licopeno. Além disso, através de dois tipos de reações de ciclização, são produzidas as estruturas de α -caroteno ou β -caroteno. Transformações em cadeia adicionais, incluindo hidroxilação, epoxidação, cetolação, glicosilação e clivagem de oxigênio podem levar à família de carotenoides altamente diversificada (VALDUGA et al., 2009; GONG; BASSI, 2016).

O neurosporeno pode ser ciclizado em uma das extremidades, formando o anel β do β -zeacaroteno ou o anel α do α -caroteno, com a introdução de uma dupla ligação, respectivamente, estes dois carotenoides são transformados em γ -caroteno e δ -caroteno. O licopeno pode sofrer ciclização, gerando γ -caroteno e δ -caroteno. Estes dois carotenos também podem sofrer ciclização na outra extremidade, resultando respectivamente em β -caroteno e α -caroteno. Depois que a formação dos carotenoides cíclicos, a introdução de substituintes, como a hidroxila, gera as xantofilas (VALDUGA et al., 2009)

2.4.2 Aspecto econômico

O mercado global de carotenoides em 2010 foi cerca de US\$ 1,20 bilhão, com a maior parte dos carotenoides sendo produzidos por síntese química (BOROWITZKA, 2013). Em 2016, foi avaliado em US\$ 1,24 bilhão, e estima-se que em 2021 deve atingir US\$ 1,53 bilhão. Para este período previsto, o mercado de carotenoides é liderado por astaxantina, seguido de β -caroteno e luteína. Entre todos os carotenoides existentes, β -caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina e luteína são considerados os mais relevantes devido às suas aplicações estabelecidas. Contudo, fucoxantina, cantaxantina e o precursor fitoeno possuem potencial de entrada no mercado devido seu alto valor agregado (NOVOVESKÁ *et al.*, 2019), e suas propriedades antioxidantes para uso na área da saúde (SATHASISAM; KI, 2018)

Atualmente, a luteína é obtida por extração de pétalas de calêndula, onde está presente na forma de luteína e ésteres de luteína em concentrações que variam de 17 a 570 mg.100 g⁻¹, dependendo da espécie. A utilização de microalgas pode oferecer vantagens, pois, a concentração típica de luteína em microalgas geralmente é superior sendo entre 340–760 mg.100 g⁻¹ de massa seca. Além disso, o processamento utilizando-se microalgas elimina a necessidade de separar as pétalas das plantas (MCCLURE *et al.*, 2019).

Em 2014 estimou-se que 280 toneladas de produtos utilizam astaxantina, no qual são avaliados em US\$ 447 milhões. Em 2020 deve-se alcançar 670 toneladas avaliadas em US\$ 1,1 bilhão, sendo que o preço de venda é estimado entre US\$ 2.000 - 2.500.kg⁻¹, e o custo de produção é cerca de US\$ 1.000.kg⁻¹ (RESEARCH AND MARKETS, 2015). A *Haematococcus pluvialis* tem sido cultivada em grande escala por várias empresas, como BioReal (Suécia), Algatechnologies (Israel), Cyanotech, Mera Pharmaceuticals e Fuji Health Science (Havai). O valor total de mercado da luteína foi de aproximadamente US\$ 250 milhões no ano de 2010 (BOROWITZKA, 2013) e projeta-se que atinja aproximadamente US\$ 360 milhões em 2022 (LUTEIN MARKET, 2018).

No entanto, o β -caroteno e a astaxantina produzidos por microalgas representam uma parte importante da produção natural desses carotenóides. O β -caroteno foi o primeiro produto de alto valor comercial produzido a partir de uma microalga (BOROWITZKA, 2013). A *Dunaliella salina* é uma microalga com grande potencial de produção em escala industrial, devido ao fato de ser cultivada em meio altamente salino (BEN-AMOTZ et al., 1991), dificultando o crescimento de microrganismos fotossintetizantes contaminantes. De fato, foram isoladas cepas de *D. salina* de lagoas costeiras com salinidades entre 14% e 30% (NARVÁEZ-ZAPATA et al., 2011). Essa microalga foi a primeira a ser comercializada como fonte de um produto de alto valor agregado, β -caroteno, com aproximadamente US\$ 300 – 1.500.kg⁻¹ dependendo da formulação (BOROWITZKA, 2013). A Cognis Nutrition and Health, antigamente conhecidas como Western Biotechnology e Betateno, localizadas na Austrália (DUFOSSÉ et al., 2005), foram as primeiras empresas a iniciar, em 1986.

2.5 Cultura axênica

O estabelecimento de uma cultura axênica é um processo de eliminação de organismos indesejáveis (contaminantes) para obter uma cultura viável do organismo desejado (VU et al., 2018). A *Chlorella* foi a primeira microalga cultivada extensivamente em cultura axênica (GHASEMI et al., 2011).

As monoculturas axênicas são predominantemente usadas nas biomanufaturas, devido à facilidade de monitoramento e cumprimento de rigorosas normas de segurança. No entanto, há um maior risco inerente de contaminação no cultivo (PADMAPERUMA et al., 2018). Em um estudo, foi observado que, após o tratamento com antibióticos, obteve-se a *Dunaliella salina* livre de bactérias, mas foi observada uma maior ocorrência de contaminantes fúngicos (TONCHEVA-PANOVA; IVANOVA 1997).

As relações entre bactérias e microalgas são extremamente complexas. Pesquisas preliminares sobre as condições axênicas são o primeiro passo para revelar essa relação sob condições simples e controladas (VU et al., 2018). Ao optar por co-culturas controladas e simbióticas, os rendimentos de biomassa e

bioprodutos de alto valor agregado pode ser melhorado (PADMAPERUMA et al., 2018). O crescimento de microalgas em extrema salinidade evita a competição e a contaminação com outros organismos menos halotolerantes (TONCHEVA-PANOVA, 1997; LAKANIEMI et al., 2012).

Na natureza, o crescimento de algas está sempre associado ao crescimento de outros microrganismos (cultura não axênica ou xênica), principalmente bactérias. A esterilização dos meios de cultura e sistemas de cultivo axênicos na produção de biomassa microalgal em larga escala não são economicamente viáveis. Assim, a caracterização de heterotróficos associados em sistemas de cultura de algas é um passo importante, visto que as bactérias podem utilizar compostos excretados pelas algas, aumentar a solubilidade de nutrientes e oligoelementos, tornando-os mais biodisponíveis para as microalgas, além de ajudar a reduzir a saturação de O₂ dissolvido (LAKANIEMI et al., 2012).

2.6 Interação microalga-bactéria

Em 1958, o pesquisador Provasoli começou a sugerir que as bactérias podem melhorar o crescimento de algas (DELUCCA; MCCRACKEN, 1976). Sabe-se que comunidades bacterianas vivem em conjunto com microalgas e podem influenciar seu metabolismo em sistemas chamados de consórcios (SCHWENK; NOHYNEK; RISCHER, 2014). Na natureza, as interações entre bactérias e microalgas desempenham um papel essencial na manutenção da integridade do ecossistema aquático por meio de redes de interação que incluem mutualismo e competição. No fitoplâncton coexistem entre 10 e 100 diferentes espécies bacterianas, resultando em uma complexa rede de interações cruzadas (AMIN; PARKER; ARMBRUST, 2012; KOUZUMA; WATANABE, 2015).

O conhecimento permite o controle dos mecanismos que sustentam as interações mutualísticas (Figura 11) entre microalgas e bactérias, podendo facilitar o desenvolvimento de bioprocessos para microalgas com aumento da biomassa formada e produção de valiosos biocompostos, incluindo lipídios, carboidratos e carotenoides (KOUZUMA; WATANABE, 2015).

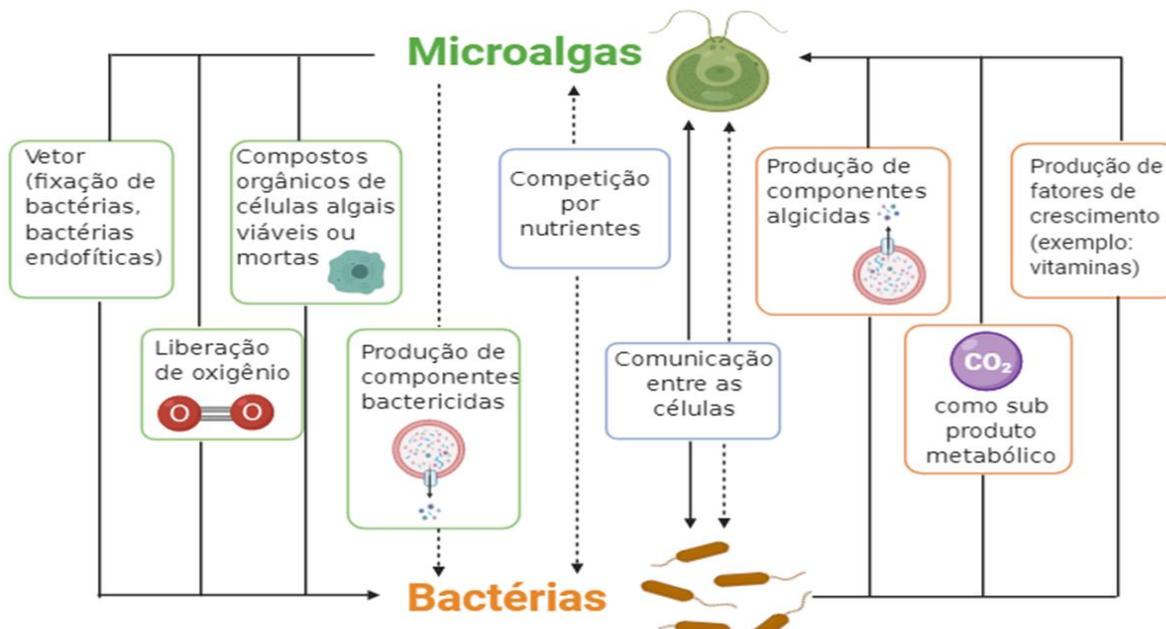


Figura 11. Esquema das principais interações que podem ocorrer entre microalgas e bactérias. Seta normal: interação positiva; seta tracejada: interação negativa (Fonte: Adaptado de NATRAH et al., 2013).

Sabe-se que as alterações fisiológicas mediadas por bactérias, incluem o aumento do crescimento de microalgas, floculação e a mudança do conteúdo lipídico (KOUZUMA; WATANABE, 2015).

2.6.1 Relação oxigênio e dióxido de carbono

Os consórcios de microalgas e bactérias podem ser eficientes na desintoxicação de poluentes orgânicos e inorgânicos e na remoção de nutrientes das águas residuais, em comparação com a atividade destes microrganismos individualmente. A fotossíntese de cianobactérias e algas eucarióticas fornece oxigênio, fator essencial para as bactérias heterotróficas que degradam poluentes. Por sua vez, as bactérias sustentam o crescimento fotoautotrófico dos parceiros, fornecendo dióxido de carbono e outros fatores estimuladores (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2011), além de diminuir a tensão de oxigênio da cultura (MUJTABA; LEE, 2016).

2.6.2 Efeito inibidor em microalgas produzido por bactérias

As microalgas podem ter um efeito prejudicial sobre a atividade bacteriana ao aumentar o pH, ou elevar a concentração de oxigênio dissolvido, podendo também excretar metabólitos inibitórios. As bactérias também podem inibir as microalgas através da produção de metabólitos extracelulares algicidas (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006). Esse efeito inibidor é útil para controlar a proliferação de algas nocivas em corpos d'água (MUJTABA; LEE, 2016).

Neste sentido, foi visto que *Pseudomonas* sp. inibe o crescimento de *C. vulgaris* na condição de cultivo foto-heterotrófico. As bactérias produzem algicidas quando recebem sinais de algas indicando senescência celular (GUO; TONG, 2014). Algumas bactérias podem causar a lise das células algais. Por exemplo, a bactéria *Kordia algicida* libera protease (sendo uma proteína algicida) que inibe o crescimento de várias espécies marinhas diatomáceas (PAUL; POHNERT, 2011; GUO; TONG, 2014). As bactérias podem competir com as algas por nutrientes limitantes, como nitrogênio e fósforo, quando elas crescem juntas em presença de fonte de carbono orgânica. Devido ao maior crescimento de bactérias nesta condição, sua proliferação consumiria mais nutrientes, resultando na limitação do crescimento de algas devido a carência de nutrientes (GUO; TONG, 2014). Quando a *Acinetobacter* sp. foi inoculada na fase exponencial, observou-se uma queda considerável do crescimento de *B. braunii* (RIVAS et al., 2010).

2.6.3 Bactérias que promovem o crescimento de microalgas

Os gêneros *Dunaliella* e *Scenedesmus* frequentemente exibem altas velocidades de crescimento nas interações algas-bactérias, resultando em maior quantidade de compostos intracelulares de interesse (BAGGESEN, 2014). É conhecido que as bactérias podem modificar o crescimento de microalgas, acumulando biomassa e aumentando a produtividade da cultura, que são de interesse particular para a produção industrial (LE CHEVANTON et al., 2013).

As bactérias dos gêneros *Alteromonas* e *Muricauda* permitiram o maior acúmulo de biomassa de *Dunaliella*, pelo aumento na disponibilidade de nitrogênio para microalgas pelas bactérias. Porém, mais pesquisas são necessárias para uma avaliação precisa dos mecanismos subjacentes dessas interações (LE CHEVANTON et al., 2013).

Experimentos de processos contínuos mostraram que a bactéria *Brevundimonas diminuta* favoreceu o crescimento e a remoção de nutrientes dos meios da microalga *Chlorella prototecoides*. Essa vantagem positiva da adição de *B. diminuta* também foi verificada em águas residuais não esterilizadas. As curvas de crescimento em cultivos descontínuos mostraram que a intensidade luminosa também desempenhou um papel nas interações na qual sob luz fraca a presença de bactérias na cultura resultou em um suprimento maior de CO₂. O que preveniu a capacidade das microalgas de utilizar o carbono orgânico. A adição de *B. diminuta* foi capaz de proporcionar maiores velocidades de crescimento de *C. protothecoides*, com remoção de nutrientes de maneira mais eficiente (SFORZA et al., 2018).

Uma promoção significativa no crescimento de microalgas foi relatada devido ao fato da bactéria produzir um fitohormônio chamado ácido indol-3-acético (IAA), substância também observada no crescimento de plantas associadas a bactérias (MUJTABA; LEE, 2016). A bactéria *Achromobacter* sp. produz o ácido acético-3-indol (IAA), o que promoveu o crescimento da *Haematococcus pluvialis*, com o aumento da quantidade de clorofila e da concentração celular produzida (LEE et al., 2019). A população bacteriana em baixas concentrações pode melhorar o metabolismo da microalga, liberando fatores que promovem o crescimento ou reduzem a concentração de O₂ no meio. Por exemplo, a presença de *Azospirillum brasilense* também aumenta a remoção de amônio e fósforo por *C. vulgaris* (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006). O triptofano e tiamina liberada por *C. sorokiniana* são moléculas de sinalização que podem ser usadas pelo *A. brasilense* para sintetizar outra molécula sinalizadora, IAA, que, quando liberada, facilita o crescimento de microalgas. Ocorrência de compostos de sinalização, como triptofano e tiamina nos exsudatos de *C. sorokiniana*,

permite suporte à interação mutualística de *C. sorokiniana* com *A. brasilense* (PALACIOS et al., 2016).

Em um estudo onde cultivou-se *C. vulgaris* com o *Bacillus pumilus*, verificou-se que houve a promoção do crescimento da microalga, onde a bactéria fixa nitrogênio da atmosfera para ela (MUJTABA; LEE, 2016). A interação positiva entre *Rhizobium* sp. e *B. braunii* indicam o possível uso dessas bactérias como inóculo para culturas de biomassa desta microalga, onde é impossível manter condições axênicas. Uma extrapolação do efeito do *Rhizobium* na cultura em larga escala a 20 °C significa que a biomassa disponível para biocombustível pode ser aumentada em aproximadamente 50% (RIVAS et al., 2010).

A *Chlorella vulgaris* também foi cultivada com quatro cepas bacterianas promotoras de crescimento: *Flavobacterium*, *Hypomonas*, *Rhizobium* e *Sphingomonas* por 24 dias, obtendo-se melhor crescimento da microalga em co-cultura (3,31 g.L⁻¹) em comparação ao controle (1,3 g.L⁻¹) (LUTZU; DUNFORD, 2018).

2.6.4 Modificação do conteúdo lipídico intracelular de microalgas em co-cultura

Além do maior crescimento celular de *C. vulgaris* em cultivo em co-cultura com bactérias, o seu conteúdo lipídico aumentou de 22% para 28%, com conteúdo de triacilgliceróis (TGA) correspondente a 20%. Ácidos ésteres metílicos (FAME) da biomassa obtidos da co-cultura de bactérias e algas mostraram aumento significativo para ácidos oleico (C18:1) e palmítico (C16:0) da composição FAME obtidos durante o cultivo axênico de *C. vulgaris*; os ácidos hexadecatrienóico (C16:2) e linoleico (C18:2) foram predominantes (LUTZU; DUNFORD, 2018).

A associação de *Rhizobium* sp. KB10 e *Botryococcus braunii* aumentou o crescimento das algas em nove vezes e melhorou o conteúdo de C18 (oleato), a qual é utilizada para a produção de biodiesel. Uma abordagem cooperativa usando uma cultura bacteriana mista (lodo ativado) e microalgas, *Chlorella*

protothecoides (UTEX-1806) e *Ettlia* sp. YC001 foi investigado. Este sistema algal-bacteriano resultou em maior produtividade lipídica sob condições foto-heterotróficas em comparação com condições fotoautotróficas, com aumento de 28,7 e 17,3 %, respectivamente. Este sistema foi avaliado como tendo bom desempenho no tratamento e degradação do tiocianato. O co-cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* com *C. reinhardtii* aumentou o crescimento de microalgas em 3,9 vezes, com teores lipídicos 26% mais altos, com maior atividade da fe-hidrogenase e maior produção de H₂. A inoculação da cepa *Rhizobium* 10II de bactéria na microalga *Ankistrodesmus* sp. cepa SP2-15 levou a 30% do aumento de clorofila na biomassa e a produtividade lipídica foi até 112 g.m⁻³ d⁻¹ no sexto dia de cultivo (SARA; BRAR; BLAIS, 2016)

2.6.5 Atividade floculante por bactéria

A atividade do biofloculante depende da fase de crescimento das bactérias, devido ao fato das atividades enzimáticas relacionadas à formação de biofloculantes serem observadas durante a fase estacionária de crescimento. O que na formação e na atividade do biofloculante, e, embora a produção de biofloculante bacteriano seja benéfico para melhorar a formação de grandes flocos de microalgas e bactérias, o custo adicional envolvido no requisito de fonte de carbono para o crescimento dessas bactérias ainda permanece como desafio (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2013).

Os exopolissacarídeos e os ácidos urônico e pirúvico são responsáveis pela adesão celular. Além disso, fatores como a fonte de carbono e nitrogênio e a razão entre dois elementos afetam a produção de biofloculantes. O biofloculante produzido por a bactéria *Paenibacillus polymyxa* apresentou alta eficiência para a floculação de *Scenedesmus* sp. e *C. vulgaris* (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2013).

Bactérias como *Flavobacterium*, *Terrimonas* e *Sphingobacterium* e suas substâncias poliméricas extracelulares têm um papel no aumento da atividade

floculante de algas como a *C. vulgaris*, resultando em flocos sedimentáveis (MUJTABA; LEE, 2016).

2.6.6 Fornecimento de nutrientes

Outro papel das comunidades bacterianas é fornecer às microalgas micronutrientes inorgânicos que, caso contrário, não estariam disponíveis no meio (LUTZU; DUNFORD, 2018). As microalgas podem aumentar a atividade bacteriana ao liberar as substâncias extracelulares como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que servem como substrato para o crescimento bacteriano. Microalgas mortas podem fornecer nutrientes para o crescimento de células bacterianas (MUJTABA; LEE, 2016). Croft et al. (2005) mostraram que o papel da vitamina B12 no metabolismo das algas é o principal cofator para a metionina sintase, que é dependente da vitamina B12, e que a auxotrofia da cobalamina surgiu inúmeras vezes ao longo da evolução, provavelmente devido à perda da forma independente da enzima da vitamina B12. Uma exemplificação desta importante simbiose é o caso de bactérias do gênero *Halomonas*, que fornecem cobalamina para microalga *Amphidinium operculatum* (MUJTABA; LEE, 2016).

O crescimento de *Escherichia coli* melhorou devido à liberação de compostos por *Chlorella sp.* (MUJTABA; LEE, 2016). Enquanto a *E. coli* libera fatores que promovem o crescimento e reduzem a concentração de O₂ no meio, aumenta a remoção de amônio e fósforo por *C. vulgaris* (HEO et al., 2019).

Um estudo demonstrou que a antimicina A (AA), um inibidor respiratório produzido por *Streptomyces*, atuou como um mediador de Fe (III) na alga halotolerante *D. salina*. Isto mostra que a AA forma complexos lipossolúveis com Fe (III) que são absorvidos e utilizados pelas algas. Várias espécies de fitoplâncton podem utilizar sideróforos bacterianos como fonte de Fe e pelo menos uma espécie de *Dunaliella*, a *D. bardawil* utiliza fatores bacterianos para melhorar a aquisição de ferro. Entretanto, é improvável que *D. salina* utilize AA como mediador de Fe (III) em seu *habitat* natural, porque as espécies de *Streptomyces* não são comuns em ambientes hipersalinos característicos da *D.*

salina. A interpretação mais provável dos resultados é que a AA funciona como um mediador artificial de Fe (III) formando Fe (III) -AA, que é um complexo lipossolúvel e estável, que penetra através da membrana celular, e pode ser utilizado diretamente pelas células, aumentando a biodisponibilidade de Fe (III). Captações semelhantes têm sido demonstradas para utilização de complexos orgânicos lipofílicos dos íons Cu e Ni por organismos aquáticos (PICK, 2004).

Na relação de mutualismo entre a *Scripsiella trochoidea* e proteobactérias *Roseobacter* e *Marinobacter*, esta microalga usa sideróforo proteobacteriano vibrioferrina, que pode se ligar ao Fe (III), tornando-o disponível para processos fotossintéticos que fixam carbono inorgânico (LUTZU; DUNFORD, 2018).

A *Pseudomonas* sp. produziu uma glicoproteína que atuou como fator de crescimento para *A. glacialis* (FUKAMI; NISHIJIMA; ISHIDA, 1997).

2.6.7 Co-imobilização de microalgas por bactérias

As microalgas fazem parte dos organismos fixados em filtros percoladores de estações de tratamento de águas residuais. Utilizam-se técnicas para imobilizar biocatalisadores em geral, como enzimas a células inteiras. As algas imobilizadas são usadas para obter biomassa e remover macronutrientes, pois a produção de oxigênio pelas algas melhora a degradação aeróbica dessas substâncias. Bactérias e algas podem produzir substâncias defensivas contra o outro organismo co-imobilizado. O aumento dos valores de pH devido à fotossíntese e o aumento de oxigênio podem reduzir o crescimento bacteriano quando co-imobilizado com algas. Por outro lado, o consumo de CO₂ e a produção de exopolissacarídeos por algas pode aumentar a velocidade de crescimento bacteriano, bem como o CO₂ e produção de substâncias promotoras de crescimento por bactérias pode melhorar o crescimento de microalgas (MORENO-GARRIDO, 2008).

Quando a fonte de nitrogênio foi alterada de amônio a nitrato, a *C. vulgaris* co-imobilizada com *Azospirillum brasilense* Cd, não cresceu mais que *C. vulgaris* axênica, mas a captação de nitrato por célula aumentou. A concentração inicial de

amônio no crescimento afeta a sua captação por *C. vulgaris* células imobilizadas sozinhas, mas não quando *C. vulgaris* é co-imobilizada com *A. brasilense*. A captação de nitrogênio depende mais do número de células de *Chlorella* do que da quantidade inicial de nitrogênio (DE-BASHAN; ANTOUN; BASHAN, 2008). Por outro lado, em condições heterotróficas, a co-imobilização de *A. brasilense* com *Chlorella* spp. promoveu o acúmulo de amido em *Chlorella* spp. Isso pode acontecer porque a bactéria altera as vias metabólicas de *Chlorella* spp., induzindo ao acúmulo de carboidratos (MAGDOULI; BRAR. BLAIS, 2016).

2.7 Aplicações biotecnológicas

O cenário atual tem mostrado amplo interesse nas pesquisas biotecnológicas e as microalgas apresentam uma vasta diversidade de aplicação, sendo sua biomassa utilizada como obtenção de fármacos, produção de biocombustíveis, biofertilizantes agrícolas, tratamento de águas residuais (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2015), rações, alimentos, nutracêuticos e cosméticos (NOVOVESKÁ *et al.*, 2019).

Consórcios microalgais-bacterianos baseados em processos são reconhecidos como uma tecnologia renovável e sustentável, em conformidade com as atuais diretrizes econômicas e de baixo carbono para a proteção ambiental e recuperação de recursos. Espera-se que as tecnologias baseadas em consórcios sejam competitivas para a atual indústria de microalgas. No entanto, exige-se mais pesquisas com uma análise aprofundada dos mecanismos de interação microalgal-bacteriana, bem como experimentos em larga escala para aplicações biotecnológicas em condições comerciais (ZHANG *et al.*, 2020).

2.7.1 Extratos antibacterianos de microalgas

A atividade antioxidante do extrato de células de *D. salina*, pode inibir o crescimento de bactérias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* e

Escherichia coli. Em meio líquido, o crescimento dessas bactérias foi retardado em 20 e 63%, respectivamente. Ao mesmo tempo, este extrato não afetou o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus sp.*, o que demonstra uma ação muito específica do extrato celular (NEMTSEVA et al., 2013).

A clorelina é um antibiótico extraído da *Chlorella* (GHASEMI et al., 2011). Verificou-se que a mistura de ácidos graxos exibia atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os extratos etanólicos de *C. vulgaris* mostraram atividade antibacteriana contra *Salmonella typhi*, uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete; agente causador de febre entérica, sepse e diarreia infecciosa em seres humanos. E também foi eficaz contra *B. subtilis*. Verificou-se que a propriedade antimicrobiana de *C. vulgaris* controla as três bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e duas bactérias Gram-negativas foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 e *Escherichia coli* (DINESHKUMAR et al., 2017).

2.7.2 Suplementos alimentares e ração animal

Em contraste com a atividade antibacteriana, verificou-se um efeito positivo da *Spirulina* em bactérias do intestino, aumentando a velocidade de crescimento de lactobacilos, apoiando assim a função do trato digestivo, sendo utilizado como prebiótico (PULZ; GROSS, 2004; GANTAR; SVIRČEV, 2008). Há registros de que há o consumo de *Spirulina maxima* por humanos desde 1521, em Tenochtitlan, na cidade do México (BARKA; BLECKER, 2016).

As microalgas verdes *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* e a cianobactéria *Spirulina maxima* são biotecnologicamente relevantes, pois são amplamente comercializadas e utilizadas, como suplementos nutricionais para humanos e como aditivos para ração animal (GANTAR; SVIRČEV, 2008). As microalgas são quantitativa e qualitativamente boas fontes de proteínas (BARKA; BLECKER, 2016). Análises abrangentes e estudos

nutricionais demonstraram que as proteínas provenientes de alga são de alta qualidade e comparáveis às proteínas vegetais convencionais (GHASEMI et al., 2011).

Em relação aos extratos proteicos de *H. pluvialis* há pouca informação sobre suas propriedades. Porém têm atraído interesse no qual verificou-se a capacidade de manter algumas propriedades especialmente para aumentar a solubilidade em uma ampla gama de condições de valores de pH. Eles também exibiram propriedades emulsificantes promissoras, tendo um papel importante em algumas formulações alimentares ou cosméticas (BA et al., 2016).

A *Chlorella vulgaris* é uma rica fonte de proteínas (GHASEMI et al., 2011). O perfil se compara favoravelmente e até melhor com o perfil padrão para nutrição humana proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização de Alimentação e Agricultura (FAO) porque as células de *C. vulgaris* sintetizam aminoácidos essenciais e não essenciais. Além disso, independentemente do processo de extração, as proteínas dessa microalga apresentaram excelente capacidade emulsificante, comparadas a ingredientes comerciais. A capacidade emulsificante das proteínas de *C. vulgaris* extraídas em valor de pH 7 atingiu 3090 ± 50 mL de óleo.g⁻¹ de proteínas, com uma estabilidade de $79 \pm 1\%$. Portanto, as proteínas de *C. vulgaris* propiciam a valorização adicional no mercado, principalmente nos setores de alimentos (SAFI et al., 2014a).

Métodos padronizados *in vitro* foram utilizados para determinar características de valor nutricional e sua composição nutritiva (WILD et al., 2019). Contém vitaminas do Complexo B e ácido ascórbico, minerais (potássio, sódio, magnésio, ferro e cálcio), carotenoides, clorofila, fator de crescimento de *Chlorella* e outras substâncias (GHASEMI et al., 2011) Ela foi aprovada para a aplicação como alimento na União Européia (CANELLI et al., 2020)

JU et al. (2012) demonstraram que as microalgas desengorduradas pode ser usadas como aditivo alimentar na composição de ração (3% na dieta), podendo substituir 50% da proteína de farinha de peixe para estimular o crescimento de camarões. Essa substituição não ocasionou déficits no crescimento nesses crustáceos, e nem na sua composição nutricional. Além

disso, também há a melhora na qualidade do camarão, devido ao acúmulo de astaxantina, o que é benéfico para a saúde animal e humana.

Estudos mostram que frangos alimentados com microalga *Porphyridium* sp., tiveram aumento de 10% da biomassa e a redução de 28% do colesterol sérico, enquanto a gema de ovo reduziu os níveis de colesterol em 10% e aumentou os níveis de ácido linoleico e ácido araquidônico em 29% e 24%, respectivamente. Além disso, a cor da gema do ovo ficou mais escura como resultado dos níveis mais altos de carotenoides (2,4 vezes mais com frango alimentado com 5% de suplemento) (GINZBERG et al., 2000). Segundo Becker (2007), a incorporação de algas nas rações de aves oferece uma perspectiva promissora; estima-se que cerca de 30% da atual produção mundial de algas seja vendida para aplicação em ração animal.

2.7.3 Cosméticos

A crescente necessidade de obter produtos seguros por bioprocessos tornou as algas um recurso sustentável para novos produtos. São conhecidos vários metabólitos secundários derivados de algas que trazem benefícios à pele. As algas são naturalmente expostas ao estresse oxidativo e desenvolvem vários sistemas de proteção eficientes contra espécies reativas de oxigênio e radicais, produzindo compostos que podem atuar em cosméticos contra os efeitos nocivos da radiação UV, promovendo ação semelhante de agentes orgânicos e filtros inorgânicos atualmente utilizados no mercado. Há um aumento na produção de clorofila e carotenoides de *C. vulgaris*, *Nostoc* e *Spirulina platensis* quando cultivadas na presença de radiação. Esses compostos podem ajudar a proteger contra o processo oxidativo do óleo em formulações, principalmente em emulsões contendo grande quantidade de fase oleosa, pois possuem propriedades antioxidantes (ARIEDE et al., 2017).

2.7.4 Medicamentos

Existem muitos relatos da atividade farmacológica de *Chlorella* spp. como efeitos hipoglicêmicos por estreptozocina, prevenção na dislipidemia, atividade imuno-antitumoral, redução da pressão arterial, prevenção de úlcera induzida pelo estresse, ação radioprotetora, inibição da interleucina, e efeitos estimulantes na produção de citocinas (GHASEMI et al., 2011).

Pesquisas sobre o potencial antienvhecimento de antioxidantes de origem natural ganharam atenção especial porque ocorre menos efeitos colaterais, e são mais seguros do que os sintetizados quimicamente. A microalga *H. pluvialis* há muito tempo foi destacada por sua forte atividade antioxidante, que esta relacionada com a alta concentração de astaxantina no interior da célula. Foi verificado que a suplementação de moscas mutantes (moscas de frutas) com *H. pluvialis* prolongou a vida útil das moscas, protegendo contra o estresse oxidativo. Por outro lado, uma ingestão prolongada levou à morte precoce, que podem resultar da inativação do sistema endógeno de defesa antioxidante e capacidade reduzida de tolerância ao estresse. Esses resultados sugeriram fortemente o potencial preventivo da *H. pluvialis* contra doenças relacionadas ao envelhecimento, como a doença de Alzheimer (HUANGFU et al., 2013)

As propriedades benéficas dos carotenos na saúde humana são bem conhecidas. Estudos realizados mostram que extratos feitos de *D. salina* apresentaram atividade anti-inflamatória, antiproliferativa e citotóxica contra certos tipos de câncer (SINGH et al., 2016; LOPEZ; MAGDALENO; STEPHANO, 2017), como nas linhagens celulares de câncer de mama, que foram significativamente mais altas em algumas condições de estresse (SINGH et al., 2016), propriedades estas atribuídas ao elevado conteúdo de carotenos (SINGH et al., 2016; LOPEZ; MAGDALENO; STEPHANO, 2017), ou pode estar envolvido com alguns outros compostos bioativos (SINGH et al., 2016). Atasever-Arslan et al. (2015) mostraram que *D. salina* possuía potencial anticâncer para células malignas de neuroblastoma. Estudos *in vivo* devem ser considerados para explicar os mecanismos de citotoxicidade e os efeitos antitumorais do extrato de *D. salina*.

A compreensão das interações entre algas e bactérias possibilitará a exploração de tecnologias baseadas em microalgas (RAMANAN *et al.* 2016). Mediante o exposto, a identificação de microrganismos e a avaliação da influência destes em conjunto com as microalgas podem contribuir para melhorar a compreensão destas relações. E assim, identificar consórcios eficientes que favoreça a obtenção de biomassa.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a interação entre microrganismos fotossintetizantes e bactérias heterotróficas para desenvolvimento e produção de extratos bacterianos e microalgais para aplicação em processos visando ao cultivo desses microrganismos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar as bactérias a partir do meio residual do cultivo de *D. salina*, *H. pluvialis* e *A. platensis*, além da determinação dos parâmetros cinéticos;
- verificar o crescimento de co-culturas de *D. salina* a partir das associações com as bactérias isoladas;
- verificar a utilização do extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 como promotor de crescimento de *D. salina*, *H. pluvialis*, *C. vulgaris* e *A. platensis*;
- verificar a utilização do extrato de *C. vulgaris* como fonte de nitrogênio para o crescimento de *B. atrophaeus* ATCC 9372.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse presente trabalho consideram-se como microrganismos fotossintetizantes as microalgas eucarióticas (*Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris*) e as cianobactérias (*Arthrospira platensis*) que são microrganismos procatióticos. Neste trabalho foi avaliada a interação desses microrganismos com bactérias heterotróficas visando prever comportamentos em processos industriais, bem como o uso dos extratos desses organismos em seus cultivos. O fluxograma (Figura 12) ilustra as atividades realizadas neste trabalho, sendo que o detalhamento das técnicas e processos utilizados é apresentado a seguir.

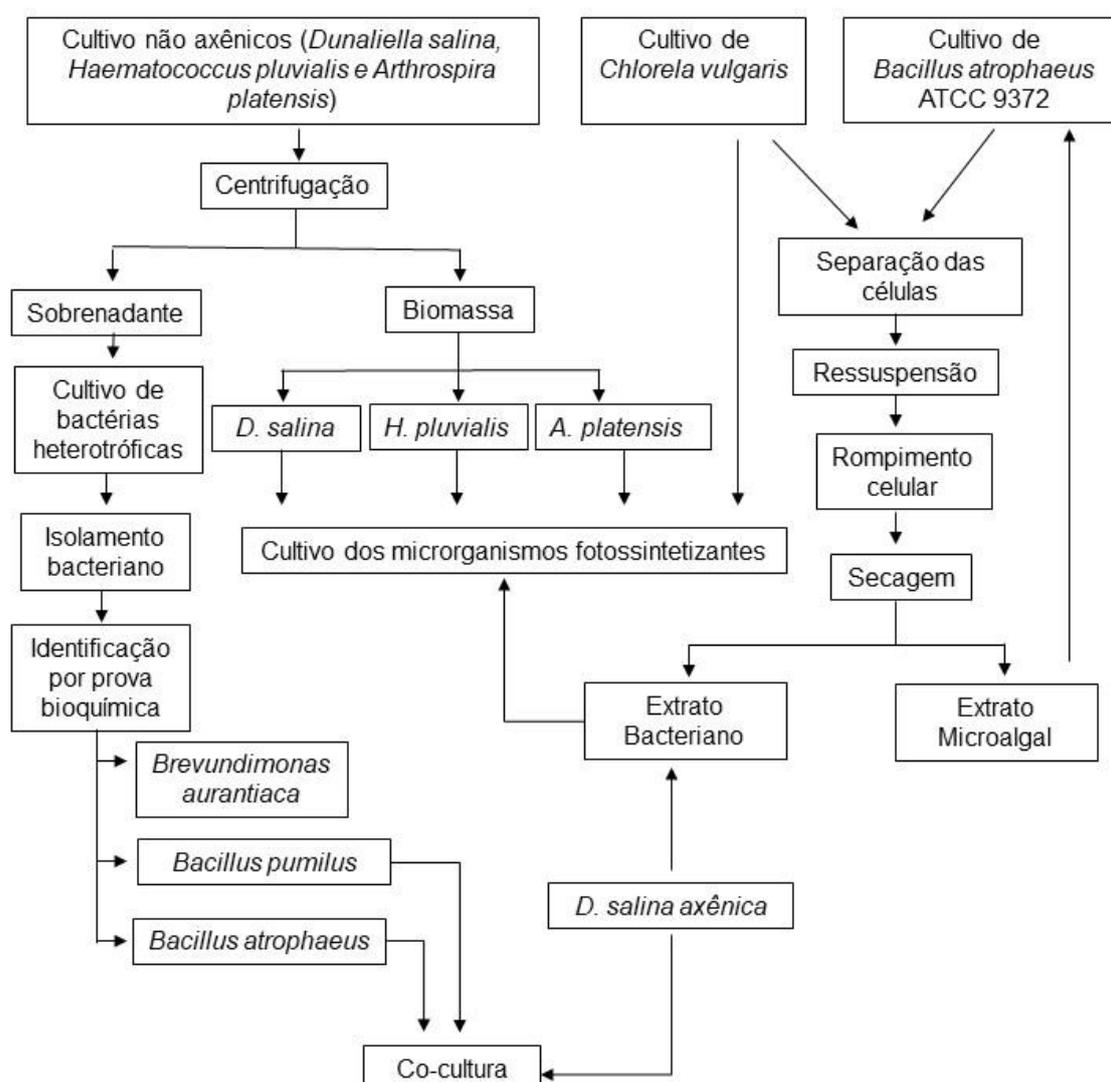


Figura 12. Técnicas e processos utilizados no desenvolvimento experimental

4.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas as cepas de *Dunaliella salina* CCAP 19/18 não axênica e axênica, da Coleção de Cultura de Algas e Protozoários (Escócia). Para a manutenção das cepas, parte das células foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10mL de meio sólido Guillard “f/2” (item 4.2), com incubação à temperatura de 25 (\pm 1) °C.

A cepa de *Haematococcus pluvialis* CCAP 34/7 não axênica, da Coleção de Cultura de Algas e Protozoários e a *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 não axênica, da Coleção de Cultura da Universidade do Texas, foram mantidas em meio Bold (item 4.2) com adição de 2% de ágar em tubo de ensaio inclinado.

A cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* UTEX 1926 não axênica, da coleção de cultura da Universidade do Texas, foi mantida em ágar inclinado com adição de 2% de ágar no meio líquido padrão Schlösser (item 4.2).

A cepa de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, mantida pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da FCF/USP, foi utilizada para preparar suspensão matriz de esporos (VESSONI PENNA et al., 2002). A partir de uma suspensão homogeneizada por 20 min em agitador magnético (752, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), alíquota de 5mL foi tratada em banho de água à 80 °C por 10 min, seguida de resfriamento em gelo e água. Utilizando o resultante do conteúdo deste tubo, inoculou-se uma garrafa de Roux em superfície contendo 200mL de *Plate Count Agar* (PCA) solidificado, a qual foi incubada a 37 °C por 6 dias (Modelo 347F, Fanem, São Paulo, SP, Brasil), as células foram removidas com o auxílio de pérolas de vidro e 80mL de solução de acetato de cálcio 0,02 M.

A suspensão foi então filtrada com o auxílio de uma gaze e acondicionada em frasco estéril com barra magnética e pérola de vidro. Utilizou-se uma solução de hidróxido de cálcio saturada 0,14% (m/v) para ajustar o valor de pH da suspensão para 9,7. As soluções de acetato de cálcio e hidróxido de cálcio foram preparadas conforme o APÊNDICE A.

4.2 Meios de cultivo dos microrganismos

Foi utilizado o meio Guillard “f/2” para o cultivo da *Dunaliella salina*, sendo este o meio mais utilizado para o crescimento de microrganismos marinhos (GUILLARD, 1975; DERNER, 2006).

Considerando 1 litro de água deionizada para o preparo das soluções estoque, a composição do meio Guillard “f/2” é descrita abaixo:

Solução Estoque 1: Elementos traços

Na ₂ EDTA	4,1600 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,1500 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0100 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0220 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0100 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1800 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0060 g

Solução Estoque 2: Mix de vitamina

Cianocobalamina (Vitamina B12)	0,0005 g
Tiamina (Vitamina B1)	0,1000 g
Biotina	0,0005 g

Solução Estoque 3

NaNO ₃	75,0000 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	5,6500 g

Para o preparo do meio “f/2”, adiciona-se 1mL de cada solução estoque através de um filtro (*Millipore*[®]) de 0,22 µm em água do mar previamente autoclavada em quantidade suficiente para preparo de 1 litro de meio, obtendo-se ao final meio estéril com pH 8,0 (± 0,5).

Para o cultivo de *H. pluvialis* e *C. vulgaris* foi utilizado o meio Bold. Para o preparo de 1 L de meio foram adicionadas as seguintes soluções estoque descritas abaixo, completando o volume com água deionizada, sendo o meio esterilizado (BOLD, 1949; BISCHOFT; BOLD, 1963). O mix de vitaminas foi

adicionado assepticamente através de filtro (*Millipore*[®]) de 0,22 μm , obtendo-se ao final pH 6,5 ($\pm 0,5$).

Solução estoque	Volume
NaNO_3 (25g.L ⁻¹)	10mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g.L ⁻¹)	10mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,5 g.L ⁻¹)	10mL
K_2HPO_4 (7,5 g.L ⁻¹)	10mL
KH_2PO_4 (17,5 g.L ⁻¹)	10mL
NaCl (2,5 g.L ⁻¹)	10mL
Solução PIV*	6mL
Mix de vitaminas**	1mL

*PIV – solução de metais em 1L de água destilada

Na_2EDTA	750mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	97mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	41mg
ZnCl_2	5mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4mg

** Mix de vitaminas – concentração para 200mL de água destilada

Cianocobalamina (B12)	0,027g
Biotina (B8)	0,005g
Tiamina (B1)	0,220g

O meio Schlösser foi utilizado para o cultivo de *Arthrospira platensis* (SCHLÖSSER, 1982). Para 1L de meio de cultura, prepararam-se separadamente duas soluções, no qual se usou 500mL de água deionizada para cada solução, e pesou-se os sais nas proporções indicadas abaixo:

Solução A

NaHCO ₃	13,61g
Na ₂ CO ₃	4,03g
K ₂ HPO ₄	0,50g

Solução B

NaNO ₃	2,50g
K ₂ SO ₄	1,00g
NaCl	1,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,04g
PIV*	6mL
CHU**	1mL
Vitamina B12 (15µg/100mL)	1mL

*PIV – solução de metais

A solução foi preparada nas mesmas proporções do meio Bold, como descrita anteriormente.

**CHU – solução de micronutrientes e 1L de água destilada

Na ₂ EDTA	50,0mg
H ₃ BO ₃	618,0mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	19,6mg

ZnSO ₄ .7H ₂ O	44,0mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	20,0mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	12,6mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,6mg

E a vitamina B12 foi adicionada assepticamente através de filtro (*Millipore*[®]) de 0,22 µm, após a esterilização das soluções. Por fim, essas soluções foram misturadas, obtendo-se ao final pH 9,0 (± 0,5).

Para o *B. atrophaeus* ATCC 9372 e para as bactérias isoladas dos meios residuais de microrganismos fotossintetizantes foram utilizados os meios Caldo *Trypic Soy Broth* (TSB) e *Plate Count Agar* (PCA), que foram preparados de acordo com as especificações do fabricante, para o isolamento e manutenção das cepas obtidas.

4.3 Cultivo dos microrganismos fotossintetizantes para a obtenção do meio residual

Os cultivos de *D. salina* e *H. pluvialis* foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL, adicionando-se 10⁵ células.mL⁻¹ de microalgas em 200 mL de meio f/2 ou Bold, com seus respectivos microrganismos, incubando-os a 25°C a 110 rpm por até 20 dias, e intensidade luminosa de 80 (±10) µmol fótons m⁻². s⁻¹. O crescimento das microalgas foi acompanhado por contagem celular em câmara de Neubauer (3mm x 3mm x 0,1mm de profundidade), que permitiu a avaliação da integridade das células, em microscópio Olympus BX51.

O cultivo de *A. platensis* foi realizado em frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL, com concentração inicial de 400 mg.L⁻¹ de cianobactéria em 200 mL de meio Schlösser, incubando-se a 25°C a 110 rpm por até 10 dias, e com intensidade luminosa de 80 (±10) µmol fótons m⁻². s⁻¹, monitorando o crescimento por medida da absorbância até a estabilização. As células foram

centrifugadas a 4000 rpm a 8°C por 30 minutos, obtendo-se, no sobrenadante, o meio residual. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Isolamento e identificação das bactérias presentes nos meios residuais de microrganismos fotossintetizantes

O meio residual obtido no item 4.3 foi incubado a 37°C, 100 rpm por até 3 dias, medindo-se a absorbância a 600nm em espectrofotômetro (modelo 1640 UV, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) para a verificação de crescimento das bactérias.

Alíquotas de 100 µL do meio residual foram transferidas para tubo de ensaio contendo 2mL de meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) e incubados à temperatura de 37°C por até 4 dias em estufa B.O.D. (Modelo 347F, Fanem, São Paulo, SP, Brasil). Durante este período, foram realizados estriamentos em *Placa de Petri* e colônias bacterianas isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo *Plate Count Agar* (PCA) inclinado.

A partir do isolamento, realizou-se a técnica de coloração de Gram e Wirtz (APÊNDICE B), e em parceria com o Laboratório de Microbiologia da Santa Casa, foram avaliadas as características microbiológicas e bioquímicas para a identificação das bactérias isoladas.

4.5 Obtenção das suspensões de bactérias

Cada microrganismo isolado foi estriado em PCA inclinado, incubado a 37°C por 24 horas, e o cultivo ressuspenso em 10mL de solução fisiológica. O conteúdo foi transferido para garrafa de *Roux* com 200mL de PCA solidificado, autoclavado previamente a 121°C por 15 minutos, e incubado em estufa à 37°C por períodos de até 6 dias.

Para bactérias formadoras de esporos, o conteúdo da garrafa foi ressuspenso com auxílio de pérolas de vidro e 80 mL de solução de acetato de cálcio 0,02 M, com ajuste do valor de pH para 9,7 com 20mL de solução de hidróxido de cálcio 0,14% (m/v) (APÊNDICE A). Para bactérias não formadoras

de esporos, o conteúdo da garrafa foi ressuspensão com auxílio de pérolas de vidro e 100mL de solução de sulfato de magnésio heptahidratado 0,01 M (APÊNDICE C).

Para a determinação da viabilidade de células, foi realizada diluição seriada do cultivo obtido, com posterior semeadura em profundidade e incubação a 37°C por 48 horas, contabilizando as unidades formadoras de colônias.

4.6 Cultivo de bactérias isoladas

As bactérias isoladas foram inoculadas em 100 mL de TSB acondicionados em frasco Erlenmeyer de 250 mL, em concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹, vedado com gaze e incubado a 37°C, 150 rpm por 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento (μ) é definida como a razão entre a velocidade de crescimento (dX/dt) e a correspondente concentração de células (X), sendo representada pela equação (1).

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

A velocidade de crescimento máxima foi calculada na fase logarítmica de crescimento, onde Logaritmo Neperiano da concentração celular é uma função linear do tempo, sendo a inclinação da reta correspondente ao máximo valor de μ (μ_m).

4.8 Determinação do valor de pH, condutividade e osmolaridade

Para a determinação do valor de pH, utilizou-se pHmetro (Mettler Toledo M300, Greifensee, Suíça) previamente calibrado com soluções-tampão pH 7,0 e pH 10,0.

A condutividade dos meios foi determinada a 25°C em condutímetro digital (modelo AR-20, Fisher Scientific, USA) calibrado e aferido com soluções padrão (Synth, Brasil).

A osmolaridade foi determinada por osmômetro (Osmomat 030, Ottendorf-Okrilla, Alemanha), por meio do ponto de congelamento da solução, calibrado com solução de NaCl 300 Milliosmol/kg.

As análises de valor de pH, da condutividade e da osmolaridade dos meios foram realizadas em triplicata.

4.9 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Foram realizadas diluições seriadas em solução de cloreto de sódio 0,9% em que alíquotas de 1 mL, que foram transferidas para placas de Petri e em seguida foram adicionados 20 mL de PCA, sendo que as placas foram incubadas em estufas a 37°C por 48 horas, após solidificação do meio. Após as 48 horas, realizou-se a contagem considerando as placas que apresentaram até 300 UFC.mL⁻¹.

4.10 Co-cultura

Foram realizados cultivos, em triplicata, de co-culturas de *D. salina* com as bactérias isoladas do meio residual microalgal, *Bacillus pumilus* e *Bacillus atrophaeus*. A concentração inicial da microalga foi de 10⁴ ou 10⁵ células.mL⁻¹ e as concentrações das bactérias variaram de 10¹ a 10⁴ UFC.mL⁻¹, como representado na Tabela 1. Os experimentos foram feitos em triplicata.

No primeiro bloco de experimentos, foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de capacidade de 250mL, com 100 mL de meio f/2, onde inoculou-se 10⁴ células.mL⁻¹ de *D. salina* e concentração de bactérias de 10² a 10⁴ UFC.mL⁻¹, incubando-se a co-cultura a 25°C, 110 rpm por até 50 dias, com intensidade luminosa de 20 (±10) μmol fótons.m⁻².s⁻¹.

No segundo bloco de experimentos, foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de capacidade de 250mL, com 100 mL de meio f/2, em que foram

inoculadas 10^5 células.mL⁻¹ de *D. salina* e concentração de bactérias de 10^2 a 10^4 UFC.mL⁻¹, incubando-se a co-cultura a 25°C, 110 rpm por até 15 dias, com intensidade luminosa de $80 (\pm 10)$ μmol fótons.m⁻².s⁻¹.

Tabela 1. Esquema experimental indicando a concentração inicial de cada microrganismo nos cultivos de co-cultura*.

Concentração da <i>D. salina</i> (células.mL ⁻¹)	Concentração das Bactérias (UFC.mL ⁻¹)	
	<i>B. atrophaeus</i>	<i>B. pumilus</i>
10^4	-	-
10^4	10^2	-
10^4	10^4	-
10^4	-	10^2
10^4	-	10^4
10^5	-	-
10^5	10^2	-
10^5	10^4	-
10^5	-	10^2
10^5	-	10^4
10^5	10^1	10^1
10^5	10^2	10^2

*Ensaio com concentração inicial de *D. salina* de 10^4 células mL⁻¹ e 10^5 células mL⁻¹ foram conduzidos a 20 e 80 μmol fótons m⁻² s⁻¹, respectivamente.

O crescimento da co-cultura foi monitorado por contagem celular em câmara de Neubauer (3mm x 3mm x 0,1mm de profundidade), com avaliação da integridade das células (Olympus BX51) e a contagem bacteriana realizada após diluição seriada de acordo com a descrição do item 4.9.

4.11 Extrato de bactéria para o cultivo de microrganismos fotossintetizantes

4.11.1 Cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372

O *B. atrophaeus* ATCC 9372 foi cultivado em biorreator de 10L, com concentração inicial de 10^5 UFC.mL⁻¹, que foi proveniente de uma suspensão celular previamente cultivada por 24 horas em meio TSB. O cultivo foi conduzido por batelada alimentada, com solução de glicose (400 g.L⁻¹) à vazão de 60mL.h⁻¹, até a estabilização do crescimento celular, e foi aplicada aeração de 0,2 vvm. Os cultivos foram conduzidos em temperaturas de 30 °C ou 37 °C. Analisou-se o valor de pH e osmolaridade de acordo com item 4.8. A glicose foi mensurada pelo Método de Somogyi (1952) e a concentração celular por absorbância, que foi relacionada com a concentração celular em massa seca por meio de curva de calibração (APÊNDICE D). Foi utilizado propilenoglicol a 30% em etanol como antiespumante, adicionado de acordo com a necessidade.

4.11.2 Preparo do extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372

Após o cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372, a biomassa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos e lavou-se a biomassa com água deionizada para a remoção dos nutrientes do meio de cultura. Adicionou-se água deionizada e as células dessa suspensão foram rompidas com pérolas de vidro de 1mm e agitação vigorosa por 50 min. Removeram-se as pérolas e evaporou-se o conteúdo líquido em estufa de circulação forçada à 60°C, sendo que a biomassa obtida foi triturada com auxílio de um almofariz e pistilo.

4.11.3 Cultivo de microrganismos fotossintetizantes utilizando extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 como promotor de crescimento

Em triplicata, os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL com 100mL de meio de cultura, respectivo de cada microrganismo fotossintetizante, com 0,5% de extrato seco de *B. atrophaeus* ATCC 9372 (item 4.11.2) e comparado ao controle (meio f/2, Bold e Schlösser), incubando-se a 25 °C a 110 rpm por até 26 dias, e intensidades luminosas de 80 (± 10) $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. O crescimento da microalga foi acompanhado por

absorbância no caso das cepas de *C. vulgaris* e *A. platensis*, e por contagem em câmara de Neubauer (3mm x 3mm x 0,1mm de profundidade) para as cepas de *D. salina* e *H. pluvialis*, com avaliação microscópica da integridade das células (Olympus BX51).

4.12 Extrato de microrganismo fotossintetizante como fonte de proteínas para o cultivo de bactéria

4.12.1 Preparo do extrato de *Chlorella vulgaris*

O cultivo de *C. vulgaris* foi realizado em um fotobiorreator tubular com capacidade 35L a 25° C. A cultura foi movimentada por um sistema de *air lift*, o pH foi mantido em 7,5±0,5 e intensidade luminosa de 40 (±10) $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, por at\u00e9 50 dias em processo semi-cont\u00ednuo, utilizando meio Bold.

Ap\u00f3s o cultivo da microalga, a biomassa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 min e lavou-se a biomassa com \u00e1gua deionizada para a remo\u00e7\u00e3o dos sais. Adicionou-se \u00e1gua deionizada novamente, e as c\u00e9lulas dessa suspens\u00e3o foram rompidas com p\u00e9rolas de vidro de 1mm e agita\u00e7\u00e3o vigorosa por 50 min. As p\u00e9rolas foram removidas e a suspens\u00e3o foi seca em estufa de circula\u00e7\u00e3o for\u00e7ada a 60°C, e, por fim, a biomassa foi triturada com o aux\u00edlio de almofariz e pistilo.

4.12.2 Cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372 utilizando *Chlorella vulgaris* como fonte de nitrog\u00eanio org\u00e2nico

Os cultivos, em triplicata, foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL. Preparou-se 100mL de meio de cultura teste com a composi\u00e7\u00e3o semelhante ao do TSB, por\u00e9m com a fonte de prote\u00edna substituída pelo extrato de *C. vulgaris*, em quantidade equivalente de nitrog\u00eanio org\u00e2nico, preparados de acordo com o item 4.12.1, incubando-se a 37°C, a 150 rpm, por 24 horas, e comparados ao controle (meio TSB). A contagem bacteriana foi realizada de acordo com a descri\u00e7\u00e3o do item 4.9.

4.13 Análise da composição proximal dos extratos

As análises dos teores de lipídios, proteínas e cinzas totais da composição proximal dos extratos, em base seca, foram realizadas em triplicata.

4.13.1 Lipídios totais

Piorreck et al. (1984) e Olgúin et al. (2001) descreveram a metodologia de quantificação de teor lipídico da biomassa seca de microalgas. O processo de extração foi realizado em sistema *Soxhlet*, com refluxo, com uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção 2:1 (v/v), até o líquido ficar límpido, indicando a remoção de lipídeos da biomassa. Em seguida, foi utilizado um sistema de evaporador rotativo a vácuo para a eliminação dos solventes dos resíduos lipídicos. Os valores em massa de lipídeos foram calculados baseados na diferença de massa do balão antes e depois do procedimento.

4.13.2 Proteínas Totais

O teor proteico total do extrato foi determinado pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1984). Após o desengorduramento da amostra, descrita no item 4.13.1, as amostras foram trituradas novamente e aquecidas em bloco digestor a 350° C na presença da mistura catalisadora e H₂SO₄ concentrado, havendo a destruição da matéria orgânica e a formação de nitrogênio inorgânico na forma de (NH₄)₂SO₄. Para promover a conversão do sal em amônia, a amostra é alcalinizada com a solução de hidróxido de sódio 40% (p/v) e submetida ao processo de destilação, no qual é recolhido em solução saturada de ácido bórico. Essa solução é titulada com HCl 0,02 N padrão, que permite a determinação da concentração de nitrogênio na amostra. A quantidade de proteínas foi determinada pela multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

4.13.3 Cinzas totais

Para determinação das cinzas totais, em um cadinho de porcelana seco e previamente pesado, foi adicionada 1,0g de biomassa seca distribuída uniformemente e levado à mufla onde a amostra foi exposta à um gradiente de temperatura, sendo de 30 minutos a 200° C, 60 minutos a 400° C e 90 minutos a 600 (± 25) ° C, até todo o carvão ter sido eliminado. O cadinho foi transferido para dessecador e após sua estabilização, foi determinado o teor de cinzas totais através da diferença de massa.

4.13.4 Carboidratos

O teor de carboidratos na biomassa seca foi calculado pela diferença em massa excluindo-se as proteínas totais, os lipídeos totais e as cinzas totais.

4.14 Análises estatísticas

Através do programa Minitab 19 ®, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar se os dados foram distribuídos normalmente e o teste de Levene para determinar a homogeneidade das variâncias. Quando o valor de p nesses testes foi maior que 0,05, analisou-se estatisticamente a influência dos parâmetros avaliados por meio da análise de variância, ANOVA, e consequentemente o teste de Tukey. No entanto, quando o valor de p foi menor a 0,05 realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para verificar se todas as medianas eram iguais ($p > 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do meio residual, isolamento e identificação de bactérias

Para análise do meio residual, avaliaram-se as propriedades físico-químicas de pH, osmolaridade e condutividade dos meios, bem como verificou-se a variação de turvação, medida por absorvância, possivelmente proveniente de crescimento bacteriano no meio residual dos cultivos dos microrganismos fotossintetizantes (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de absorvância (600nm), pH, osmolaridade e condutividade do meio residual de *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e *Arthrospira platensis* incubados a 100 rpm, a 37° C por 3 dias.

Meio Residual	Tempo (dias)	Absorvância (600 nm)	pH	Osmolaridade (Osm.kg ⁻¹)	Condutividade (µS.cm ⁻¹)
<i>D. salina</i>	0	0,084±0,002	8,19±0,03	1,037±0,002	38,20±0,04
	3	0,113±0,001	8,86±0,05	1,221±0,002	49,20±0,03
<i>H. pluvialis</i>	0	0,101±0,001	8,93±0,02	0,046±0,001	0,760±0,01
	3	0,108±0,001	8,27±0,01	0,078±0,003	0,765±0,03
<i>A. platensis</i>	0	0,094±0,001	10,90±0,03	0,447±0,002	22,94±0,02
	3	0,098±0,003	10,42±0,02	0,578±0,001	26,14±0,02

O meio residual coletado foi mantido à temperatura de 37° C para favorecer o crescimento de bactérias. Os meios de cultura residuais dos microrganismos fotossintetizantes, embora ainda contenham valores residuais de nutrientes inorgânicos (RANGEL-YAGUI, 2004; CEZARE, 2018), podem apresentar, se não houver grande quantidade de células mortas, pequena disponibilidade de matéria orgânica, o que pode ter limitado o crescimento das bactérias, que são heterotróficas.

A diferença de condutividade entre o meio residual de *Haematococcus* e os meios de *Dunaliella* e *Arthrospira* se dá pelo fato do meio Bold ser menos salino do que os meios f/2 e Schlösser, o que também pode ser evidenciado pelas análises de osmolaridade. Não houve variação significativa entre os valores de início e após 3 dias de cultivo. Inoculou-se essas suspensões em meio TSB, de modo que haveria nutrientes disponíveis para o crescimento celular, observando-se crescimento bacteriano a partir do meio residual (Figura 13), indicado pela presença de células dispostas no fundo do tubo no meio residual de *D. salina*. No meio residual de *H. pluvialis*, observou-se o crescimento microbiano de coloração alaranjada. Enquanto no meio residual de *A. platensis* houve a formação de película da parte superior do tubo.

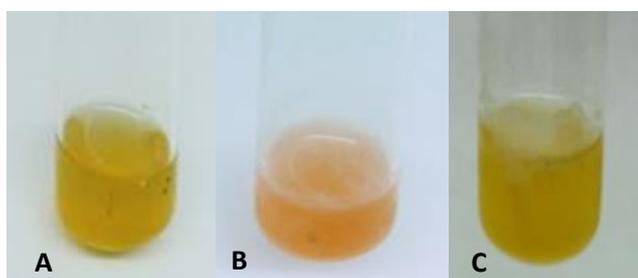


Figura 13. Crescimento bacteriano proveniente do meio residual de *Dunaliella salina* (A), *Haematococcus pluvialis* (B), e *Arthrospira platensis* (C).

Foi realizado estriamento em placa de Petri e em tubos de PCA inclinado (Figura 14) para o isolamento das colônias bacterianas. Visualizaram-se colônias nas cores amarela, marrom-alaranjada e acinzentada.

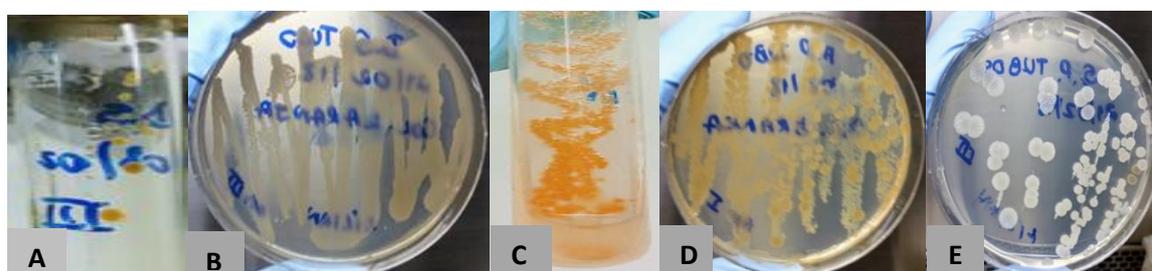


Figura 14. Crescimento microbiano proveniente dos meios residuais de *Dunaliella salina* apresentaram colônias amarelas (A) e colônias marrom-alaranjadas (B), de *Haematococcus pluvialis* com colônias alaranjadas (C e D) e de *Arthrospira platensis* com colônia acinzentada arredondada (E).

Estudos realizados com *Chlorococcum* sp recuperaram a biomassa por floculação, e, em seguida, suplementaram o meio residual com nutriente e corrigiram o valor de pH. Ao comparar a quantidade de biomassa recuperada a partir de meios frescos ou reciclados, verificaram que as concentrações foram semelhantes (UMMALYMA et al., 2016).

Assim, há a possibilidade de reciclar os meios de cultura provenientes de microalgas e cianobactérias. Toro et al. (2013) mostraram que o meio residual proveniente da biomassa de microalga é uma carga potencial para a fabricação de biocompósitos, além de ser economicamente vantajoso, pois é capaz de substituir entre 20 e 30% da matriz polimérica, reduzindo custos de produção e aumentar a competitividade dos bioplásticos.

Maurya e colaboradores (2016) estudaram o cultivo da microalga verde *Chlorella vulgaris* em meio de cultura suplementado com a biomassa hidrolisada de *Lyngbya majuscula* desengordurada. A floração dessa cianobactéria possui um alto nível de toxicidade, impossibilitando o uso para biocombustíveis. Foi explorado o aumento da produtividade de biomassa e lipídios de *Chlorella vulgaris*, que resultou na diminuição da eutrofização, e também no custo econômico do cultivo de uma microalga oleaginosa.

O meio residual de microalgas contém concentrações de matéria orgânica resultante da lise celular e, portanto, possui alta turbidez (TAFRESHI; SHARIATI, 2009). A densidade bacteriana é maior em culturas de algas em fase estacionária comparada a fase exponencial (NATRAH et al., 2013). Este meio proveniente do crescimento de *Dunaliella* poderia ser biologicamente reciclado, sendo tratado com bactérias que estão naturalmente presentes no meio devido às altas concentrações de glicerol, aminoácidos e outros compostos orgânicos. A otimização de condições para a remoção biológica de matéria orgânica de águas residuais usando bactérias halofílicas endêmicas no meio hipersalino e a adição combinada de Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} e NH_4^+ ao efluente estimularam o crescimento dessas bactérias, aumentando a remoção de glicerol do meio na medida em que o glicerol era indetectável em culturas após dois dias de incubação. Além disso, as bactérias halofílicas contêm bacterioruberina, um pigmento vermelho que tem atraído

à biotecnologia devido às suas atividades antioxidantes (TAFRESHI; SHARIATI, 2009).

Os microrganismos isolados foram submetidos à identificação por técnicas microbiológicas e bioquímicas diferenciais, sendo identificados como *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus pumilus* nos meios residuais de *D. salina* e *A. platensis*. E no meio residual de *H. pluvialis* foram identificadas as bactérias mencionadas anteriormente e também a *Brevundimonas aurantiaca*.

Essas bactérias isoladas estão presentes no ambiente e possuem classificação de risco nível 1, o que indica que microrganismos como o *B. subtilis* possuem baixa probabilidade de promover doenças em humanos ou animais saudáveis em faixa etária adulta. Acarretando um risco muito baixo ou até mesmo ausente, individual e para a comunidade, (BRASIL, 2017; GUIA PRÁTICO EM BIOSSEGURANÇA E SEGURANÇA QUÍMICA E BIOLÓGICA, 2018).

Da mesma forma, apresentam baixo risco clínico quanto à biossegurança da manipulação pelos operadores do processo, e, também para serem utilizadas em processos industriais para uma potencial obtenção de produtos comercialmente viáveis. Verificaram-se características na literatura sobre cada microrganismo isolado e identificado (Tabela 3). O *Bacillus atrophaeus* e o *Bacillus pumillus* pertencem à família *Bacillaceae* e ao filo *Firmicutes*, sendo microrganismos Gram-positivos, em forma de bastonete que tem como principal característica a formação de endósporos (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a; BRANQUINHO *et al.*, 2014; VERTTATH *et al.*, 2017). KHANEJA *et al.* (2009). Avaliaram que diferentes bactérias formadoras de esporos produzem carotenoides, sendo o meio de cultura utilizado e a temperatura de incubação fatores que interferem na sua expressão. A coloração das colônias é dada por um conjunto de moléculas dentre as quais estão os carotenoides, para os quais é destacada a importância destes, pois auxiliam na proteção de esporos de *Bacillus* frente à radiação UV, principalmente quando refere-se a ambientes marinhos.

Tabela 3. Características diferenciais das bactérias isoladas e identificadas (Adaptado: RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015; SHIVAJI et al., 2006; GORDON, 1977, KARMAKAR et al., 2019; CCUG, 2001)

	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>
Crescimento anaeróbico	-	-	nd
Crescimento em:			
50°	Variável	variável	nd
60°	-	-	nd
Reação da gema do ovo	-	-	nd
Hidrólise da caseína	+	+	nd
Hidrólise do amido	+	-	+
Arginina diidrolase	-	-	-
Produção de indol	-	-	-
Hidrólise da gelatina	+	+	+
Redução de nitrato	+	-	-
Gás de carboidratos	-	-	nd
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	variável	-
Urease	nd	nd	-
Xilose	nd	nd	-
Formação de ácidos por:			
D-arabinose	-	-	-
Glicerol	+	+	+
Glicogênio	+	-	nd
Inulina	+	-	nd
Manitol	+	+	-
Salina	+	+	nd
D-trealose	+	+	nd
Glicose	+	+	+
Degradação da tirosina	-	-	nd
Citrato	+	-	+
Teste de Vogler- Proskauer	+	+	-

nd: não determinado

MUJTABA et al. (2016) verificaram a promoção do crescimento celular da *C. vulgaris* por *B. pumillus*. ZHOU et al. (2018), isolaram a cepa de *Bacillus pumilus* de ambientes marinhos, o qual mostrou potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas. Embora os microrganismos identificados sejam Gram-positivos, existe a possibilidade da presença de Gram-negativos no meio,

mas que podem ser inibidos pela presença de alta salinidade e de metabólitos de atividade antimicrobiana no meio.

O *B. pumilus* e o *B. altitudinis* apresentam bastante semelhança, mas a topologia da árvore 16S rRNA mostrou que apesar da semelhança, tratam-se de duas espécies distintas. As rizobactérias, dentre as quais inclui-se o *B. pumilus* foram eficientes em promover o crescimento de plantas (BRANQUINHO et al., 2014), tendo em vista o ambiente terrestre, em relação ao ambiente marinho.

No caso do *Bacillus atrophaeus* os termos “atro” e “phaeus” fazem referência às cores negra e marrom, respectivamente, devido à produção de um pigmento marrom escuro em meios de cultivo (GIBBONS et al., 2011; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a). Biopolímeros podem flocular microalgas, como o ácido poli-g-glutâmico produzido por *B. subtilis* (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013).

O gênero *Brevundimonas* pertence à classe de Alfaproteobactérias e a família Caulobacteraceae. A *Brevundimonas aurantiaca* é uma bactéria Gram-negativa, não fermentativa, aeróbica e com 1 à 4 µm de comprimento e 0,5 µm de largura. É movida por um flagelo de comprimento curto e cresce a 30 °C (SCOTTA et al., 2011).

As espécies de *Brevundimonas* são onipresentes no meio ambiente e são encontradas principalmente na região da rizosfera do solo (KARMAKAR et al., 2019) e em cultura de *Chlorella* (SCOTTA et al., 2011). Ela pode produzir ácido indol acético e sideróforos, o que pode estimular o crescimento de plantas e pode ter capacidade antimicrobiana, habilidade esta que pode ser usada como um potencial biofertilizante com a função de pesticida (MANDRYK et al., 2007). Possivelmente, encontrar a cepa de *B. aurantiaca* no meio residual de *Haematococcus pluvialis* se deve ao fato da baixa salinidade do meio Bold comparado ao meio f/2 e ao meio Schlösser, pois essa espécie não é halotolerante. E observa-se que o meio Bold é meio de cultivo utilizado tanto para *Chlorella*, encontrado na literatura, quanto para *Haematococcus*, utilizado nesse presente estudo.

5.1.1 Suspensões matrizes das bactérias e cultivos

A suspensão matriz de *Bacillus pumilus* tem coloração amarelada, com população $1,00 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ e valor de pH 9,71. Por outro lado, a suspensão matriz de *Bacillus atrophaeus* possui coloração amarronzada, com população $3,37 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e valor de pH 9,66. Já a suspensão de *Brevundimonas aurantiaca* possui concentração de $6,35 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, valor de pH 7,90 e coloração amarela-alaranjada.

Inoculou-se 10^2 UFC.mL⁻¹ de *B. atrophaeus* e *B. pumilus* em meio f/2 e Bold onde a bactéria foi inicialmente encontrada, porém, na ausência da microalga, após 24h, não houve o crescimento bacteriano, permanecendo em 10^2 UFC.mL⁻¹. O mesmo ocorreu com a *B. aurantiaca* em meio Bold. O meio Bold e f/2 são meios ricos em nitrato, porém o *B. pumilus* e a *B. aurantiaca* não reduzem tais compostos nitrogenados para obtenção de energia e assim promover a multiplicação celular.

O *B. atrophaeus* possui a capacidade de reduzir nitrato, mas verificou-se que não houve crescimento microbiano devido à falta de nutrientes orgânicos. Segundo Nakano e Zuber (1998) essa bactéria precisa de glicose e piruvato para crescer por fermentação, os quais são fornecidos quando há a presença direta de glicose, ou em misturas de aminoácidos. Uma das principais razões pelas quais o *B. subtilis* precisa de glicose e piruvato para crescer por fermentação pode ser a aparente falta da enzima piruvato de formatolase.

Avaliou-se o crescimento de *B. atrophaeus*, *B. pumilus* e *B. aurantiaca* em meio padrão, TSB (Figura 15). O *B. atrophaeus* estabeleceu a fase exponencial no início do cultivo, não havendo uma fase de adaptação, tendo fase log se estendido até 8h de cultivo. A *Brevundimonas aurantiaca* teve um comportamento semelhante, mas iniciou a fase exponencial após 2h de cultivo, mantendo-se em crescimento exponencial até 10h de cultivo. O *B. pumilus* atingiu a exponencial a partir de 6h. Todos os microrganismos chegaram a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹, demonstrando que as células encontram-se viáveis se os componentes do meio e as condições de cultivo foram adequadas.

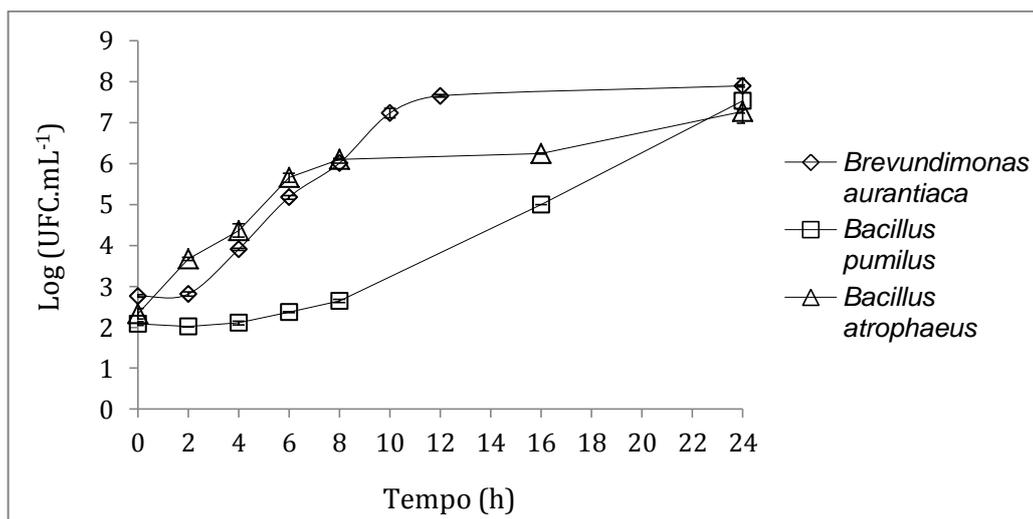


Figura 15. Logaritmo da concentração celular (UFC.mL⁻¹) de *B. atrophaeus*, *B. pumilus* e *B. aurantiaca* em função do tempo em meio TSB, cultivados a 37°C a 150rpm por 24h.

A velocidade específica de crescimento representa a massa de microrganismos produzida por unidade de massa pelo tempo, sendo que quanto maior a inclinação da reta do logaritmo Neperiano da concentração celular em função do tempo, maior é esta velocidade (Figura 16).

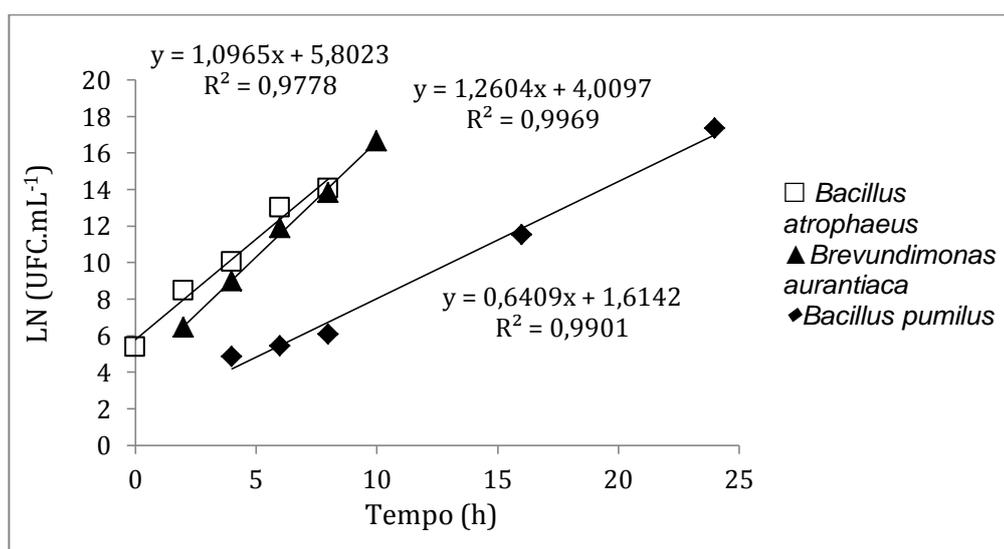


Figura 16. Logaritmo Neperiano da concentração celular (UFC.mL⁻¹) em função do tempo, no período de crescimento exponencial, de *B. atrophaeus*, *B. pumilus* e *B. aurantiaca* em meio TSB, cultivados a 37°C a 150rpm por 24h.

Com relação à velocidade específica de crescimento, a *Brevundimonas aurantiaca* teve um μ_m de $1,26 \text{ h}^{-1}$, o *Bacillus atrophaeus*, obteve μ_m de $1,10 \text{ h}^{-1}$ e o *Bacillus pumilus* alcançou um μ máximo de $0,64 \text{ h}^{-1}$, valor 1,7 vezes menor do que a velocidade específica de crescimento da *Brevundimonas aurantiaca*.

5.2 Co-culturas

Gómez, Valero e Avendaño (2012) identificaram cinco cepas bacterianas (*Exeguobacterium aurantiacum*, *Xanthomonas* sp., *Halomonas* sp., *Bacillus okhensis*, e *Indibacter alkaliphilus*) associadas à mucilagem de monocultura de *A. platensis*, verificando a capacidade dessas cepas para produzir ácido 3-indolacético (IAA) como possível associação benéfica.

Lakaniemi et al. (2012) avaliaram o crescimento de *Dunaliella tertiolecta* associada a bactérias em fotobiorreatores, no qual as velocidades específicas de crescimento ($1,2-1,4 \text{ dia}^{-1}$) e as concentrações máximas de biomassa de *D. tertiolecta* ($2,1-2,9 \text{ g.L}^{-1}$) foram semelhantes nas três configurações de fotobiorreatores de placa plana. Nelas, a *D. tertiolecta* e o crescimento bacteriano foram medidos por método molecular de PCR quantitativo (qPCR). Trabalhou-se com cepa microalgal xênica e meio de cultura à base de água de torneira, sendo que a alta salinidade de 3% do meio de cultura inibiu o crescimento de bactérias transmitidas por esta água, de modo que foram favorecidas as bactérias halotolerantes e halofílicas que estavam inicialmente presentes no *inóculo de D. tertiolecta*. As comunidades heterotróficas mostraram-se estáveis e reprodutíveis em todos os cultivos em biorreatores de placa plana e dominadas por bactérias pertencentes às classes *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteria* e *Alphaproteobacteria*.

Testaram-se co-culturas de *D. salina* axênica com bactérias isoladas da cepa não axênica da mesma espécie. Inicialmente os testes foram realizados com um inóculo de *D. salina* com $10^4 \text{ células.mL}^{-1}$ em condições de luminosidade de $20 (\pm 10) \mu\text{mol fótons.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm por até 50 dias (Figura 17).

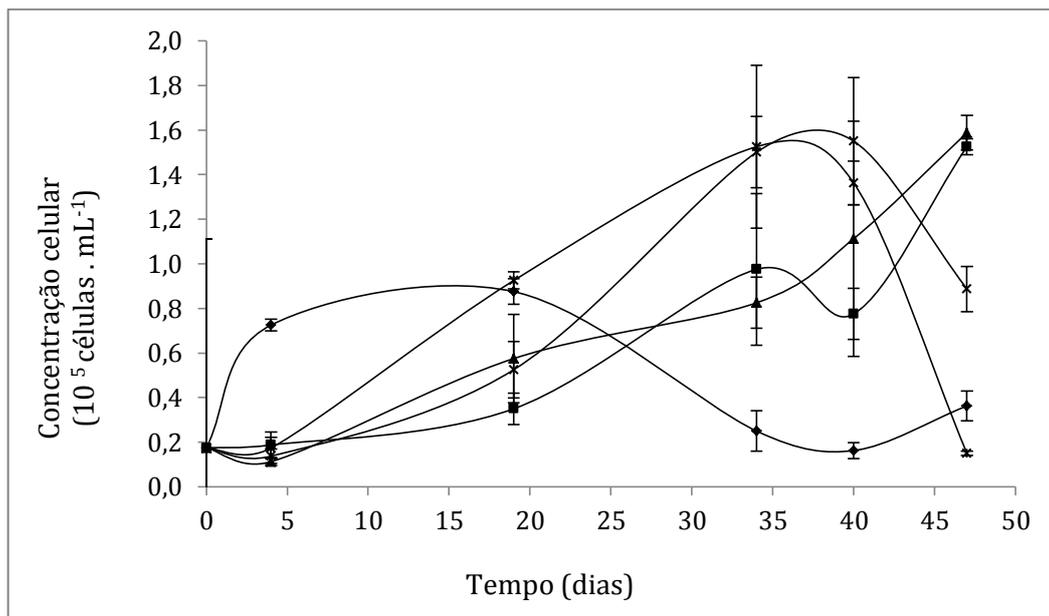


Figura 17. Concentração de \bullet *D. salina* axênica (concentração inicial de 10^4 células.mL⁻¹) e de co-culturas de *D. salina* (concentração inicial de 10^4 células.mL⁻¹) com \blacksquare *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); \blacktriangle *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); \times *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); \star *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹). Cultivos realizados em condições de luminosidade de $20 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm.

As diferentes concentrações de *B. pumilus* atuaram como promotores de crescimento de *D. salina*, sendo que os in\u00f3culos de 10^2 UFC.mL⁻¹ e de 10^4 UFC.mL⁻¹ proporcionaram concentra\u00e7\u00f5es finais de $1,6 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e de $1,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ de *D. salina*, respectivamente, enquanto que no cultivo ax\u00eanico a concentra\u00e7\u00e3o celular final foi de $2,5 \times 10^4$ células.mL⁻¹, mas com valor m\u00e1ximo de $9,3 \times 10^4$ células.mL⁻¹ ap\u00f3s 19 dias de cultivo. Dessa forma, houve um aumento de 64 % na quantidade de *D. salina* formada quando do uso de co-cultura com *B. pumilus*.

Considerando os cultivos de co-cultura utilizando c\u00e9lulas de *B. atrophaeus*, estes levaram a um comportamento semelhante da *D. salina*, embora tenha havido um retardamento na curva de crescimento, de modo que o m\u00e1ximo valor de concentra\u00e7\u00e3o de *D. salina* somente ocorreu com 47 dias de cultivo, mas chegando ao mesmo patamar daquele obtido com co-cultura com *B. pumilus*.

Em relação ao cultivo da microalga axênica, após 19 dias de cultivo, período que coincidiu com a estabilização celular, verificou-se na placa controle o crescimento de microrganismos semelhante às leveduras, apresentando colônias de coloração branca e aspecto cremoso espalhado sobre o meio, além de formas morfológicas lenticulares identificadas por microscopia, corroborando com a literatura, na qual Toncheva-Panova e Ivanova (1997) observaram maior ocorrência de contaminantes fúngicos em cultivos de *Dunaliella salina* livre de bactérias.

Nos cultivos de *D. salina*, a queda da concentração celular normalmente é acompanhada de lise (Figura 18). Não houve coloração alarajanda no meio de cultivo, como ocorre quando há grande quantidade de células com altos teores de carotenoides.

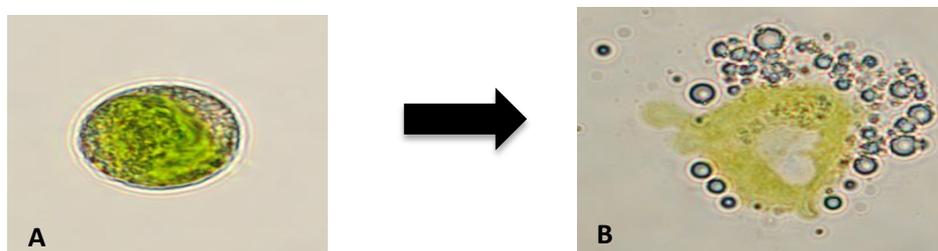


Figura 18. A) célula de *D. salina* axênica íntegra; B) conteúdo intra celular extravasado devido a lise da membrana celular de *D. salina*.

Como praticamente não houve crescimento bacteriano nos meios residuais verificado no item 5.1 (Tabela 2), possivelmente a matéria orgânica fornecida para o crescimento celular em co-cultura pode ser proveniente da morte das microalgas existentes no meio de cultivo. Segundo Baines e Pace (1991), as fontes de carbono alóctones, vindas da excreção de zooplânctons e da senescência de fitoplanctôns, são necessárias para atender as necessidades bacterianas, considerando o ambiente aquático.

Avaliou-se o crescimento bacteriano dessas co-culturas (Figura 19) e verificou-se que, independentemente da concentração inicial, de um modo geral, a concentração celular final atingiu valores da ordem de 10^7 UFC.mL⁻¹.

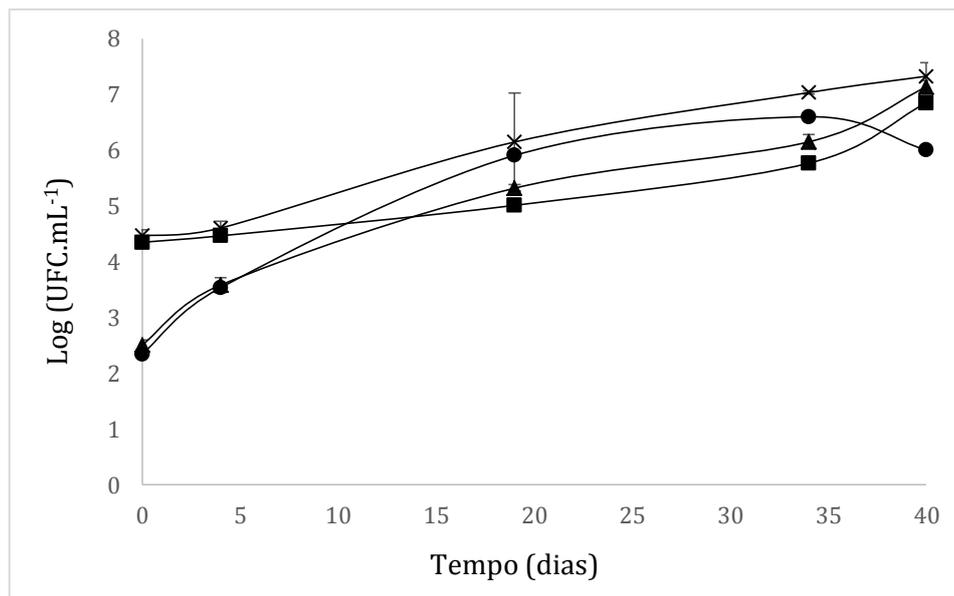


Figura 19. Logarítmo da concentração de células de \blacklozenge *B. atropheus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); \blacksquare *B. atropheus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); \blacktriangle *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); \times *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹) em cultivos em co-cultura com *D. salina*. Cultivos realizados em condições de luminosidade de $20 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm.

As condições ambientais tais como concentrações de nutrientes inorgânicos, vitaminas e minerais, bem como as interações bacterianas que são específicas, influenciam no crescimento das microalgas. O modo de interagir das bactérias pode ser diferente em outras condições de crescimento da quantidade e da qualidade dos fitoplânctons. Verificou-se que as bactérias promovem o crescimento de algas na fase exponencial (GROSSART; SIMON, 2007).

Até 34 dias, os cultivos em co-cultura tiveram um aumento do valor de pH, decorrentes em parte do crescimento microalgal, que remove gás carbônico do meio de cultivo, e crescimento bacteriano com uso de fonte de nitrogênio orgânico, como proteínas e peptídeos provenientes de microalgas mortas, com liberação de amônia no meio de cultivo. A seguir houve uma queda do valor de pH proveniente provavelmente do metabolismo bacteriano com consumo do íon amônio e/ou produção de ácidos orgânicos. Esse comportamento, também ocorreu para o cultivo axênico, que foi mantido nesta condição até aproximadamente 19 dias de cultivo (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de pH dos cultivos em co-culturas de *D. salina* axênica (concentração inicial de 10^2 células.mL⁻¹) com *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus pumilus* com concentrações iniciais de 10^2 e 10^4 UFC.mL⁻¹ cultivadas a 25°C, e com 20 (± 10) μ mol fótons m⁻². s⁻¹.

Tempo (dias)	<i>D. salina</i> Axênica (10 ⁴ células.mL ⁻¹)	<i>D. salina</i> (10 ⁴ células.mL)		<i>D. salina</i> (10 ⁴ células.mL)	
		+		+	
		<i>B. atrophaeus</i> (UFC.mL ⁻¹)	<i>B. pumilus</i> (UFC.mL ⁻¹)	<i>B. atrophaeus</i> (UFC.mL ⁻¹)	<i>B. pumilus</i> (UFC.mL ⁻¹)
		10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴
0	7,11 ($\pm 0,16$)	7,14 ($\pm 0,04$)	7,10 ($\pm 0,10$)	7,21 ($\pm 0,10$)	7,02 ($\pm 0,09$)
4	7,15 ($\pm 0,10$)	7,20 ($\pm 0,11$)	7,19 ($\pm 0,12$)	7,22 ($\pm 0,08$)	7,20 ($\pm 0,13$)
19	7,23 ($\pm 0,04$)	7,49 ($\pm 0,07$)	7,55 ($\pm 0,03$)	7,76 ($\pm 0,06$)	7,49 ($\pm 0,08$)
34	7,81 ($\pm 0,11$)	7,80 ($\pm 0,09$)	7,92 ($\pm 0,07$)	7,93 ($\pm 0,12$)	7,70 ($\pm 0,10$)
40	7,60 ($\pm 0,08$)	5,98 ($\pm 0,22$)	6,53 ($\pm 0,16$)	7,00 ($\pm 0,11$)	7,35 ($\pm 0,14$)
47	6,09 ($\pm 0,22$)	7,11 ($\pm 0,03$)	7,29 ($\pm 0,3$)	6,57 ($\pm 0,09$)	6,97 ($\pm 0,05$)

Tendo em vista que os cultivos realizados com concentração inicial de *D. salina* com 10^4 células.mL⁻¹ em condições de luminosidade de 20 (± 10) μ mol fótons.m⁻². s⁻¹, 25°C a 110 rpm levaram a tempos de cultivo longos, optou-se por realizar cultivos em que estes tempos fossem diminuídos.

Dessa forma deu-se continuidade ao trabalho com co-culturas, mas aumentando a concentração celular inicial de *D. salina* para 10^5 células.mL⁻¹ em condições de luminosidade de 80 (± 10) μ mol fótons.m⁻². s⁻¹, 25°C a 110 rpm, cujos resultados são apresentados na Figura 20. Foram realizadas as seguintes condições: *B. atrophaeus* (10^2 UFC.mL⁻¹); *B. atrophaeus* (10^4 UFC.mL⁻¹); *B. pumilus* (10^2 UFC.mL⁻¹); *B. pumilus* (10^4 UFC.mL⁻¹); *B. atrophaeus* (10^1 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (10^1 UFC.mL⁻¹); *B. atrophaeus* (10^2 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (10^2 UFC.mL⁻¹).

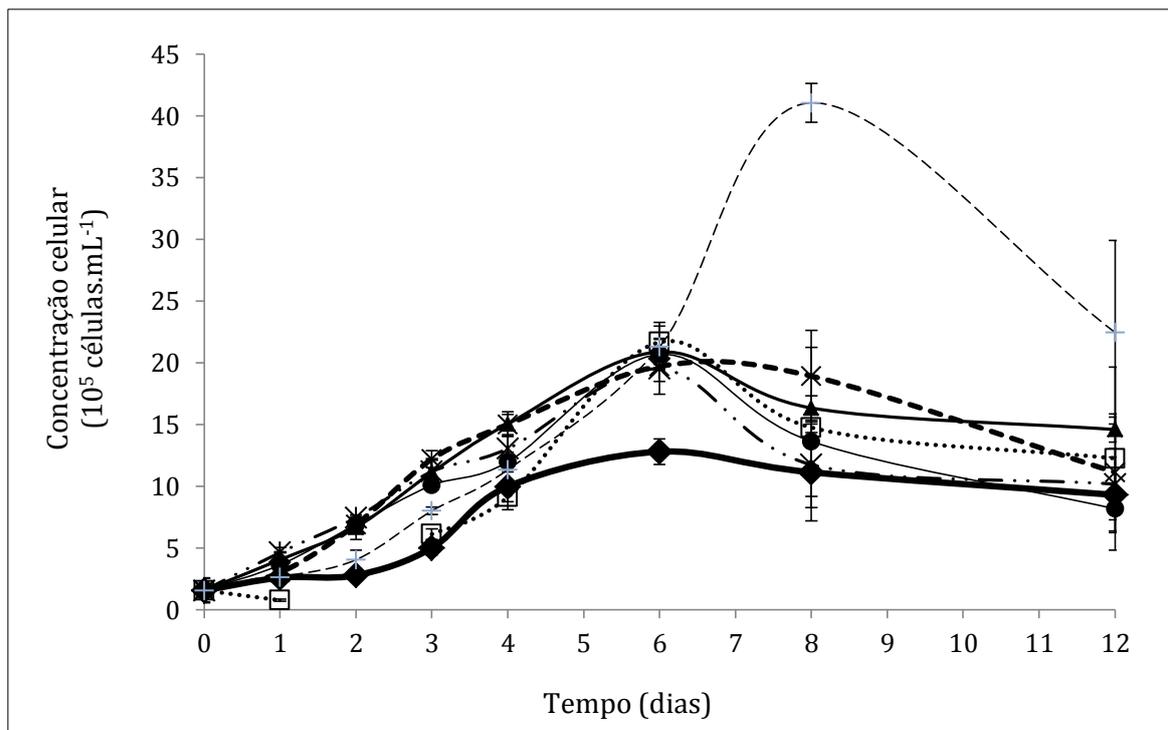


Figura 20. Curvas de crescimento de \bullet *D. salina* axênica (concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹) e de co-culturas de *D. salina* (concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹) com \square *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); \blacktriangle *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); \times *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); $*$ *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); \bullet *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (1 concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹); $+$ *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹) e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹). Cultivos realizados em condições de luminosidade de $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm.

De um modo geral, houve uma tendência de aumento da concentração obtida de *D. salina* em co-cultura com as cepas de *B. atrophaeus* e/ou *B. pumilus*. O comportamento do crescimento da *D. salina* com concentrações iniciais de 10^2 UFC.mL⁻¹ e 10^4 UFC.mL⁻¹ de *B. atrophaeus* e *B. pumilus* tiveram a mesma tendência. No caso da combinação das duas espécies de *Bacillus* na concentração de 10^2 UFC.mL⁻¹, totalizando $2,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹, no entanto, levaram à concentração de $4,12 \times 10^6$ células.mL⁻¹, com destacada diferença em relação ao experimento padrão ($p < 0,001$, MANOVA, tendo como covariável o tempo, com valores de concentração celular de 6 a 12 horas), que foi aquele

conduzido com cepa axênica. A diminuição da concentração total destas bactérias para 2×10^1 UFC.mL⁻¹, no entanto, levou a resultados praticamente iguais aos cultivos padrão. Assim, o aumento do crescimento celular foi decorrente da adequação da concentração inicial do inóculo de bactéria, bem como a combinação de microrganismos.

Com relação ao comportamento bacteriano, observa-se o crescimento das bactérias desde o início do cultivo, sem que praticamente tenha ocorrido fase lag, chegando a valores próximos a 10^9 UFC.mL⁻¹ nos primeiros 4 dias de cultivo (Figura 21).

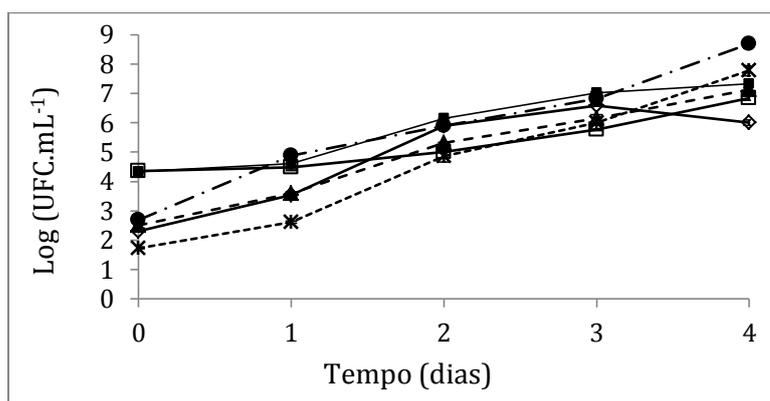


Figura 21. Concentração de células de ◆ *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); ◻ *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); ▲ *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); ■ *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹); ⋆ *B. atrophaeus* e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^1 UFC.mL⁻¹); ● *B. atrophaeus* e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹) em cultivos em co-cultura com *D. salina*. Cultivos realizados em condições de luminosidade de $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 25°C a 110 rpm.

Dessa forma, o aumento da concentração inicial de *D. salina* e o aumento da intensidade luminosa não só antecipou o crescimento da microalga, mas também das bactérias. Também foi possível observar que o maior crescimento bacteriano ocorreu justamente na condição onde houve o maior crescimento da microalga, que é a co-cultura desta com a mistura das duas bactérias (*B. atrophaeus* e *B. pumilus*), cada uma em concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹.

Em praticamente todos os experimentos, houve uma tendência de queda do valor de pH desde o início do cultivo até o término (12 dias) (Tabela 5), provavelmente devido à formação de ácidos pelas bactérias.

Tabela 5. Valor de pH das co-culturas de *D. salina* axênica com inóculos iniciais de 10^5 células.mL⁻¹ cultivadas a $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Tempo (dias)	<i>D. salina</i> Axênica (10^5 células.mL)	<i>D. salina</i> (10^5 células.mL) + <i>B. atrophaeus</i> (UFC.mL ⁻¹)		<i>D. salina</i> (10^5 células.mL) + <i>B. pumilus</i> (UFC.mL ⁻¹)		<i>D. salina</i> (10^5 células.mL) + <i>B. atrophaeus</i> (UFC.mL ⁻¹) + <i>B. pumilus</i> (UFC.mL ⁻¹)	
		10^2	10^4	10^2	10^4	$10^1 + 10^1$	$10^2 + 10^2$
		0	6,66 ($\pm 0,35$)	7,76 ($\pm 0,08$)	7,67 ($\pm 0,12$)	6,86 ($\pm 0,23$)	7,86 ($\pm 0,13$)
6	6,45 ($\pm 0,40$)	7,54 ($\pm 0,20$)	7,86 ($\pm 0,05$)	7,95 ($\pm 0,04$)	7,93 ($\pm 0,03$)	7,99 ($\pm 0,02$)	8,37 ($\pm 0,26$)
8	6,43 ($\pm 0,32$)	7,01 ($\pm 0,15$)	7,62 ($\pm 0,03$)	7,69 ($\pm 0,07$)	7,70 ($\pm 0,03$)	7,72 ($\pm 0,05$)	8,35 ($\pm 0,17$)
12	6,31 ($\pm 0,31$)	7,17 ($\pm 0,07$)	7,50 ($\pm 0,09$)	7,68 ($\pm 0,07$)	7,72 ($\pm 0,01$)	7,82 ($\pm 0,03$)	7,81 ($\pm 0,01$)

Fouilland et al. (2018) sugeriram que as bactérias que crescem com cepas de microalgas provavelmente são bactérias que se beneficiam da ficosfera, em detrimento da velocidade específica de crescimento de algas. No presente estudo, essa relação também foi observada. O cultivo controle de *D. salina* axênica (Figura 22) teve uma velocidade específica de crescimento máxima (μ_m) de $0,60 \text{ dia}^{-1}$.

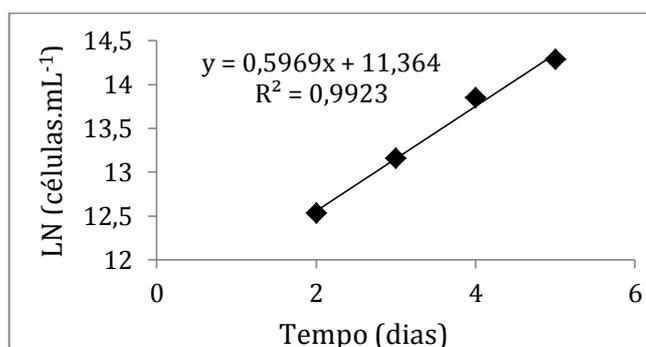


Figura 22. *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ (controle) cultivadas a $80 (\pm 10)$ $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

As co-culturas de *D. salina* com *B. atrophaeus* foram comparadas ao controle de *D. salina* axênica. Com a concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹ de *B. atrophaeus* obteve-se μ_m de $0,54 \text{ dia}^{-1}$, enquanto que com a concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹ o μ_m foi de $0,42 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 23). Quanto maior a concentração de bactéria inoculada, menor foi a velocidade específica de crescimento do microrganismo.

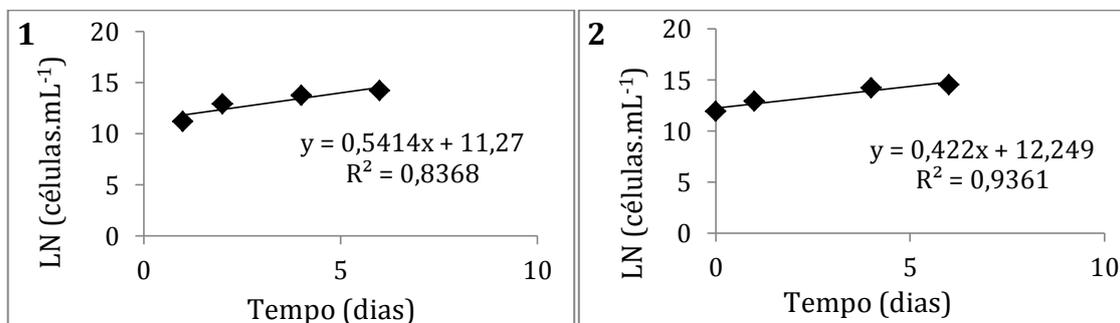


Figura 23. 1) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); 2) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹) cultivadas a $80 (\pm 10) \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Compararam-se as co-culturas de *D. salina* com *B. pumilus*. Com a concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹ no cultivo obteve-se μ_m de $0,44 \text{ dia}^{-1}$, enquanto que com a concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹, o μ_m foi de $0,36 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 24).

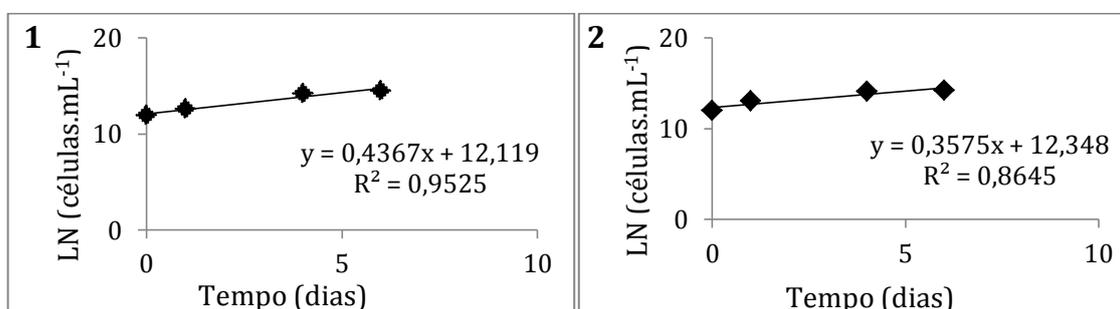


Figura 24. 1) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹); 2) *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^4 UFC.mL⁻¹) cultivadas a $80 (\pm 10) \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Também compararam-se as co-culturas de *D. salina* com *B. pumilus* e *B. atrophaeus* com a concentração inicial de cada bactéria sendo 10^1 UFC.mL⁻¹, no

qual obteve-se um μ_m de $0,38 \text{ dia}^{-1}$ no cultivo. Quando a concentração inicial de cada bactéria foi de 10^2 UFC.mL^{-1} , o μ_m foi de $0,36 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 25).

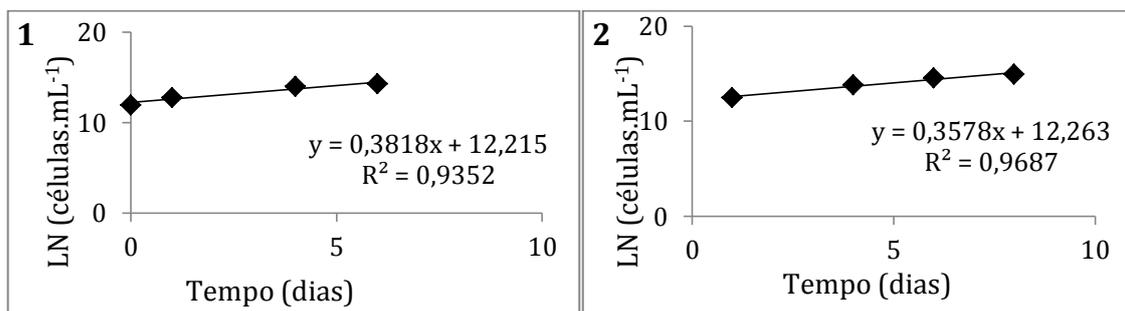


Figura 25. 1) *D. salina* axênica com concentração inicial de $10^5 \text{ células.mL}^{-1}$, *B. atrophaeus* (1 concentração inicial de 10^1 UFC.mL^{-1}) e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^1 UFC.mL^{-1}); 2) *D. salina* axênica com concentração inicial de $10^5 \text{ células.mL}^{-1}$, *B. atrophaeus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL^{-1}) e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL^{-1}) cultivadas a $80 (\pm 10) \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Fouilland et al. (2018), que afirmaram o efeito negativo das bactérias baseando-se na velocidade específica de crescimento, Le Chevanton et al. (2013) concluíram que o dispositivo experimental era uma ferramenta de alto rendimento do crescimento de microalgas provenientes do efeito bacteriano. Duas cepas de bactérias dos gêneros *Alteromonas* sp. e *Muricauda* sp. provocaram maior acúmulo de biomassa de *Dunaliella* sp., bem como o aumento na incorporação de nitrogênio, o que sugeriu que a disponibilidade deste nutriente para microalgas foi afetada por essas bactérias. Os resultados do estudo sugeriram que o desempenho da cultura pode ser substancialmente modificado por bactérias, resultando em maior produtividade da cultura, o que é de particular interesse para a produção industrial.

O presente estudo demonstrou que a concentração do microrganismo, juntamente com sua combinação, resulta na diferença do crescimento microalgal. Verificou-se que as bactérias isoladas da cepa xênica, cultivados juntamente a cepa axênica, embora tenham diminuído o μ_m , anteciparam o crescimento celular e também o estenderam, levando a uma maior concentração celular final, contrapondo o efeito negativo citado anteriormente, estando em acordo com o trabalho de Le Chevanton et al. (2013).

5.3 Extratos

Ao observar o crescimento das co-culturas, verificou-se que os cultivos associados com bactérias podem melhorar o crescimento celular de *D. salina*. Da mesma forma, a morte celular da microalga fornece matéria orgânica para o consumo das bactérias. Mediante esses resultados, produziu-se extratos microbianos com potencial inovação tecnológica para as finalidades descritas a seguir.

Adicionou-se o extrato seco do *B. atrophaeus* ATCC 9372, mesma espécie de microrganismo isolado nos meios de *D. salina*, *H. pluvialis*, *C. vulgaris* e *A. platensis*, para ser utilizado como promotor de crescimento desses microrganismos fotossintetizantes. Quanto ao crescimento do *B. atrophaeus* ATCC 9372, utilizou-se extratos das cepas de *C. vulgaris* e *A. platensis* para substituir a fonte de proteína do meio de cultivo TSB.

5.3.1 Extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372

Realizaram-se dois cultivos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 para a produção do extrato bacteriano, com diferença de temperatura de 7 °C entre os dois cultivos, no qual foi avaliado o crescimento celular para definir operacionalmente qual extrato bacteriano utilizar.

No cultivo em biorreator a 30°C levou-se 16 horas para atingir a concentração máxima de 22,5 g.L⁻¹ e entrar na fase estacionária. A produção de espuma foi baixa, com a quantidade de antiespumante adicionada no início do cultivo (2 gotas) sendo suficiente para o decorrer do processo, devido ao seu metabolismo mais lento em comparação com o cultivo de 37° C. A concentração de açúcares redutores, inicialmente 2,9 g.L⁻¹, em decorrência da alimentação com glicose, aumentou gradativamente até 8h de cultivo para 10,8 g.L⁻¹, e permaneceu oscilando entre 12,0 e 14,5 g.L⁻¹ até 22 horas. O valor de pH inicial do cultivo foi de 7,13, que diminuiu até 6,06 em 16 horas de cultivo, o que corresponde ao último ponto da fase exponencial de crescimento, evidenciando que o aumento da

biomassa mais pronunciado, devido a seu metabolismo, levou a uma diminuição do valor de pH (Figura 26), o que pode ter sido uma consequência da limitação de oxigênio quando o crescimento celular foi mais acentuado, com formação de ácidos. No entanto, quando o valor de pH chega a valores da ordem de 6, há uma modificação no metabolismo com possível consumo dos ácidos orgânicos produzidos, e provavelmente alterando o metabolismo para a formação de compostos não ácidos, como 2,3 butanodiol e etanol (BIAŁKOWSKA et al., 2016).

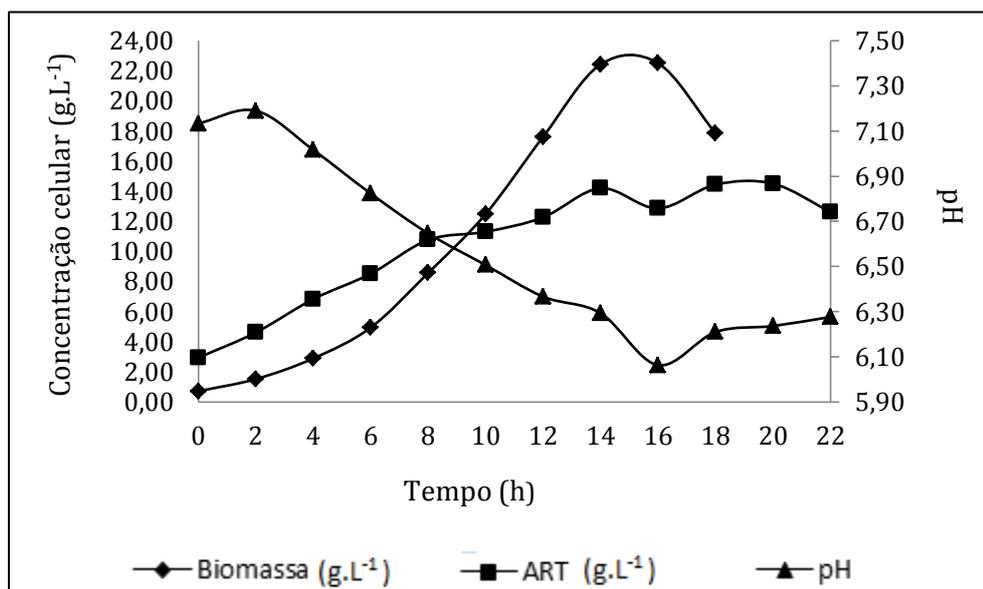


Figura 26. Curva de crescimento da biomassa de *B. atrophaeus* (g.L⁻¹), concentração de açúcares redutores totais (ART) (g.L⁻¹) e valor de pH em função do tempo de cultivo à 30°C.

No cultivo de 37°C, o *B. atrophaeus* precisou de apenas 2 horas de adaptação, metade do tempo para o cultivo a 30°C, para crescer exponencialmente até 12h, obtendo-se concentração máxima de 21,7 g.L⁻¹ de biomassa. A oscilação de açúcares redutores foi menor que a observada para o cultivo anterior; iniciou-se em 2,7 g.L⁻¹ e as concentrações mantiveram-se de 6,0 a 8,0 g.L⁻¹. O pH inicial foi 7,19, diminuiu até 8h chegando a 5,97, o que, da mesma forma que no cultivo a 30°C, levou a uma alteração do metabolismo, com consequente reversão da tendência de queda de pH (Figura 27).

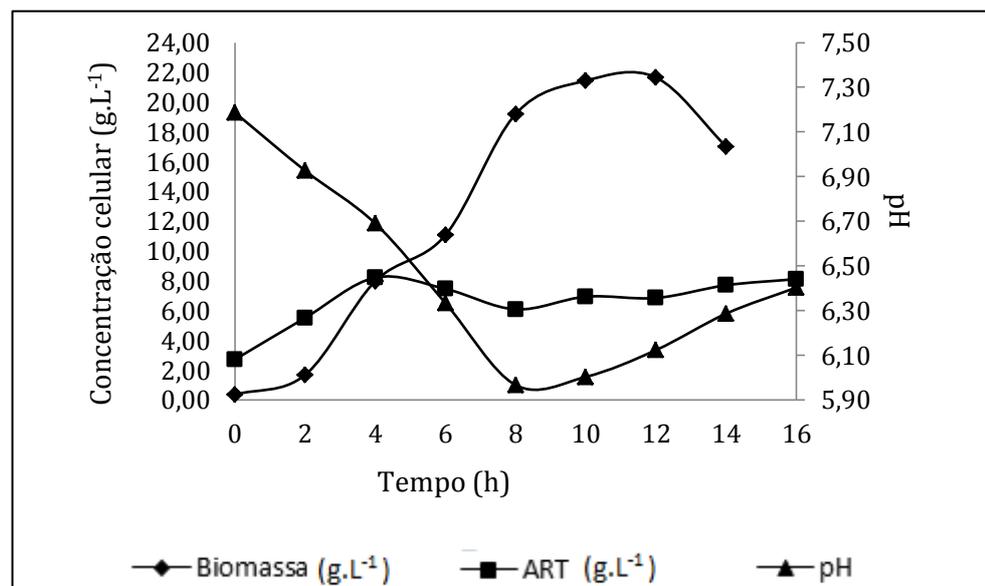


Figura 27. Curva de crescimento da biomassa de *B. atrophaeus* (g.L⁻¹), concentração de açúcares redutores totais (ART) (g.L⁻¹) e valor de pH em função do tempo de cultivo à 37°C.

A faixa de temperatura ótima de crescimento está entre 28 e 30°C (NAKAMURA, 1989). No entanto, neste trabalho, ao comparar os cultivos em duas temperaturas diferentes, mantendo as condições anteriores, verificou-se que o aumento de temperatura para 37°C necessitou de 6 horas a menos de cultivo para estabilizar o crescimento celular. O fato do cultivo ocorrer mais rapidamente levou à necessidade de maior adição de antiespumante ao longo do cultivo.

Beranová et al. (2010) verificaram que apesar das diferentes composições de ácidos graxos da membrana causadas pelo metabolismo anaeróbico, *B. subtilis* é capaz de se adaptar efetivamente às condições de frio, tanto em temperaturas estáveis quanto em mudanças repentinas de temperatura. Também concluíram que o mecanismo de controle da síntese da dessaturase de ácido graxo é o mesmo que em condições aeróbias, apesar do fato de que a enzima não é funcional sob condições anóxicas

Monteiro et al. (2005) observaram que nos cultivos o aumento da concentração de glicose de até 5,0 g.L⁻¹ levou a um aumento da concentração máxima de células vegetativas e esporos, enquanto em concentrações iniciais de glicose superiores a esse valor as esporulações foram inibidas. De acordo com Dauner, Storni e Sauer (2001), quando há excesso de carbono nas culturas

ocorre a redução da eficiência energética do crescimento, chamado de metabolismo de transbordamento: mudanças metabólicas do fluxo de carbono ou elétrons para vias menos eficientes e/ou uma variedade de reações de derramamento de energia.

O processo descontínuo foi alimentado com glicose para que houvesse uma maior produção de biomassa. As concentrações de açúcares redutores totais (ART) tiveram comportamento semelhante, pois a glicose se acumula gradativamente no meio por um período até atingir um valor que teve tendência de se manter, na ordem de 12,0 a 14,0 g.L⁻¹ e 6,0 a 8,0 g.L⁻¹ nos cultivos realizados a 30°C e 37°C, respectivamente. Em ambos os cultivos a osmolaridade aumentou gradativamente até cessar o processo. Inicialmente, o cultivo a 30 °C teve 0,363 Osm.kg⁻¹, e o cultivo a 37 °C teve 0,354. No final do cultivo a osmolaridade foi de 0,492 Osm.kg⁻¹ em 22 horas e 0,507 Osm.kg⁻¹ em 16 horas, respectivamente, cultivos a 30 °C e a 37 °C (Tabela 6).

Tabela 6. Osmolaridade durante os cultivos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 para produção de extrato, de 30° C e 37° C.

Tempo (horas)	Osmolaridade (Osm.kg ⁻¹)	
	30° C	37° C
0	0,363(±0,000)	0,354(±0,000)
2	0,371(±0,003)	0,403(±0,003)
4	0,401(±0,014)	0,419(±0,014)
6	0,408(±0,005)	0,446(±0,005)
8	0,430(±0,000)	0,456(±0,000)
10	0,447(±0,000)	0,461(±0,000)
12	0,465(±0,005)	0,479(±0,005)
14	0,444(±0,009)	0,488(±0,009)
16	0,459(±0,024)	0,507(±0,024)
18	0,483(±0,001)	-
20	0,488(±0,001)	-
22	0,492(±0,000)	-

Verificou-se o μ_m do *B. atrophaeus* em cultivo a 30° C (0,16 h⁻¹) e 37° C (0,40 h⁻¹) (Figura 28). O aumento da temperatura levou a um aumento substancial na velocidade específica de crescimento (150%), com conseqüente diminuição de

tempo de cultivo. Dessa forma, o extrato de *B. atrophaeus* obtido em temperatura de 37°C foi definido como padrão para experimentos futuros com lisados bacterianos.

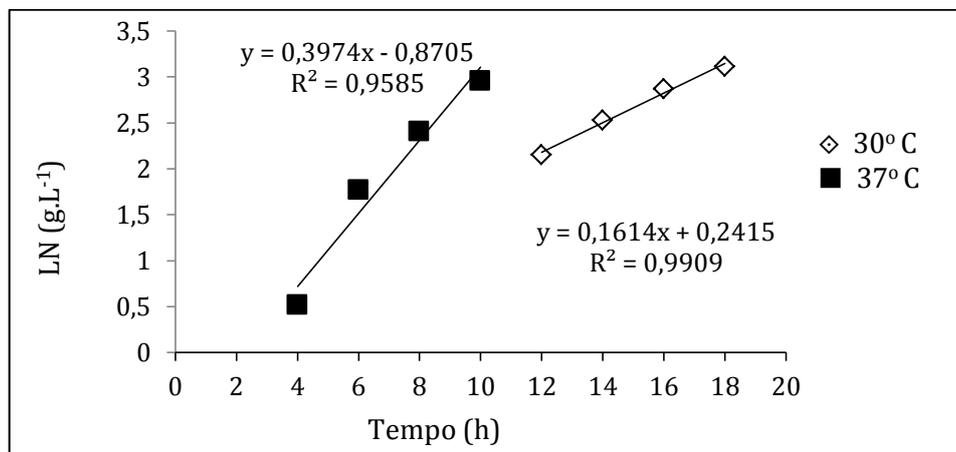


Figura. 28. Logaritmo Neperiano da concentração celular (g.L⁻¹) de *B. atrophaeus* e função do tempo para temperaturas de 30°C e 37°C.

5.3.1.1 Cultivo de *D. salina*, *H. pluvialis*, *C. vulgaris* e *A. platensis* com extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372

A biomassa de *B. atrophaeus* obtida no cultivo a 37° C foi submetida ao método físico de rompimento celular, promovido pelo atrito de pérolas de vidro, e posteriormente seca em estufa. Analisou-se a composição proximal do extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 (Tabela 7).

Tabela 7. Composição proximal do extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372.

Componente	Teor (%)
Lipídios	9,39(±2,33)
Proteínas	47,39(±0,23)
Cinzas Totais	10,68(±0,09)
Carboidratos	32,55

O extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 é constituído 9,39% de lipídios, 10,68% são cinzas totais referentes ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica, como sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês e outros compostos minerais. Possui uma porcentagem alta de carboidratos e proteínas, 32,55% e 47,39%, respectivamente. Referente à fração proteica, possivelmente houve a produção de biossurfactantes. Segundo Das Neves (2007), esses compostos podem ser produzidos em culturas de *B. subtilis* usando a glicose como substrato. Os biossurfactantes lipopeptídicos cíclicos possuem atividade antimicrobiana (surfactina, iturina e fengicina) que também reduzem a tensão superficial.

Verificou-se em cepas de microrganismos fotossintetizantes cultivadas com 0,5% de extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 o aumento da produção de biomassa, se comparada ao meio padrão, em que não se adicionou extrato (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios de concentração de *D. salina* axênica com concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ em meio f/2, em meio f/2 em co-cultura de *B.atrophaeus* e *B. pumilus* (concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹), e em meio modificado em meio f/2 com 0,5% de extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372.

Tempo (Dias)	Controle (células.mL ⁻¹)	Co-cultura (células.mL ⁻¹)	Extrato (células.mL ⁻¹)
0	$1,6 \times 10^5 (\pm 0,4)$	$1,6 \times 10^5 (\pm 0,4)$	$1,6 \times 10^5 (\pm 0,4)$
1	$2,6 \times 10^5 (\pm 0,4)$	$2,6 \times 10^5 (\pm 0,3)$	$1,3 \times 10^5 (\pm 1,3)$
2	$2,8 \times 10^5 (\pm 2,3)$	$4,0 \times 10^5 (\pm 5,0)$	-
3	$5,1 \times 10^5 (\pm 3,9)$	$7,8 \times 10^5 (\pm 7,4)$	-
4	$1,0 \times 10^6 (\pm 1,9)$	$1,1 \times 10^6 (\pm 2,4)$	-
5	-	$1,6 \times 10^6 (\pm 2,3)$	$2,5 \times 10^5 (\pm 2,5)$
6	$1,4 \times 10^6 (\pm 1,7)$	$2,4 \times 10^6 (\pm 1,7)$	-
7	-	-	$5,9 \times 10^5 (\pm 5,9)$
8	$1,1 \times 10^6 (\pm 4,1)$	$4,1 \times 10^6 (\pm 1,5)$	-
11	-	-	$1,9 \times 10^6 (\pm 1,9)$
12	$9,3 \times 10^5 (\pm 0,6)$	$2,2 \times 10^6 (\pm 1,5)$	-
15	-	-	$2,6 \times 10^6 (\pm 2,6)$
22	-	-	$7,6 \times 10^6 (\pm 1,7)$
26	-	-	$1,6 \times 10^7 (\pm 2,6)$
29	-	-	$1,4 \times 10^7 (\pm 2,6)$
33	-	-	$1,3 \times 10^7 (\pm 2,5)$

Comparou-se os crescimentos da cultura de *D. salina* em meio de cultura modificado com 0,5% de extrato de *B. atrophaeus*, com a melhor condição de co-cultura e o controle.

Obtiveram-se resultados semelhantes na cepa axênica e não axênica de *D. salina* (Figura 29), indicando a eficiência do extrato em ambos os casos, inclusive sendo verificado um aumento de concentração celular mais significativo na utilização do extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 do que na co-cultura realizada com o *B. atrophaeus* isolado no meio residual dessa cepa, em cepa axênica.

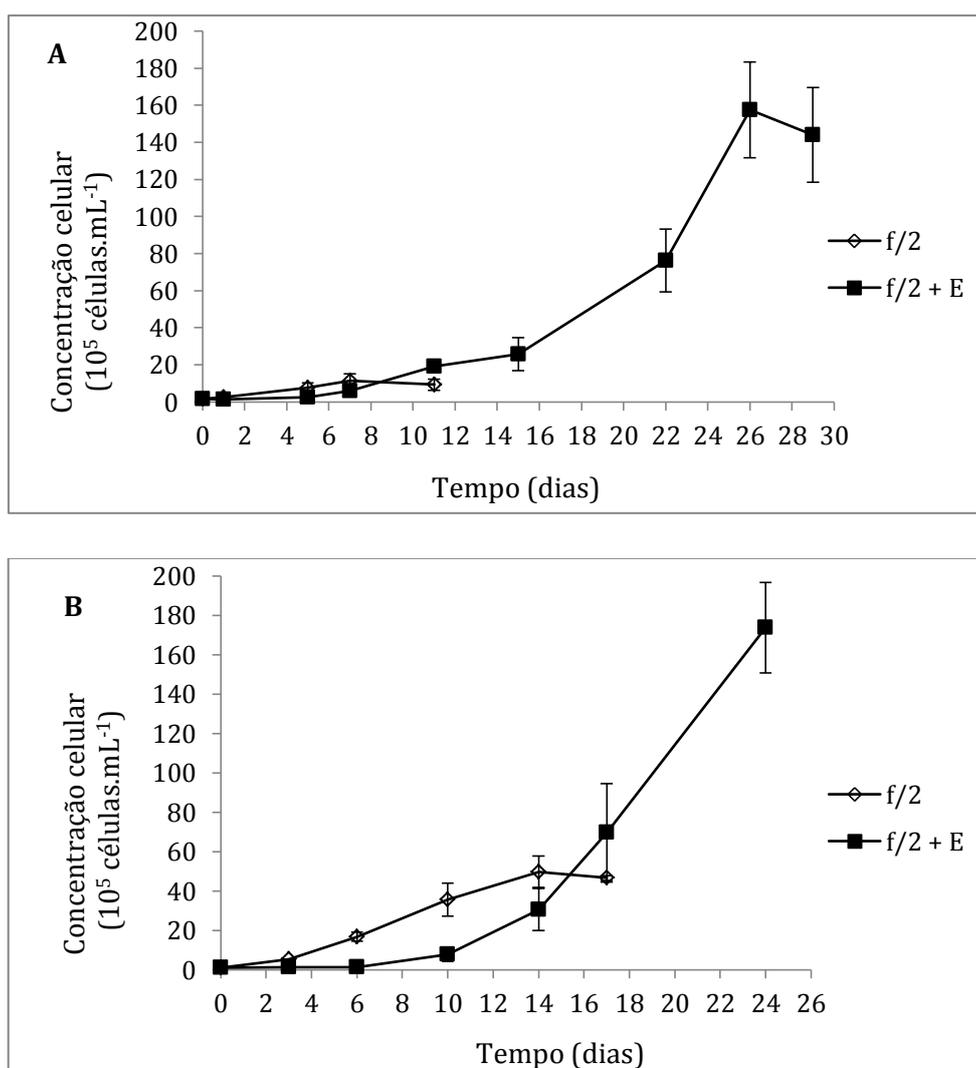


Figura 29. Curva de crescimento de *D. salina* axênica (A) e xênica (B), comparando o meio f/2 e f/2 + E (extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372) de concentração celular (células.mL⁻¹) por até 26 dias.

Como comentado anteriormente, a *D. salina* axênica em meio de cultura com extrato bacteriano chegou a concentração celular de $1,6 \times 10^7$ células.mL⁻¹, enquanto em meio de cultura padrão a concentração máxima foi $1,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹, sendo que a concentração inicial de ambas foi de $1,8 \times 10^5$ células.mL⁻¹. Nas mesmas condições, avaliou-se os cultivos de *D. salina* xênica, em meio de cultura padrão, sendo que o cultivo foi estabilizado em $5,6 \times 10^5$ células.mL⁻¹ em 14 dias, enquanto o cultivo em meio de cultura modificado (com extrato bacteriano) em 24 dias ainda não havia estabilizado, porém evidenciou crescimento superior em relação ao controle, com $1,7 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

Houve contaminação no controle da cepa axênica após a estabilização do crescimento celular (a partir do 12º dia) e o uso do extrato, além de ter estimulado o crescimento da microalga, pode ter protegido de microrganismos provenientes de contaminação. Rajaofera et al. (2018) identificaram que as estirpes de *B. atrophaeus* exibiram bioatividade significativa contra fungos patogênicos de plantas e mencionam que a cepa é promissora quanto a produção de substância antimicrobiana. Este antifúngico apresentou estabilidade térmica e ativa em uma ampla faixa de pH de 5,0 a 10,0.

Os cultivos de *D. salina* em meio padrão e em meio modificado mantiveram-se na faixa de pH entre 6,0 e 8,5. O pH inicial foi de 7,36 da cepa axênica em meio padrão e durante a fase exponencial caiu até 6,43, mas ao estabilizar a concentração celular o pH aumentou para 8,13. Avaliou-se o meio modificado, registrando um valor de pH inicial em 7,91. Já no primeiro dia houve um aumento para 8,15, seguindo de subsequente acidificação nos 22 dias seguintes de cultivo, chegando a um valor de 6,06. Posteriormente o meio voltou a alcalinizar até os 33 dias de cultivo, com pH em 7,90. O mesmo acompanhamento foi realizado com a cepa xênica, em ambos os meios houve queda até o 3º dia de cultivo do pH e posteriormente houve um crescimento seguido de estabilização. No meio f/2, o pH inicial foi de 7,36, no terceiro dia de cultivo diminuiu para 7,19, voltou a aumentar até 8,51 no sexto dia onde houve uma estabilização. Já no meio modificado, o pH inicial foi 7,91, no terceiro dia diminuiu para 6,90, voltou a aumentar até 8,31 no 14º dia de cultivo, no pH estabilizou-se até o final do cultivo (Figura 30).

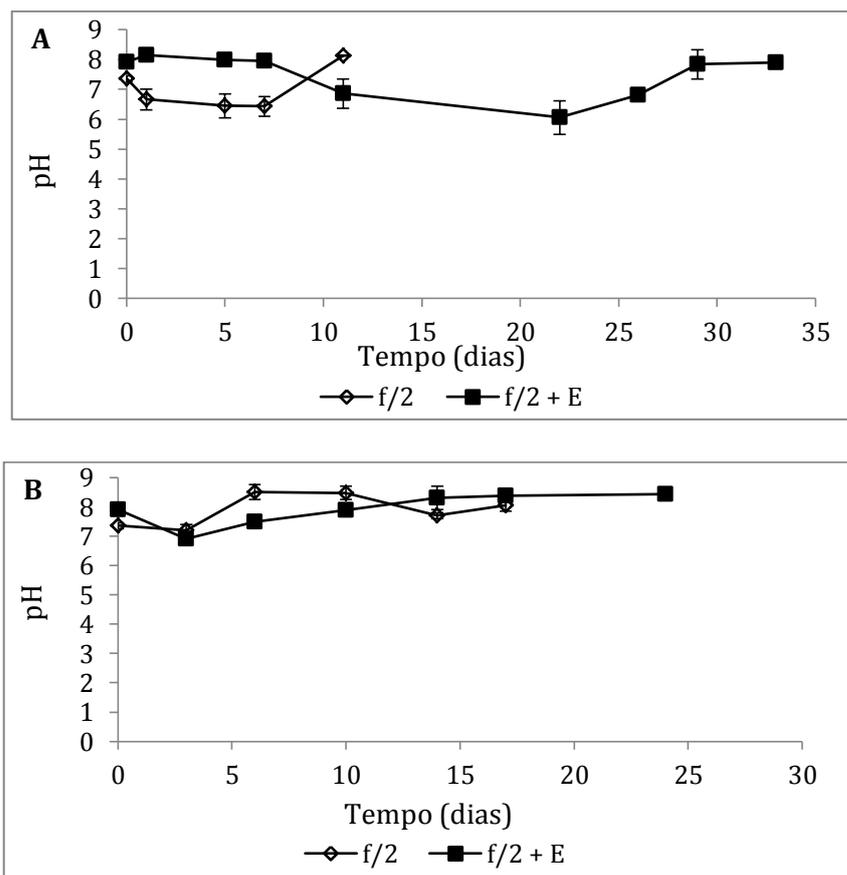


Figura 30. Valores de pH dos cultivos das cepas de *D. salina* axênica (A) e xênica (B) em meio padrão f/2 e em meio modificado (f/2 + E).

No cultivo da cepa axênica, obteve-se velocidade específica de $0,18 \text{ dia}^{-1}$ no cultivo em meio modificado, enquanto em meio padrão a velocidade foi de $0,28 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 31).

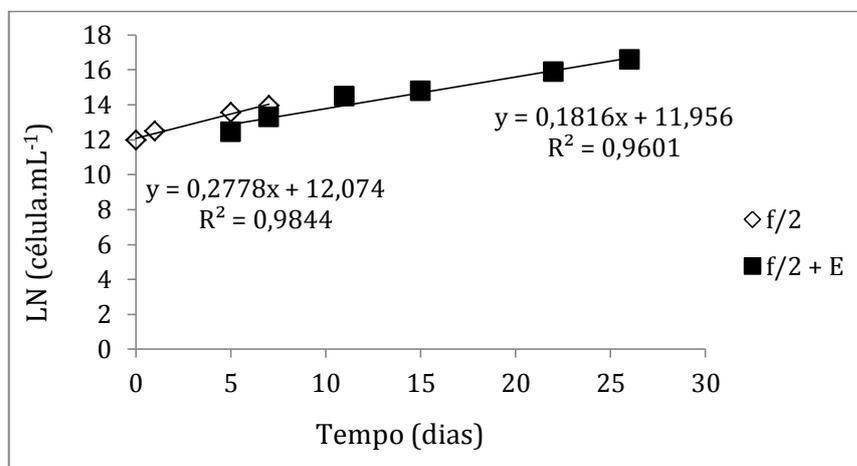


Figura 31. Velocidade específica do cultivo da cepa de *D. salina* axênica em meio padrão f/2 e em meio modificado (f/2 + E).

Já no cultivo da cepa xênica, obteve-se a velocidade específica de $0,22 \text{ dia}^{-1}$ no cultivo em meio modificado, enquanto, em meio padrão a velocidade foi de $0,20 \text{ h}^{-1}$ (Figura 32).

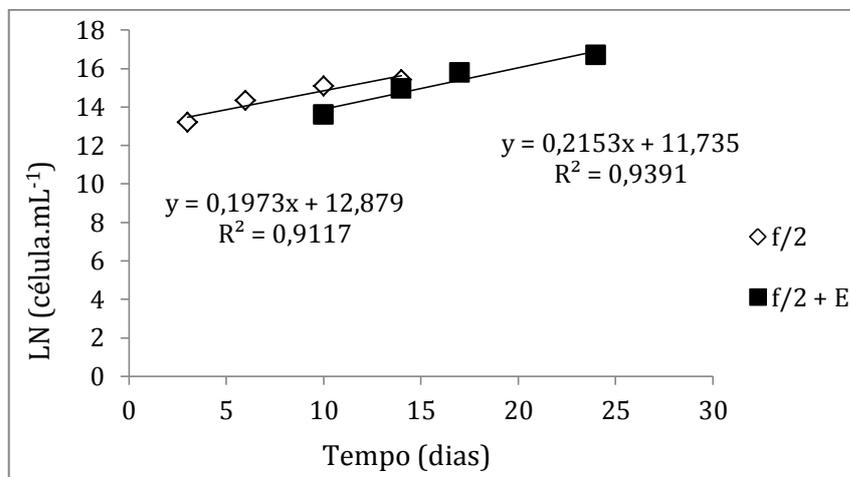


Figura 32. Velocidade específica do cultivo da cepa de *D. salina* xênica em meio padrão f/2 e em meio modificado (f/2 + E).

Ao final do cultivo, a concentração celular de *D. salina* em meio modificado foi superior do que em meio padrão tanto em cultivo axênico ($p = 0,002$), como em cultivo não axênico ($p = 0,003$).

No experimento de *C. vulgaris*, houve maior aumento da concentração celular no meio modificado (Bold + extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372) em comparação ao crescimento em meio padrão (Bold) (Figura 33) ($p = 0,002$). Esse aumento pode ser justificado devido a essa espécie possuir a capacidade de crescimento heterotrófico, bem como da presença de nutrientes orgânicos no extrato, como vitaminas, que podem ter acelerado o crescimento celular. Houve a estabilização em 17 dias de cultivo em meio padrão, no qual a concentração de biomassa atingiu $0,67 \text{ g.L}^{-1}$, e no meio modificado a concentração celular atingiu $1,55 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 dias de cultivo.

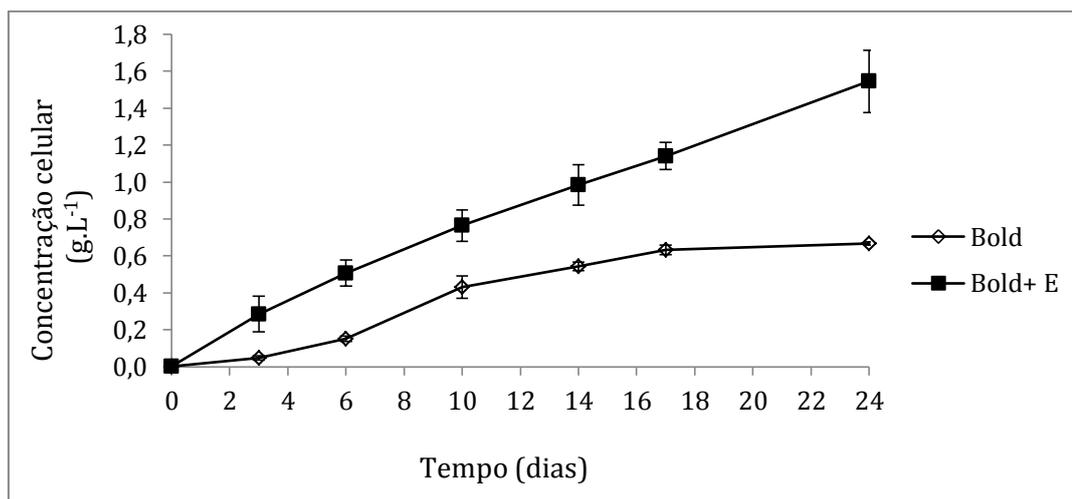


Figura 33. Curva de crescimento de *C. vulgaris* comparando o meio Bold e Bold + E (extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372).

Em relação ao valor de pH do cultivo da cepa de *C. vulgaris*, foi diferente o comportamento da cepa entre os meios. Em meio Bold, o cultivo iniciou com pH 7,38, até o terceiro dia tendeu a diminuir ao pH 7,25, porém aumentou até 10,65 no décimo quarto dia, atingindo um pH final de cultivo em 9,27 ao vigésimo quarto dia. Enquanto que, em meio modificado, o pH inicial foi de 6,73, tendeu a aumentar, mas graficamente mostrou-se estável entre 7,73 e 8,76, sendo que, ao dia 24, registrou-se o maior valor de pH que foi de 11,24 (Figura 34). Esse aumento final de valor de pH no cultivo com adição de extrato pode ter sido do uso de peptídeos do extrato como fonte de carbono, com a liberação de amônia no meio de cultivo.

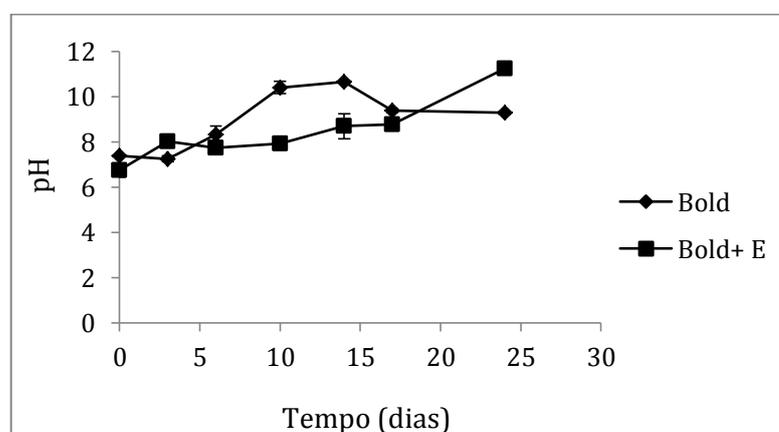


Figura 34. pH do cultivo da cepa de *C. vulgaris* em meio padrão Bold e em meio modificado (Bold + E).

No cultivo de *C. vulgaris*, obteve-se velocidade específica de crescimento de $0,06 \text{ dia}^{-1}$ no cultivo em meio modificado, enquanto que em meio padrão a velocidade foi de $0,30 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 35).

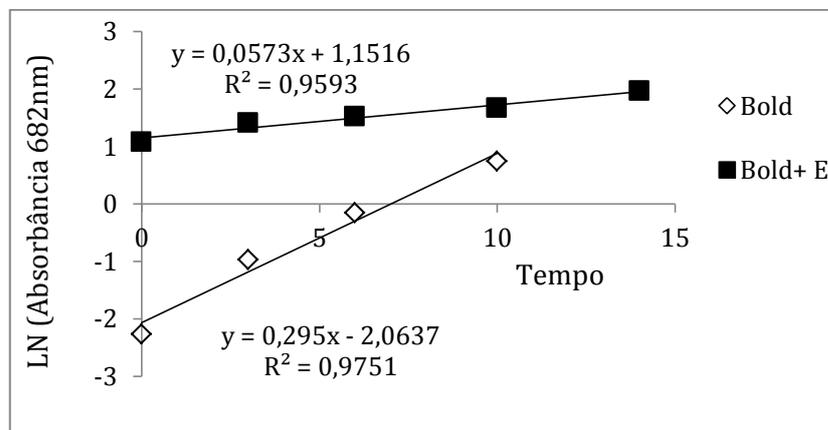


Figura 35. Velocidade específica do cultivo da cepa de *C. vulgaris* em meio padrão Bold e em meio modificado (Bold + E).

A velocidade específica da *C. vulgaris* é bem menor no meio de cultura modificado do que no meio padrão, porém a concentração celular obtida ao final do cultivo é superior quando cultivado no meio com extrato bacteriano, o que se deve ao crescimento acentuado desde o início do cultivo celular. De fato, no meio modificado não houve um aumento substancial da concentração celular por um período curto de tempo, que é refletida na inclinação da curva, como ocorreu no cultivo sem adição de extrato de *B. atrophaeus*.

As situações anteriores, dos cultivos de *D. salina* e *C. vulgaris*, também são evidenciadas visualmente. A Figura 36 demonstra que os cultivos em 24 dias das cepas xênicas de *D. salina* em meio f/2 com extrato hidrolisado bacteriano está na fase verde, enquanto em meio padrão as células do cultivo já encontravam-se em carotenogênese, na fase laranja. Isso confere a vantagem de se possibilitar o prolongamento da fase exponencial conseguindo maior concentração de biomassa e, com maior quantidade de células, também seria possível produzir maior concentração de carotenoides ao final do cultivo.

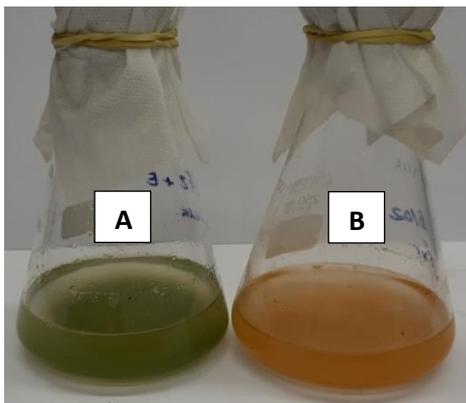


Figura 36. (A) *D. salina* na fase verde em meio f/2 modificado; (B) *D. salina* em carotenogênese no meio padrão, em 24 dias de cultivo.

Considerando uma cepa que possui fase única, foi demonstrado visualmente, através da coloração verde escura, a indicação de maior concentração celular no cultivo de *C. vulgaris* (Figura 37).

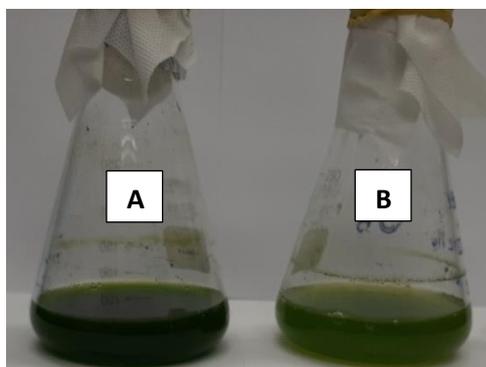


Figura 37. *C. vulgaris* cultivada em meio com extrato bacteriano (A) comparado ao meio padrão (B).

Também testou-se o meio Schlösser modificado com a adição do extrato bacteriano, em ambos os meios de cultivos, a concentração celular inicial foi de $0,17 \text{ g.L}^{-1}$.

Nos dois meios, verificou-se que a cianobactéria não teve fase lag, e o comportamento dos cultivos foi semelhante até o 10º dia. Apenas após 10 dias começaram a se diferenciar quanto ao perfil de crescimento.

Em 14 dias de cultivo, havia $1,09 \text{ g.L}^{-1}$ em meio Schlösser e, após 17 dias de cultivo, $1,41 \text{ g.L}^{-1}$ em meio Schlösser modificado (Figura 38). Este valor foi 29

% superior ao maior encontrado no cultivo padrão, mas não evidenciado estatisticamente ($p = 0,224$).

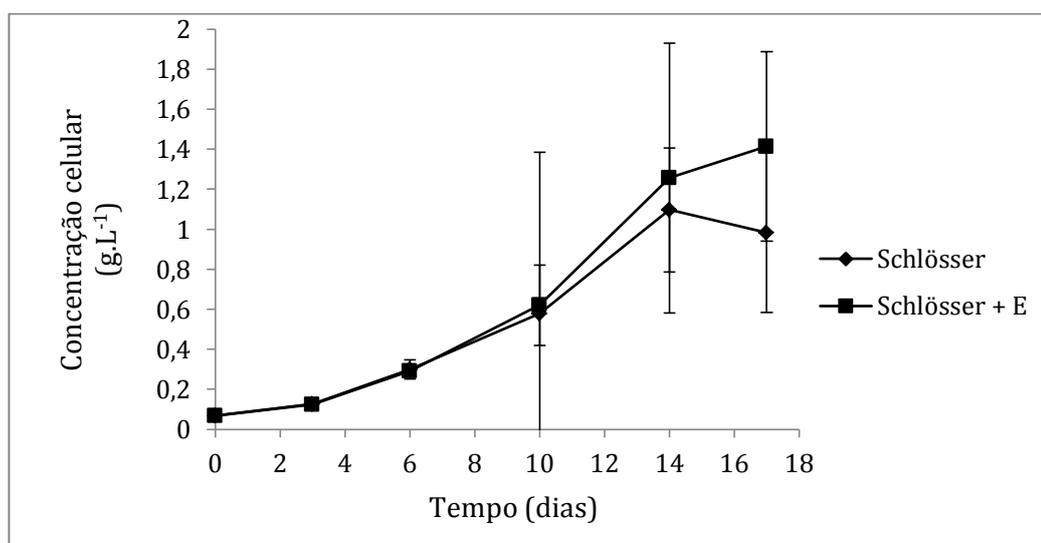


Figura 38. Curva de crescimento de *A. platensis* comparando o meio Schlösser e Schlösser + E (extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372).

Durante os 17 dias de cultivo, a comparação dos valores de pH durante o crescimento de *A. platensis* em meio Schlösser e em meio modificado, de um modo geral, não apresentaram diferenças significativas, como evidencia a Tabela 9, apresentando o comportamento clássico de cultivos de *A. platensis* sem controle de pH, que é o aumento do valor durante o crescimento celular, decorrente do consumo de bicarbonato do meio de cultivo para uso do gás carbônico no processo de fotossíntese, com estabilização em valores próximos a 11 a partir de um determinado tempo de cultivo.

Tabela 9. Valor de pH dos cultivos das cepas de *A. platensis* em meio padrão Schlösser e em meio modificado com extrato bacteriano (Schlösser + E)

Tempo (dias)	Schlösser	Schlösser + E
0	9,75±0,01	9,79±0,02
3	9,91±0,03	9,92±0,01
6	10,17±0,02	10,22±0,09
10	11,32±0,37	10,88±0,32
14	11,97±0,25	12,07±0,15
17	11,64±0,34	11,76±0,31

No cultivo de *A. platensis* obteve-se velocidade específica de crescimento máxima de $0,22 \text{ dia}^{-1}$ no cultivo em meio modificado, enquanto em meio padrão a velocidade foi de $0,18 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 39).

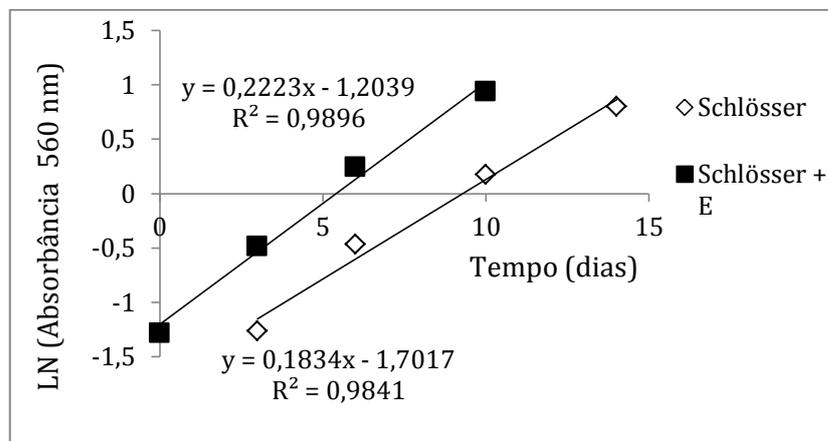


Figura 39. Velocidade específica do cultivo da cepa de *A. platensis* em meio padrão Schlösser e em meio modificado (Schlösser + E).

Em ambos os meios de cultura a concentração inicial de *H. pluvialis* foi de $1,25 \times 10^5$ células mL^{-1} de biomassa e a concentração máxima atingida no meio padrão foi $4,83 \times 10^5$ células mL^{-1} , enquanto em meio modificado (Bold + E) foi de $1,05 \times 10^6$ células mL^{-1} , valores esses muito diferentes ($p = 0,002$), representando mais que o dobro do crescimento de *H. pluvialis* quando da adição de extrato da bactéria (Figura 40).

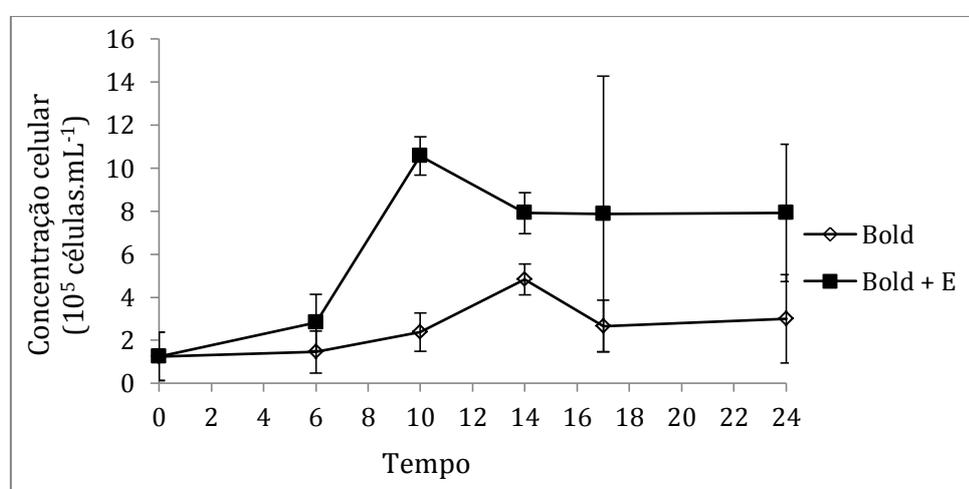


Figura 40. Curva de crescimento de *H. pluvialis* comparando o meio Bold e Bold + E (extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372).

Devido ao menor número de pontos experimentais, não foi possível estabelecer a velocidade específica do cultivo da cepa de *H. pluvialis* em meio padrão Bold e em meio modificado (Bold + E). No entanto, a visualização da Figura 40 permite inferir que a inclinação da curva de crescimento foi muito maior no cultivo com adição de extrato de *B. atrophaeus*.

O pH do cultivo de *H. pluvialis* em meio modificado manteve-se um pouco abaixo do meio padrão, porém acompanhou o perfil gráfico (Figura 41).

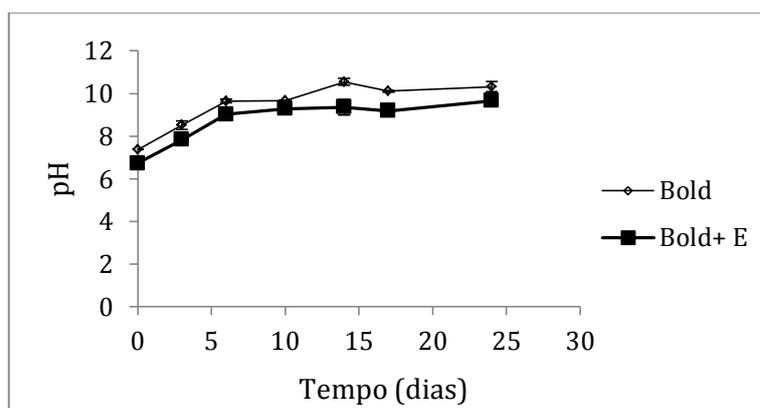


Figura 41. Valores de pH dos cultivos das cepas de *H. pluvialis* em meio padrão Bold e em meio modificado com extrato bacteriano (Bold + E).

O pH inicial em meio Bold foi de 7,38, aumentou gradualmente até o sexto dia, com pH 9,65, chegando a 10,32 em 24 dias. Enquanto em meio modificado (Bold + E), o pH inicial foi 6,73 aumentou até o dia 6 com pH 9,03 chegando a 9,66 em 24 dias

5.3.2 Extrato de *C. vulgaris* para uso como fonte de nitrogênio em cultivo de *B. atrophaeus*

5.3.2.1 Crescimento de *C. vulgaris* em fotobiorreator tubular

A *C. vulgaris* é uma microalga já utilizada como complemento alimentar, o que indica que não é um microrganismo fotossintetizante que produz toxinas. Adicionalmente, pode ser cultivada fotoautotroficamente, mixotroficamente ou heterotroficamente (LIANG; SARKANY; CUI et al., 2009; KIM et al., 2019). Devido a essas propriedades, foi a microalga escolhida para o primeiro estudo sobre o

uso de microrganismos fotossintetizantes como fonte de nitrogênio em cultivo de microrganismos heterotróficos.

Os cultivos de *C. vulgaris* foram conduzidos por processo semi-contínuo em fotobiorreator de 35 L, com fração de corte de 80% (Figura 42).

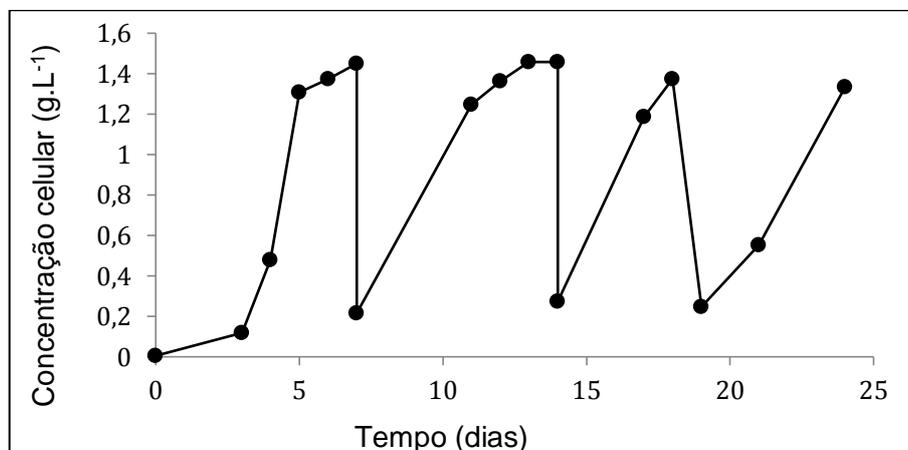


Figura 42. Concentração celular de *C. vulgaris* em função do tempo em cultivo em fotobiorreator tubular por processo semi-contínuo, com fração de corte de 80%. Foram realizados cortes nos instantes 7, 14 e 18 dias.

Os valores de concentração celular durante os ciclos do processo semi-contínuo variaram entre 0,22 g.L⁻¹ e 1,46 g.L⁻¹, e o processo se mostrou estável, sem tendência de queda de concentração celular entre um ciclo e outro.

5.3.2.2 Cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372 com extrato lisado de *C. vulgaris*

Os produtos *Single Cell Protein* (SCP) podem ser obtidos a partir de diferentes fontes microbianas, incluindo microalgas, leveduras, fungos e bactérias (JONES et al., 2020). Particularmente, pode ser destacado o valor biológico de microalgas do meio marinho, de modo que podem ser consideradas boas para serem usadas como SCP (FABREGAS; HERRER, 1985). A abordagem integrada da bioconversão pode oferecer novas possibilidades para a lucrativa produção de SCP. Em algumas operações, a produção do metabólito pode ser a principal

ração para a fermentação. Nesse sentido, o SCP produzido pode quase ser considerado um subproduto cuja venda ajuda a melhorar a economia da operação. Esse tipo de esquema faz a distinção entre biomassa microbiana cultivada primária, que se trata da biomassa produzida por si só, e da biomassa cultivada secundária, produzida como subproduto de fermentação economicamente mais significativa (TUSÉ; MILLER, 1985).

Independentemente se a biomassa microalgal é primária ou secundária, considerando a riqueza bioquímica de sua composição, é importante considerar diferentes aplicações para ela, de forma que seja ampliada a demanda por este tipo de biomassa. Nesse sentido, há trabalhos que visam sua incorporação em alimentos (BOLANHO et. al, 2014), bem como em cosméticos (ARIEDE et. al, 2017). Outra aplicação potencial seria a utilização de extrato destes microrganismos como meio de cultura, uma vez que são ricos em carboidratos, lipídios e proteínas.

Ao considerar o meio padrão (TSB), a peptona de caseína representa 85% da proteína presente no meio, e a peptona de soja de origem vegetal representa 15%. Tendo em vista a substituição dessas fontes de nitrogênio por extrato de *C. vulgaris*, foi avaliada a biomassa obtida de processo semi-contínuo (item 5.3.2.1), seja durante os cortes, ou no término do cultivo, que foi tratada de acordo com o especificado no capítulo de Materiais e Métodos (item 4.12). De modo que foram obtidas as células rompidas e secas deste microrganismo fotossintetizante, denominada extrato. O extrato da *C. vulgaris* obtido teve uma concentração de proteínas 3,5 inferior ao meio TSB. Entretanto, a quantidade de carboidratos é maior no extrato microalgal (Tabela 10). A alta concentração na porcentagem de carboidratos nos extratos sugere que poderia haver uma substituição quanto à fonte de carbono em meios de cultivo, embora tenha que ser observado o fato desse conteúdo de carboidratos estar em sua grande maioria na forma de polímeros, o que pode dificultar sua biodisponibilidade, por haver necessidade de biossíntese de enzimas de degradação pelo *B. atrophaeus* para que possa utilizá-los. Também os lipídios presentes no extrato microalgal poderiam ser utilizados como fonte de carbono para o *B. atrophaeus*, indicando que estes nutrientes poderiam contribuir para melhorar o crescimento celular.

Tabela 10. Composição proximal do meio TSB e do extrato de *C. vulgaris*

	TSB	Extrato de <i>C. vulgaris</i>
Lipídeos (%)	-	25,78(±0,98)
Proteínas (%)	49,10(±2,61)	14,03 (±0,16)
Cinzas Totais (%)	24,54(±0,39)	11,03(±0,09)
Carboidratos (%)	26,36	49,16

Sendo assim, a composição do meio de cultura com proteínas provenientes de extrato foi baseada proporcionalmente ao teor de proteínas determinado no meio TSB (Tabela 10). Verificou-se que havia 49,1% de proteínas no TSB em pó, e sabendo que na preparação do meio TSB utiliza-se 30 g dele para cada litro de meio, obtem-se a concentração de 14,7g de proteína.L⁻¹. Considerando-se que no extrato de *C. vulgaris* há um teor proteína de 14,03%, a concentração de extrato que deve ser adicionada para suprir 14,7g de proteína.L⁻¹ é 104,8g.L⁻¹ (Tabela 11).

Tabela 11. Composição do meio de cultura TSB e do meio modificado, com uso de extrato de *C. vulgaris*.

Compostos	TSB (g.L⁻¹)	Meio modificado (g.L⁻¹)
Glicose	2,5	2,5
Cloreto de sódio	5,0	5,0
Fosfato dipotássico	2,5	2,5
Peptona de caseína	17,0	-
Peptona de soja	3,0	-
Ext. <i>C. vulgaris</i>	-	104,8
Água destilada	q.s.p	q.s.p
pH (25°C)	7,3 ± 0,2	6,2 ± 0,3

Assim, testou-se o crescimento do *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio de cultivo com a fonte de proteína vinda do extrato de *C. vulgaris*, tendo como

parâmetro de comparação o crescimento desta bactéria em meio TSB, seja proveniente de pré-inóculo crescido em meio líquido TSB (TSB1) ou pré-inóculo crescido em meio sólido, em garrafa de Roux, com meio PCA (TSB2) (Figura 43).

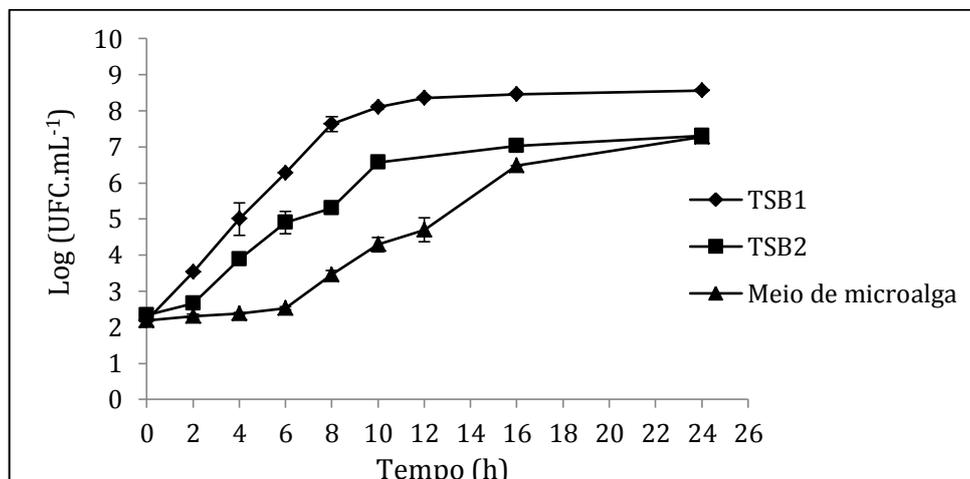


Figura 43. Crescimento de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio padrão (TSB1) e extrato lisado de *C. vulgaris*, aclimatados em meio TSB por 24 horas, e em meio padrão não aclimatado (TSB2).

Em TSB1, meio padrão no qual o *B. atrophaeus* ATCC 9372 foi pré-adaptado ao meio TSB, ao inocular uma população 10^2 UFC.mL⁻¹, a bactéria imediatamente cresceu exponencialmente até 8h de cultivo, atingindo população máxima de $3,7 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ em 24 horas, obtendo-se velocidade específica de crescimento máxima (μ_m) de $1,57 \text{ h}^{-1}$. Entretanto, na substituição das peptonas por extrato de *C. vulgaris*, a bactéria precisou de 6 horas para se adaptar, no qual cresceu exponencialmente até 12h de cultivo, e atingiu uma população máxima de $1,9 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ em 24 horas. Seu valor de μ_m foi de $1,25 \text{ h}^{-1}$.

Lousada (2018) realizou o crescimento de *B. atrophaeus* em meio f/2 e meio Bold. Ambos foram suplementados com extrato de levedura para atingirem a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹. Também, foi testado a influência de pré-inóculos de 2h e 4h para a ativação do crescimento bacteriano em TSB. As concentrações variaram de 10^2 a 10^3 UFC.mL⁻¹ em meio f/2. A utilização de pré-inóculos de 2h e 4h levaram a concentrações celulares respectivamente de $5,40 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e $1,82 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. Em meio Bold, os pré-inóculos de 2h e 4h levaram à obtenção de $7,80 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e $7,00 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, respectivamente.

Por outro lado, Lenhardt (2016) estudou o crescimento desse mesmo *Bacillus* em bagaço de laranja (5g.L^{-1}), mas com inóculo de 10^6 UFC.mL⁻¹, e, em 24h de cultivo, foi obtida a concentração celular de $1,93 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹.

O presente ensaio indicou que a substituição das peptonas do meio TSB por proteínas microalgais é uma boa alternativa, pois os crescimentos com as células não adaptadas previamente em meio TSB (experimento TSB2) e os crescimentos com extrato de *C. vulgaris* levaram a crescimentos celulares equivalentes (Figura 43) ($p = 0,513$). No entanto, em ambos os casos houve fase lag, sendo mais pronunciada no meio com extrato da microalga, o que poderia ser evitado com o crescimento prévio das células nesse meio. Quando se cultivou previamente o inóculo de *B. atrophaeus* em meio TSB (experimento TSB1), não houve fase lag de crescimento, o que se deve ao fato das células estarem previamente adaptadas ao meio antes de seu crescimento, o que pode ter proporcionado a obtenção de maior crescimento celular em comparação com o crescimento do cultivo com extrato microalgal ($p = 0,000$). No entanto, em comparação das concentrações celulares finais obtidas com o extrato microalgal e nos meios TSB, não houve diferença estatística ($p = 0,121$), reforçando a ideia que o extrato microalgal poderia ser usado como fonte de proteínas.

O pH inicial do meio de cultivo proveniente de extrato da microalga teve um valor inicial menor que os cultivos em meio TSB, e não se observou uma nítida queda de valor de pH ao longo do cultivo com o uso de extrato microalgal no meio de cultivo. Ficou muito nítida a queda do valor de pH no cultivo com crescimento do *B. atrophaeus* em meio TSB que cresceu previamente neste meio quando da obtenção do inóculo (TSB1). No entanto, quando o valor atingiu o valor de 6,09, após 10 horas de cultivo, houve uma inversão da tendência de queda. O mesmo comportamento de subida de valor de pH nos instantes finais do cultivo foi obtido no experimento TSB2 (Tabela 12). Esse mesmo tipo de comportamento foi observado nos experimentos em biorreator.

Muitas bactérias percebem o pH em seu ambiente e depois usam essas informações para direcionar seu metabolismo para produtos finais mais favoráveis. O *Bacillus subtilis* utiliza esse mecanismo de detecção de pH, e migra

preferencialmente para ambientes neutros, isto é, para produtos finais que não exercem efeito de acidificação (TOHIDIFAR et al., 2019).

Tabela 12. Valor de pH do cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio de *C. vulgaris* comparada ao TSB 1 (inóculo cultivado em meio TSB) e TSB 2 (inóculo cultivado em meio sólido com meio PCA) em 24 horas a 37° C.

Tempo (h)	TSB 1	TSB 2	Meio de <i>C. vulgaris</i>
0	7,41(±0,09)	7,05(±0,02)	6,17(±0,01)
2	6,89(±0,05)	7,03(±0,03)	5,99(±0,03)
4	6,59(±0,04)	7,08(±0,00)	5,98(±0,06)
6	6,66(±0,05)	7,07(±0,01)	5,99(±0,01)
8	6,64(±0,03)	6,98(±0,02)	5,98(±0,01)
10	6,09(±0,01)	6,33(±0,02)	6,11(±0,01)
12	6,72(±0,01)	6,80(±0,01)	6,04(±0,01)
16	6,68(±0,03)	7,00(±0,01)	5,93(±0,01)
24	6,52(±0,03)	6,95(±0,01)	5,91(±0,01)

De acordo com Gary e Bard (1952), com relação metabolismo da glicose, há dois tipos de células no cultivo de *B. subtilis*: as células C, em meio constituído de glicose e extrato de levedura, são capazes de respirar e fermentar rapidamente; as células S, em meio contendo nitrogênio inorgânico, sais e glicose, possuem apenas atividade respiratória sem capacidade fermentativa. As células C oxidam a glicose incompletamente em ácido acético, acetilmetilcarbinol, dióxido de carbono e água; anaerobicamente, é obtida uma fermentação típica do tipo homolática. As células S oxidam a glicose quase até o final com apenas traços de ácido acético, sendo os principais produtos finais dióxido de carbono e água; anaerobicamente, uma fermentação homolática também ocorre, mas em uma taxa muito lenta. A adição de aminoácidos ao meio de nitrogênio inorgânico resulta em um aumento acentuado na atividade fermentativa das células S. O aumento da tensão de oxigênio durante o crescimento resulta na perda da atividade fermentativa e no aumento simultâneo da capacidade respiratória das células C. Segundo Huang et al., 2015, o *B. atrophaeus* pode utilizar de forma muito eficiente a sacarose e glicose como fonte de carbono. Porém, Monteiro et al. (2005) demonstrou que o excesso de glicose nas fases iniciais do cultivo,

inibem o crescimento celular. Outro fator importante é a composição de aminoácidos dos microrganismos fotossintetizantes para a produção do meio ser baseada na composição de aminoácidos presentes no meio de cultura padrão. Sabendo a necessidade metabólica dos microrganismos quanto aos aminoácidos, é possível prever qual tipo de microalga é equivalente ao meio padrão já utilizado, como demonstra a Tabela 13.

Tabela 13. Quantidade de aminoácidos em gramas por 100 g de proteínas de *C. vulgaris*, *D. salina*, *H. pluvialis* e *A. platensis* comparados a soja e triptona.

Aminoácidos	<i>C. vulgaris</i> ^a	<i>D. salina</i> ^b	<i>H. pluvialis</i> ^c	<i>A. platensis</i> ^c	Soja ^d	Triptona ^e
Ácido aspártico	10,94	2,11	9,76	13,10	1,30	6,52
Treonina	6,09	1,61	5,75	6,83	4,00	3,91
Serina	7,77	N.D.	7,31	7,59	5,80	5,08
Ácido glutâmico	9,08	1,75	10,44	11,64	19,00	18,70
Glicina	8,60	1,75	9,98	8,60	4,50	1,79
Alanina	10,90	3,75	12,44	10,99	5,00	2,87
Cisteína	0,19	1,20	0,25	0,20	1,90	0,40
Valina	3,09	1,20	3,67	3,17	5,30	5,51
Metionina	0,65	1,15	0,71	1,91	1,30	2,35
Isoleucina	0,09	1,27	4,99	0,13	5,30	4,48
Leucina	7,49	1,65	8,92	7,79	7,7	7,63
Tirosina	8,44	2,13	3,08	5,35	3,20	1,86
Fenilalanina	5,81	1,51	5,42	5,34	5,0	4,09
Histidina	1,25	2,11	0,99	1,00	2,60	2,29
Lisina	6,83	2,30	6,31	5,65	6,40	6,51
Arginina	7,38	3,75	6,73	8,52	7,40	3,31
Triptofano	2,21	3,72	N/A	N/A	1,40	1,05
Ornitina	0,13	N/A	N/A	N/A	N/D	N/D
Prolina	2,97	6,63	3,24	2,16	5,30	8,65

N/D: não detectado; N/A: não avaliado; ^a SAFI et al., 2013; SHENBAGA et al., 2018; ^c SAFI et al., 2014b; ^dSAFI et al., 2014; ^e GRISP, 2016.

E assim, seria possível a substituição de peptonas nos meios de cultura para bactérias, fungos, leveduras e células animais. Segundo Fabregas e Herrer (1985), as espécies de microalgas de água doce são possíveis fontes de proteínas e comparáveis aos níveis de proteína das microalgas marinhas. Microalgas marinhas foram consideradas ricas em lisina. A lisina é o aminoácido essencial mais limitante dos cereais, mas está presente em concentrações mais elevadas na proteína animal como carne e ovos.

A concentração de lisina nas espécies de microalgas marinhas superou fontes de proteínas animais, o valor biológico dos alimentos está relacionado ao nível de lisina disponível no conteúdo proteico (FABREGAS; HERRER, 1985). Verificou-se na Tabela 13, que somente a *C. vulgaris* teve concentração de lisina superior a soja e a triptona. Além da lisina, outros aminoácidos demonstraram estar em maior concentração como: ácido aspártico, treonina, serina, glicina, alanina, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina, triptofano, ornitina. A leucina teve concentração próxima ao padrão. Enquanto ácido glutâmico, cisteína, valina, metionina, isoleucina, histidina e prolina foram inferiores.

A quantidade e a qualidade das proteínas podem ser afetadas por diferentes condições operacionais e fases de crescimento, essa evolução das variações pode dar ainda mais evidência para outros tipos de estudos de proteínas unicelulares em geral. A *D. salina* pode produzir proteínas de qualidade, inclusive para nutrição humana, independentemente do regime de luz. O regime claro/escuro apresentou maior uso da eficiência da luz sem perda de biomassa e proteína durante a fase escura, verificou-se que a aplicação de ciclismo claro/escuro com limitação de nitrogênio durante o cultivo, e colheita de biomassa na fase estacionária maximiza a produção de aminoácidos essenciais (SUI et al., 2018). Porém, de acordo com os dados da literatura, a *D. salina* apresentou concentrações superiores as fontes convencionais apenas com a tirosina, a arginina e o triptofano. A histidina tem concentração próxima, aos verificados na soja e na triptona. E o ácido aspártico e cisteína são maiores apenas em relação a soja.

A composição de aminoácidos em *H. pluvialis* no estágio vermelho indicaram que as proteínas eram compostas principalmente de ácido aspártico,

ácido glutâmico, alanina e leucina em relação ao teor total de aminoácidos (SHAH et al., 2016). E corroborou com Safi et al. (2014b), esses 4 aminoácidos foram os que apresentaram maior concentração. Comparando com a soja e a triptona, a *H. pluvialis* tem maior concentração de ácido aspártico, treonina, serina, glicina, alanina, leucina, isoleucina e fenilalanina. A tirosina teve concentração equivalente a soja, e superior a triptona. Por outro lado, a arginina teve maior concentração na microalga em relação a soja.

Ao comparar a soja e triptona com a *A. platensis*, verificou-se maior concentração de ácido aspártico, treonina, serina, glicina, alanina, tirosina, fenilalanina e arginina. A leucina é equivalente, enquanto a metionina é maior em relação a soja, mas é inferior em relação a triptona.

6 CONCLUSÕES FINAIS

A partir do meio residual do cultivo de *D. salina*, *H. pluvialis* e *A. platensis*, foi possível isolar bactérias como o *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus* e *Brevundimonas aurantiaca*. Todos os microrganismos chegaram a concentrações da ordem de 10^7 UFC.mL⁻¹ em crescimento em meio TSB. O que demonstrou que as bactérias estavam viáveis, além disso, não são patogênicas, características importantes para a utilização em processos industriais.

Em cultivos de *D. salina* realizados a $80 \mu\text{mol f\u00f3tons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, destacou-se o cultivo em co-cultura de *D. salina* com, simultaneamente, *B. pumilus* e *B. atrophaeus*, cada um com concentração inicial de 10^2 UFC.mL⁻¹, com valor de *D. salina* final de $4,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹, em 8 dias de cultivo, enquanto que no meio padrão a concentração final foi de $1,3 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em 6 dias de cultivo.

Quanto maior foi a concentração de bactéria inoculada, menor foi a velocidade específica de crescimento da *D. salina*, mas as bactérias, de um modo geral, anteciparam o crescimento da microalga e também o estenderam, levando a uma maior concentração celular final.

O extrato de *B. atrophaeus* ATCC 9372 a 0,5% promoveu o crescimento em todas as cepas testadas, principalmente na de *D. salina* axênica que atingiu $1,6 \times 10^7$ células.mL⁻¹, enquanto em meio de cultura padrão a concentração máxima foi $1,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹. E na cepa xênica, obteve-se $1,7 \times 10^7$ células.mL⁻¹ com uso do extrato da bactéria, enquanto o padrão foi $5,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Nesse meio modificado, a microalga é capaz de ficar na fase verde por mais tempo, o que possibilita o prolongamento da fase exponencial conseguindo maior concentração de biomassa e, com maior quantidade de células, também seria possível produzir maior concentração de carotenoides ao final do cultivo. A concentração máxima atingida por *H. pluvialis* no meio padrão foi $4,8 \times 10^5$ células mL⁻¹, enquanto em meio modificado (Bold + E) foi de $1,1 \times 10^6$ células mL⁻¹.

O cultivo de *C. vulgaris* em meio modificado atingiu $1,55 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto em meio padrão a concentração máxima foi de $0,67 \text{ g.L}^{-1}$. No cultivo da cianobactéria *A. platensis*, atingiu-se a concentração de $1,09 \text{ g.L}^{-1}$ em meio padrão, enquanto

em meio modificado atingiu-se a concentração celular final de $1,41 \text{ g.L}^{-1}$. O uso do extrato seco de bactéria para o crescimento microalgal, é uma boa alternativa para o melhoramento da produção de microalgas, e assim serem utilizadas amplamente na área de alimentos e cosméticos.

O cultivo do inóculo de *B. atrophaeus* em meio TSB levou a maiores crescimentos celulares do que nos cultivos que não houve a aclimação, que foi o caso dos cultivos com extrato da microalga, cujo inóculo foi obtido em meio TSB, e quando o inóculo cresceu em meio PCA, indicando a necessidade de adaptar previamente o inóculo ao meio com extrato para seu cultivo posterior neste meio.

No cultivo aclimatado ao meio TSB, a concentração máxima da bactéria foi de $3,7 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$, com μ_m de $1,57 \text{ h}^{-1}$, enquanto que com o uso de extrato da *C. vulgaris* a concentração máxima de *B. atrophaeus* foi de $1,9 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$, com μ_m de $1,25 \text{ h}^{-1}$. No entanto, a substituição das peptonas do meio TSB por extrato de *C. vulgaris* como fonte de proteínas para o cultivo de *B. atrophaeus* é uma boa alternativa, pois os crescimentos com as células não adaptadas previamente em meio TSB e os crescimentos com extrato de *C. vulgaris* levaram a crescimentos celulares equivalentes. Havendo a possibilidade de serem utilizadas na produção de vacinas e biofármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, Shady A.; PARKER, Micaela S.; ARMBRUST, E. Virginia. Interactions between Diatoms and Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1128/mnbr.00007-12.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis. 14th ed. Arlington: AOAC, 1141p, 1984.

ARIEDE, Maíra Bueno; CANDIDO, Thalita Marcílio; JACOME, Ana Lucia Morocho; VELASCO, Maria Valéria Robles; CARVALHO, João Carlos M.; BABY, André Rolim. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, [S. l.], v. 25, n. June, p. 483-487, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.019.

ATASEVER-ARSLAN, Belkis; YILANCIUGLU, Kaan; BEKAROGLU, Maide G.; TASKIN, Emre; ALTINOZ, Eyup; CETINER, Selim. Cytotoxic effect of extract from *Dunaliella salina* against SH-SY5Y neuroblastoma cells. **General physiology and biophysics**, [S. l.], v. 34, n. 2, p.201-207, 2015. DOI: 10.4149/gpb_2014034.

BA, Fatou; URSU, Alina Violeta; LAROCHE, Céline; DJELVEH, Gholamreza. *Haematococcus pluvialis* soluble proteins: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 200, p. 147–152, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.012.

BABADZHANOV, A. S.; ABDUSAMATOVA, N.; YUSUPOVA, F. M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLYMYAN, L. G.; MALIKOVA, M. Kh. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 276-279, 2004. DOI: 10.1023/B:CONC.0000039141.98247.e8.

BAGGESEN, Claus. **A Study of Microalgal Symbiotic Communities with the Aim to Increase Biomass and Biodiesel Production**. Ph.D. dissertation, DTU Chemical Engineering, Kongens Lyngby, 2014.

BAICHA, Zakarya; SALAR-GARCÍA, María José; ORTIZ-MARTÍNEZ, Víctor Manuel; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Francisco José; DE LOS RÍOS, Antonia Pérez; LABJAR, Najoa; LOTFI, E.; ELMAHI, Mohammed. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, [S. l.], v. 154, p. 104-116, 2016. DOI: 10.1016/j.fuproc.2016.08.017.

BAINES, Stephen B.; PACE, Michael L. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. **Limnology and Oceanography**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1078–1090, 1991. DOI: 10.4319/lo.1991.36.6.1078.

BARAHOEI, Malihe; HATAMIPOUR, Mohammad Sadegh; AFSHARZADEH, Saeed. CO₂ capturing by *Chlorella vulgaris* in a bubble column photo-bioreactor; Effect of bubble size on CO₂ removal and growth rate. **Journal of CO₂ Utilization**, [S. l.], v. 37, p. 9–19, 2020. DOI: 10.1016/j.jcou.2019.11.023.

BARKA, Abakoura; BLECKER, Christophe. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 20, n. 3, 2016. DOI: 10.25518/1780-4507.13132.

BECKER, Wolfgang E. **Microalgae in human and animal nutrition**. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, p.312-351, 2004.

BECKER, Wolfgang E. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 25, n. 2, p.207-210, 2007.

BEN-AMOTZ, Ami; SHAISH, Aviv; AVRON, Mordhay. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich algae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 38, n. 2-3, p. 233-235, 1991. DOI: 10.1016/0960-8524(91)90160-L.

BERANOVÁ, Jana; MANSILLA, María C.; DE MENDOZA, Diego; ELHOTTOVÁ, Dana; KONOPÁSEK, Ivo. Differences in cold adaptation of *Bacillus subtilis* under anaerobic and aerobic conditions. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 192, n. 16, p. 4164-4171, 2010. DOI: 10.1128/JB.00384-10.

BIAŁKOWSKA, Aneta M. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 32, n.12, 2016. DOI:10.1007/s11274-016-2161-x

BISCHOFF, Harry William, BOLD, Harold C. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. **Austin, Tex: University of Texas**, 1963.

BOLANHO, B. C.; EGEA, M. B.; JÁCOME, A. L. M; CAMPOS, I. CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 53, n. 2, p. 171–179, 2014.

BOLD, H.C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. v.76, n. 2, p.101-108, 1949.

BOROWITZKA, Michael A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743-756, 2013. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9.

BRANQUINHO, Raquel; MEIRINHOS-SOARES, Luís; CARRIÇO, João A.; PINTADO, Manuela; PEIXE, Luísa V. Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v.90, n. 3, p. 689–698, 2014. DOI: 10.1111/1574-6941.12426.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. Classificação de risco dos agentes biológicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 48 p., 2017.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v.9, n.15, p.1551-1558, 1995. DOI:10.1096/fasebj.9.15.8529834

BUI, Hau Huu; TRAN, Khanh Quang; CHEN, Wei Hsin. Pyrolysis of microalgae residues - A Kinetic study. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 199, p. 362-366, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.069.

CANELLI, Greta; NEUTSCH, Lukas; CARPINE, Roberta; TEVERE, Sabrina; GIUFFRIDA, Francesca; ROHFRITSCH, Zhen; DIONISI, Fabiola; BOLTEN, Christoph J.; MATHYS, Alexander. *Chlorella vulgaris* in a heterotrophic bioprocess: Study of the lipid bioaccessibility and oxidative stability. **Algal Research**, [S. l.], v. 45, p. 1-7, 2020. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101754.

CARRASCO-REINADO, Rafael; ESCOBAR, Almudena; CARRERA, Ceferino; GUARNIZO, Palmira; VALLEJO, Roberto A.; FERNÁNDEZ-ACERO, Francisco J. Valorization of microalgae biomass as a potential source of high-value sugars and polyalcohols. **Lwt**, [S. l.], v. 114, p. 1-7, 2019

CARVALHO, João C. M.; BEZERRA, Raquel P.; MATSUDO, Marcelo C.; SATO, Sunao. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch process. In: **Advanced Biofuels and Bioproducts**. [S.l.], p. 781-805, 2012. DOI: 10.1007/978-1-4614-3348-4_33.

CCUG 45020T - *Brevundimonas aurantiaca*. **Culture Collection University of Gothenburg (CCUG)**, 2001. Disponível em: <<https://www.ccug.se/strain?id=45020&s=0&p=1&sort=rel&collection=typestrains&records=25&t=Brevundimonas+aurantiaca>> Acessado em: 30 de Jun de 2020.

CEZARE-GOMES, E.A. **Evaluation of *Dunaliella salina* growth and corresponding β -carotene production in tubular photobioreactor**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2018.

CEZARE-GOMES, Eleane A.; MEJIA-DA-SILVA, Lauris del Carmen; PÉREZ-MORA, Lina S.; MATSUDO, Marcelo C.; FERREIRA-CAMARGO, Livia S.; SINGH, Anil Kumar; DE CARVALHO, João Carlos Monteiro. Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 188, n. 3, p. 602-634, 2019. DOI: 10.1007/s12010-018-02945-4.

CHEN, Hui; LAO, Yong Min; JIANG, Jian Guo. Effects of salinities on the gene expression of a (NAD⁺)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 409, n. 7, p. 1291-1297, 2011. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.12.038.

CHOI, Hee-Jeong; LEE, Seung-Mok. Effect of Temperature, Light Intensity and pH on the Growth Rate of *Chlorella Vulgaris*. **Journal of Korean Society of Environmental Engineers**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 511-515, 2011. DOI: 10.4491/ksee.2011.33.7.511.

CIFERRI, Orio. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiological Reviews**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 551-578, 1983. DOI: 10.1128/mmbr.47.4.551-578.1983.

CIFFERI, Orio; TIBONI, Orsola. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 39, n. 111, p. 503-526, 1985.

COLL, J. M. Review. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. **Spanish Journal of Agricultural Research**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 316-330, 2006. DOI: 10.5424/sjar/2006044-209.

CORNET, J.F., DUSSAP C.G., GROS, J.B. Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. In: Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, [S. l.], v. 59, 1998, Springer, Berlin, Heidelberg.

CROFT, Martin T.; LAWRENCE, Andrew D.; RAUX-DEERY, Evelyne; WARREN, Martin J.; SMITH, Alison G. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. **Nature**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1038/nature04056.

DAS NEVES, Luiz Carlos Martins; DE OLIVEIRA, Kátia Silva; KOBAYASHI, Márcio Junji; PENNA, Thereza Christina Vessoni; CONVERTI, Attilio. Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 137-140, n. 1-12, p. 539-554, 2007. DOI: 10.1007/s12010-007-9078-7.

DAUNER, Michael; STORNI, Tazio; SAUER, Uwe. *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 183, n. 24, p. 7308- 7317, 2001. DOI: 10.1128/JB.183.24.7308-7317.2001.

DE-BASHAN, Luz E.; ANTOUN, Hani; BASHAN, Yoav. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 938–947, 2008. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2008.00533.x.

DELUCCA, Robert; MCCRACKEN, Michael D. Observations on interactions between naturally-collected bacteria and several species of algae. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 55, n. 1, p.71-75, 1977. DOI: 10.1007/BF00034807.

DERNER, Roberta Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício; DE CARVALHO, Sabrina Matos; FETT, Roseane. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural**, [S. l.], v.36, n.6, p.1959-19672006. DOI: 10.1590/s0103-84782006000600050.

DINESHKUMAR, R.; NARENDRAN, R.; JAYASINGAM, P.; SAMPATHKUMAR, P. Cultivation and Chemical Composition of Microalgae *Chlorella vulgaris* and its Antibacterial Activity against Human Pathogens. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, [S. l.], v. 5, n. 3, 2017. DOI: 10.15406/jamb.2017.05.00119.

DUFOSSÉ, Laurent; GALAUP, Patrick; YARON, Anina; ARAD, Shoshana Malis; BLANC, Philippe; MURTHY, Kotamballi N. Chidambar.; RAVISHANKAR, Gokare A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 389–406, 2005. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.02.006.

DUFRENE, Yves F.; PERSAT, Alexandre. Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 227–240, 2020. DOI: 10.1038/s41579-019-0314-2.

EMBRAPA. 10. ed. **Agroenergia em Revista**. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2016. Disponível em: <
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153095/1/AgroenergiaRevistamicroalgas-ed10-red.pdf> > Acesso em: 14 de Fev. 2018.

EONSEON, Jin; LEE, Choul Gyun; POLLE, Jurgen E. W. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* Chlorophyceae: biosynthesis, regulation, and biotechnology. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 821-831, 2006.

FÁBREGAS, J.; DOMÍNGUEZ, A.; REGUEIRO, M.; MASEDA, A.; OTERO, A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v.53, n.5, p.530-535, 2000. DOI:10.1007/s002530051652

FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, v. 2, 546p., 2010.

FEKETE, Thomas. *Bacillus* species (not anthracis). **Clinical Microbiology Newsletter**, [S. l.], v. 31, n. 12, p. 87–92, 2009. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2009.05.003.

FERREIRA, Livia S.; RODRIGUES, Mayla S.; CONVERTI, Attilio; SATO, Sunao; CARVALHO, João Carlos M. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. **Biotechnology progress**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 1271–1277, 2010. DOI: 10.1002/btpr.457.

FOUILLAND, Eric; GALÈS, Amandine; BEAUGELIN, Inès; LANOUGUÈRE, Elodie; PRINGAULT, Olivier; LÉBOULANGER, Christophe. Influence of bacteria on the response of microalgae to contaminant mixtures. **Chemosphere**, [S. l.], v. 211, p. 449–455, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.161.

FRANCO, André Luiz Custódio; LÔBO, Ivon Pinheiro; DA CRUZ, Rosenira Serpa; TEIXEIRA, Cláudia Maria Luz Lapa; DE ALMEIDA NETO, José Adolfo; MENEZES, Rafael Silva. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000300015.

FUKAMI, Kimio; NISHIJIMA, Toshitaka; ISHIDA, Yuzaburo. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 358, p.185-191 1997. DOI: 10.1007/978-94-017-2097-7_29.

GANTAR, Miroslav; SVIRČEV, Zorica. Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 260-268, 2008. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2008.00469.x.

GARY, N. D.; BARD, R. C. Effect of nutrition on the growth and metabolism of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 64, n. 4, p. 501–512, 1952. DOI: 10.1128/JB.64.4.501-512.1952.

GHASEMI, Y.; AMINI, R. S.; MOROVVAT, M. H. M. Algae for the production of SCP. **Bioprocess Sciences and Technology**, [S. l.], p 164-184, 2011.

GIBBONS, Henry S. et al. Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 3, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017836.

GINZBERG, Ariel; COHEN, Merav; SOD-MORIAH, Uriel A.; SHANY, Shraga; ROSENSHTRAUCH, Avi; ARAD, Shoshana. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 12, n. 3–5, p. 325–330, 2000. DOI: 10.1023/a:1008102622276.

GÓMEZ, Liliana; VALERO, Nelson; MORALES, Ever. Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indolacético (AIA) asociadas a *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 81–88, 2012.

GONG, Mengyue; BASSI, Amarjeet. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005.

GROSSART, Hans Peter; SIMON, Meinhard. Interactions of planktonic algae and bacteria: Effects on algal growth and organic matter dynamics. **Aquatic Microbial Ecology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 163–176, 2007. DOI: 10.3354/ame047163.

GUIA PRÁTICO EM BIOSSEGURANÇA E SEGURANÇA QUÍMICA E BIOLÓGICA, **Organizado por Comissão Interna de Biossegurança, Comissão Interna de**

Segurança Química e Biológica. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2018.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of marine invertebrate animals**, [S. l.], p. 29–60, 1975.

GUJAR, Asadullah; CUI, Hungli; JI, Chunli; KUBAR; Saleem; LI, Runzhi. Development, Production and Market Value of Microalgae Products. **Applied Microbiology Open Access**, v. 5, n.162, p. 1-9, 2019. DOI: 10.35248/2471-9315.19.5.162

GUO, Zhi; TONG, Yen Wah. The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1007/s10811-013-0186-1.

HEO, Jina.; KIM, Sora.; CHO, Dae Hyun; SONG, Geon Cheol; KIM, Hee Sik; RYU, Choong-Min. Genome-wide exploration of *Escherichia coli* genes to promote *Chlorella vulgaris* growth. **Algal Research**, v. 38, 2019. DOI:10.1016/j.algal.2018.101390

HUANG, Huayi; WU, Ziqiang; TIAN, Chengming; LIANG, Yingmei; YOU, Chongjuan; CHEN, Lei. Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 1361–1371, 2015. DOI: 10.1007/s13213-014-0974-0.

HUANGFU, Jieqiong; LIU, Jin; SUN, Zheng; WANG, Mingfu; JIANG, Yue; CHEN, Zhen Yu; CHEN, Feng. Antiaging effects of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* on fruit flies under oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 32, p. 7800–7804, 2013. DOI: 10.1021/jf402224w.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.2, p.298-304, 2016. DOI:10.1016/j.bjm.2016.01.003

JONES, Shawn W.; KARPOL, Alon; FRIEDMAN, Sivan; MARU, Biniam T.; TRACY, Bryan P. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 61, p. 189–197, 2020. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.12.026.

JU, Zhi Yong; DENG, Dong Fang; DOMINY, Warren. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). **Aquaculture**, v. 354-355, p. 50-55, 2012. DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.04.028

KARMAKAR, Arjun; PETER, Jyotsna Kiran; SINGLA, Ankit; RAISAGAR, Anita. Isolation, Identification and Screening of *Enterobacter cloacae* KY231211 and *Brevundimonas aurantiaca* KY231210 for Biosurfactant Production. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 04, p. 2328-2338, 2019. DOI: 10.20546/ijcmas.2019.804.272.

KHANEJA, R. et al. Carotenoids found in *Bacillus*. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 108, n. 6, p. 1889-1902, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x.

KIM, Dong Yeon; VIJAYAN, Durairaj; PRAVEENKUMAR, Ramasamy; HAN, Jong In; LEE, Kyubock; PARK, Ji Yeon; CHANG, Won Seok; LEE, Jin Suk; OH, You Kwan. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 199, p. 300–310, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.107.

KIM, Ji Hyung et al. Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 238–246, 2015. DOI: 10.4014/jmb.1410.10032.

KIM, Hee Su; PARK, Won Kun; LEE, Bongsoo; SEON, Gyeongho; SUH, William I.; MOON, Myoungsoon; CHANG, Yong Keun. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. HS₂ using screening, statistical assessment, and validation. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-55854-9.

KOUZUMA, Atsushi; WATANABE, Kazuya. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, 2015. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.02.007.

LAKANIEMI, Aino Maija; INTIHAR, Veera M.; TUOVINEN, Olli H.; PUHAKKA, Jaakko A. Growth of *Dunaliella tertiolecta* and associated bacteria in photobioreactors. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1357–1365, 2012.

LE CHEVANTON, Myriam; GARNIER, Matthieu; BOUGARAN, Gaël.; SCHREIBER, Nathalie; LUKOMSKA, Ewa; BÉRARD, Jean-Baptiste ; FOUILLAND, Eric; BERNARD, Olivier; CADORET, Jean Paul. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. **Algal Research**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 212–222, 2013. DOI: 10.1016/j.algal.2013.05.003.

LEE, Changsu; JEON, Min Seo; KIM, Joon Yong; LEE, Se Hee; KIM, Dae Geun; ROH, Seong Woon; CHOI, Yoon E. Effects of an auxin-producing symbiotic bacterium on cell

growth of the microalga *Haematococcus pluvialis*: Elevation of cell density and prolongation of exponential stage. **Algal Research**, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101547.

LIANG, Yanna; SARKANY, Nicolas; CUI, Yi. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 1043–1049, 2009. DOI: 10.1007/s10529-009-9975-7.

LENHARDT, Elizandra Hertel. **Avaliação da produção e viabilidade de esporos de *Bacillus atropheus* ATCC 9372 utilizando resíduos do processamento de suco de laranja**. 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. DOI:10.11606/D.9.2016.tde-12082016-091342

LOPEZ, Haydee; MAGDALENO, Dante; STEPHANO, Jose. The complete chloroplast genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, [S. l.], v.2, n.1, p.225-226, 2017. DOI: 10.1080/23802359.2017.1310610.

LOUSADA, Maria Eduarda Gonçalves. **Avaliação da viabilidade e resistência térmica de esporos de *Bacillus atropheus* ATCC 9372 obtidos a partir de meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. DOI:10.11606/D.9.2018.tde-18122018-171240

LUTEIN MARKET Global Forecast to 2022, GlobeNewswire, **Research and Market**, 2018. Disponível em: < <https://www.globenewswire.com/news-release/2018/06/01/1515530/0/en/Lutein-Market-Global-Forecast-to-2022.html> > Acesso em: 14 de Jun. 2020.

LUTZU, Giovanni Antonio; DUNFORD, Nurhan Turgut. Interactions of microalgae and other microorganisms for enhanced production of high-value compounds. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1487–1504, 2018. DOI: 10.2741/4656.

MAGDOULI, S.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Co-culture for lipid production: Advances and challenges. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 92, p. 20–30, 2016. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.06.003.

MAI, Truc; NGUYEN, Phuc; VO, Trung; HUYNH, Hieu; TRAN, Son; NIM, Tran; TRAN, Dat; NGUYEN, Hung; BUI, Phung. Accumulation of lipid in *Dunaliella salina* under

Nutrient Starvation Condition. **American Journal of Food and Nutrition**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 58–61, 2017. DOI: 10.12691/ajfn-5-2-2.

MANDRYK, Maryna N.; KOLOMIETS, Emily L.; DEY, Estera. S. Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 245-250, 2007.

MAURYA, Rahulkumar; PALIWAL, Chetan; CHOKSHI, Kaumeel; PANCHA, Imran; GHOSH, Tonmoy; SATPATI, Gour Gopal; PAL, Ruma; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Hydrolysate of lipid extracted microalgal biomass residue: An algal growth promoter and enhancer. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 207, p. 197–204, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.018.

MCCLURE, Dale D.; NIGHTINGALE, Jonathan K.; LUIZ, Audrey; BLACK, Sachin; ZHU, Jingyuan; KAVANAGH, John M. Pilot-scale production of lutein using *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, [S. l.], v. 44, n. November, p. 101707, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101707.

MONTEIRO, Sandra M.; CLEMENTE, João J.; HENRIQUES, Adriano O.; GOMES, Rui J.; CARRONDO, Manuel J.; CUNHA, António E. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 1026–1031, 2005. DOI: 10.1021/bp050062z.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3949–3964, 2008. DOI:10.1016/j.biortech.2007.05.040

MOROCHO-JÁCOME, Ana Lucía; MASCIOLI, Guilherme Favaro; SATO, Sunao; DE CARVALHO, João Carlos Monteiro. Ferric chloride flocculation plus carbon adsorption allows to reuse spent culture medium of *Arthrospira platensis*. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1002/elsc.201400040.

MUJTABA, Ghulam; LEE, Kisay. Advanced treatment of wastewater using symbiotic co-culture of microalgae and bacteria. **Applied Chemistry for Engineering**, v. 27, n. 1, 2016. DOI: 10.14478/ace.2016.1002.

MUÑOZ, Raul; GUIEYSSE, Benoit. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, [S. l.], v. 40, n. 15, p. 2799–2815, 2006. DOI: 10.1016/j.watres.2006.06.011.

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. **Chapter 2. Cyanobactéria in the environment.** In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, 1999.

NAKAMURA, L. K. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 295–300, 1989. DOI: 10.1099/00207713-39-3-295.

NAKANO, Michiko M.; ZUBER, Peter. “ Strict Aerobe ” (*Bacillus Subtilis*). **Annual Reviews of Microbiology**, [S. l.], v. 52, p. 165–1990, 1998. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.165.

NARVÁEZ-ZAPATA, Alberto A.; ROJAS-HERRERA, Rafael; LÓPEZ-UC, Yamilka; SÁNCHEZ-ESTUDILLO, Leticia. Different physiological responses influenced by salinity in genetically related *Dunaliella salina* isolates. **Biotechnology Letters**, 2011. DOI: 10.1007/s10529-011-0599-3.

NATRAH, Fatin M. I.; BOSSIER, Peter; SORGELOOS, Patrick; YUSOFF, Fatimah Md; DEFOIRDT, Tom. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 48–61, 2014. DOI: 10.1111/raq.12024.

NEMTSEVA, N. V.; SELIVANOVA, E. A.; IGNATENKO, M. E.; SHARAPOVA, N. V. Characterization of a novel *Dunaliella salina* (Chlorophyta) strain and the assessment of its cultivation parameters. **Russian Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 529–535, 2013. DOI: 10.1134/S1021443713040092.

NOGAROTO, Sérgio Luiz; VESSONI PENNA, Thereza Christina. **Desinfecção e esterilização**. Editora: Atheneu, [S.l: s.n.], 2006.

NOVOVESKÁ, Lucie; ROSS, Michael E.; STANLEY, Michele S.; PRADELLES, Rémi; WASIOLEK, Virginie; SASSI, Jean François. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1–21, 2019. DOI: 10.3390/md17110640.

OLGUÍN, Eugenia J.; GALICIA, Sonia; ANGULO-GUERRERO, Ofelia; HERNÁNDEZ, Elizabeth. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 19–24, 2001. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00142-5.

PADMAPERUMA, Gloria; KAPOORE, Rahul Vijay; GILMOUR, Daniel James; VAIDYANATHAN, Seetharaman. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-

cultures for enhanced biomanufacturing. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 690–703, 2018. DOI: 10.1080/07388551.2017.1390728.

PALACIOS, Oskar A.; LOPEZ, Blanca R.; BASHAN, Yoav; DE -BASHAN, Luz E. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the Bacterium *Azospirillum brasilense*. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 980–992, 2019. DOI: 10.1007/s00248-018-1282-1.

PANIAGUA-MICHEL, J.; OLMOS-SOTO, Jorge; RUIZ, Manuel Acosta. **Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae**. In: *Methods in Molecular Biology*, [S. l.], 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-879-5_1.

PAUL, Carsten; POHNERT, Georg. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: Regulated protease excretion for specific algal lysis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. e21032:1-6, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021032.

PELIZER, Lúcia Helena; DE CARVALHO, João Carlos Monteiro; DE OLIVEIRA MORAES, Iracema. Protein production by *Arthrospira (Spirulina) platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. **Biotechnology Reports**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1016/j.btre.2014.12.006.

PERSISTENCE MARKET RESEARCH. **Global Market Study on Microalgae: North America to be Largest Market for Microalgae during 2017 to 2026**. Microalgae Market, 2018. <Disponível em: <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/microalgae-market.asp> > Acesso em: 14 de Jun. 2020.

PICK, Uri. The respiratory inhibitor antimycin A specifically binds Fe(III) ions and mediates utilization of iron by the halotolerant alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). **BioMetals**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 79–86, 2004. DOI: 10.1023/A:1024480720962.

PIMENTEL, I. C.; DIONÍSIO, J. A.; SIGNOR, D.. **Capítulo III: Bactérias**, Guia Prático de Biologia do Solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Núcleo Estadual do Paraná, 152p., Curitiba: SBCS/NEPAR, 2016.

PIORRECK, Margret; BAASCH, Klaus Hinnerk; POHL, Peter. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 207–216, 1984. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80304-0.

PRIETO, Ana; PEDRO CAÑAVATE, J.; GARCÍA-GONZÁLEZ, Mercedes. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation

regimes. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 151, n. 2, p. 180–185, 2011. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.11.011.

PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004. DOI: 10.1007/s00253-004-1647-x.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA; E. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. Ed. – Rio de Janeiro : Montenegro Comunicação, 160p, 2015.

RABINOVITCH, Leon; SILVA, Sônia Maria da. Estudos sobre a esporulação de uma amostra de *Bacillus*: III - Influência da concentração da glicose sobre o início da esporogênese. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**. v.71, n. 1-2, p.115-121, 1973, DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761973000100007>.

RAHMAN, K. M. **Food and High Value Products from Microalgae: Market Opportunities and Challenges**. In: Alam M., Xu JL., Wang Z. (eds) *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, Springer, Singapore, 2020.

RAJAOFERA, M. J. N. et al. Antifungal activity of the bioactive substance from *Bacillus atrophaeus* strain HAB-5 and its toxicity assessment on *Danio rerio*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 147, p. 153–161, 2018. DOI: 10.1016/j.pestbp.2017.06.006.

RAMANAN, Rishiram; KIM, Byung Hyuk; CHO, Dae Hyun; OH, Hee Mock; KIM, Hee Sik. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. v. 34, n. 1, p.14-29, **Biotechnology Advances**, 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003.

RAMARAJ, R.; UNPAPROM, Y.; DUSSADEE, N. Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. **International Journal of New Technology and Research (IJNTR)**, v. 2, n. 3, p. 117-122, 2016.

RAMÍREZ-MÉRIDA, Luis Guillermo; RAGAGNIN DE MENEZES, Cristiano; ZEPKA, Leila Queiroz; JACOB-LOPES, Eduardo. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados Microalgas: potencial para a produção de compostos bioativos nanoencapsulados. **Centro de Ciências Naturais e Exatas UFSM**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 7–17, 2015. DOI: 10.5902/2179-460X19690.

Dissertação de Mestrado - Évellin do Espírito Santo

RANGEL-YAGUI, C.O.; DANESI, E.D.G.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**. v.92, p.133-141, 2004.

RATLEDGE, C.; EVANS, C. T. **Lipids and their metabolism**. In Rose, A H.; Harrison, J. S. The yeasts: Metabolisms and Physiology of yeast, v. 3, 2nd ed., Academic Press, Oxford, UK, 1989.

RESEARCH AND MARKETS, **Global Astaxanthin Market - Sources, Technologies and Application**, 2015. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/3129287/global-astaxanthin-arketsources-technologies#pos-0>>. Acessado em: 30 de Mai 2020

RICHMOND, A. (Ed). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC, 528p, 1990.

RIVAS, Mariella O.; VARGAS, Pedro; RIQUELME, Carlos E. Interactions of *Botryococcus braunii* Cultures with Bacterial Biofilms. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 628–635, 2010. DOI: 10.1007/s00248-010-9686-6.

RUSSEL, J.B. **Química Geral**. São Paulo. McGraw-Hill do Brasil, 897p., 1982.

SAFI, Carl; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 35, p. 265–278, 2014a. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007.

SAFI, Carl; CHARTON, Michael; URSU, Alina Violeta; LAROCHE, Céline; ZEBIB, Bachar; PONTALIER, Pierre Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. **Algal Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 55–60, 2014b. DOI: 10.1016/j.algal.2013.11.017.

SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; SILVESTRE, F.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P.Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Applied Phycology**, v.25, n. 2, p.523-529, 2012. DOI:10.1007/s10811-012-9886-1

SATHASIVAM, Ramaraj; KI, Jang Seu. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 16, n. 1, 2018. DOI: 10.3390/md16010026.

SCHALLMEY, Marcus ; SINGH, Ajay; WARD, Owen P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n.1, p. 1-17, 2004. DOI:10.1139/w03-076

SHELLEKENS, H. When biotech proteins go off-patent. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 406–410, 2004. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.06.003.

SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von Algenkulturen. **Ber. Deutsm. Bot. Ges. Bd.** v. 95, p. 181-276, 1982.

SCHWENK, Dagmar; NOHYNEK, Liisa; RISCHER, Heiko. Algae-bacteria association inferred by 16S rDNA similarity in established microalgae cultures. **MicrobiologyOpen**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1002/mbo3.175.

SCOTTA, C.; BENNASSAR, A.; MOORE, E. R. B.; LALUCAT, J.; GOMILA, M. Taxonomic characterisation of ceftazidime-resistant *Brevundimonas* isolates and description of *Brevundimonas faecalis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 6, p.408-413, 2011. DOI:10.1016/j.syapm.2011.06.001

SELLA, Sandra R. B. R.; VANDENBERGHE, Luciana P. S.; SOCCOL, Carlos Ricardo. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 169, n. 12, p. 931–939, 2014a. DOI: 10.1016/j.micres.2014.05.001.

SELLA, Sandra R. B. R.; VANDENBERGHE, Luciana P. S.; SOCCOL, Carlos Ricardo. *Bacillus atrophaeus*: Main characteristics and biotechnological applications – A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2014b. DOI: 10.3109/07388551.2014.922915.

SFORZA, Eleonora; PASTORE, Martina; SANTEUFEMIA SANCHEZ, Sergio; BERTUCCO, Alberto. Bioaugmentation as a strategy to enhance nutrient removal: Symbiosis between *Chlorella protothecoides* and *Brevundimonas diminuta*. **Bioresource Technology Reports**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.biteb.2018.10.007.

SHAH, Md Mahfuzur R.; LIANG, Yuanmei; CHENG, Jay J.; DAROCH, Maurycy. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 7, n. APR2016, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00531.

SHENBAGA, Devi; SANTHANAM, Perumal; SELVAKUMARAM, Jeyanthi; KRISHNAVENI, N. Isolation, Culture, and Application of Marine Microalga *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyceae) as an Aqua Feed Additive. **Basic and Applied Phytoplankton Biology**, p.123–161, 2018. DOI:10.1007/978-981-10-7938-2_6

SHIVAJI, S.; CHATURVEDI, P.; SURESH, K.; REDDY, G. S. N.; DUTT, C. B. S.; WAINWRIGHT, M.; NARLIKAR, J. V.; BHARGAVA, P. M. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 56, n. 7, p. 1465–1473, 2006. DOI: 10.1099/ij.s.0.64029-0.

SINGH, Pritika; BARANWAL, Manoj; REDDY, Sudhakara M. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 54, n. 10, p. 2269–2275, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2016.1153660.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal Biological Chemistry**, v.195, p.19-23, 1952

SOUSA, C. T. **Produção de biomassa de *Bacillus* sp. RAB por fermentação submersa**. Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Fortaleza, 2013.

SRINIVASAN, Ramachandran; MAGESWARI, Anbazhagan; SUBRAMANIAN, Parthiban; SUGANTHI, Chandrasekaran; CHAITANYAKUMAR, Amballa; ASWINI, Velmurugan; GOTHANDAM, Kodiveri Muthukalianan. Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25417-5.

SUBASHCHANDRABOSE, Suresh R.; RAMAKRISHNAN, Balasubramanian; MEGHARAJ, Mallavarapu; VENKATESWARLU, Kadiyala; NAIDU, Ravi. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v.29, n. 6, p.896-907, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.009.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. **The Genus *Bacillus*—Nonmedical**. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY, 2006. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_16

SUI, Yixing; MUYS, Maarten; VERMEIR, Pieter; D'ADAMO, Sarah; VLAEMINCK, Siegfried E. Light regime and growth phase affect the microalgal production of protein quantity and quality with *Dunaliella salina*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 275, p. 145–152, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.12.046.

TAFRESHI, A. H; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 107, n. 1, p. 14–35, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x.

TAVALLAIE, S., EMTYAZJOO, M.; ROSTAMI, K; KOSARI, H.; ASSADI, M. M. Comparative Studies of β -carotene and Protein Production From *Dunaliella salina* Isolated From Lake Hoze-soltan, Iran. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 24, n.1, p.79-90, 2015. DOI:10.1080/10498850.2012.759634

TOHIDIFAR, Payman; PLUTZ, Matthew J.; ORDAL, George W.; RAO, Christopher V. The mechanism of bidirectional pH taxis in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 202, n. 4, p. 217–244, 2020. DOI: 10.1128/JB.00491-19.

TOMASELLI, L.; BOLDRINI, G.; MARGHERI, M. C. Physiological behaviour of *Arthrospira (Spirulina) maxima* during acclimation to changes in irradiance. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 37–43, 1997. DOI: 10.1023/A:1007956210329.

TONCHEVA-PANOVA, T.; IVANOVA, J. A bacterial pathogen of *Rhodella reticulata*. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v.83, p.707–711 1997. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1997.00298.x.

TORO, Claudio; REDDY, Murali M.; NAVIA, Rodrigo; RIVAS, Mariella; MISRA, Manjusri; MOHANTY, Amar K. Characterization and Application in Biocomposites of Residual Microalgal Biomass Generated in Third Generation Biodiesel. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 944–951, 2013. DOI: 10.1007/s10924-013-0609-8.

TORZILLO, G.; PUSHPARAJ, B.; BOCCI, F.; BALLONI, W.; MATERASSI, R.; FLORENZANO, G. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. **Biomass**, v.11, n.1, p. 61-74, 1986. DOI:10.1016/0144-4565(86)90021-1

TUSE, Daniel.; MILLER, M. W. Single-cell protein: current status and future prospects. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition** [S. l.], v. 19, n. 4, p. 273-325, 1984.

UMMALYMA, Sabeela Beevi; MATHEW, Anil K.; PANDEY, Ashok; SUKUMARAN, Rajeev K. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 213, p. 216–221, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.114.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. 179 f. Tese (Doutorado em Engenharia

Química na Sub-área de Biotecnologia) – Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VALDUGA, Eunice; TATSCH, Pihetra Oliveira; TIGGEMANN, Lídia; TREICHEL, Helen; TONIAZZO, Geciane; ZENI, Jamile; DI LUCCIO, Marco; FÚRIGO, Agenor. Carotenoids production: Microorganisms as source of natural dyes. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000900036.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLEAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v.31, n.4, p. 233-239, 2013. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.005

VETTATH, V. K., JUNQUEIRA, A., UCHIDA, A., PURBOJATI, R. W., HOUGHTON, J., CHÉNARD, C., SCHUSTER, S. C. Complete Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* Type Strain SGAir0031 Isolated from Tropical Air Collected in Singapore. **Genome announcements**, v.5, p. e01260-17, 2017.

VESSONI PENNA, Thereza Christina; MARQUES, Marcelo; MACHOSHVILI, Irena A.; ISHII, Marina. The effect of composition of parenteral solution on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* spores. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 98–100, p. 539–551, 2002. DOI: 10.1385/ABAB:98-100:1-9:539.

VU, Chau Hai Thai; LEE, Hyung Gwan; CHANG, Yong Keun; OH, Hee Mock. Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, 2018. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.018.

WAYAMA, Marina; OTA, Shuhei; MATSUURA, Hazuki; NANGO, Nobuhito; HIRATA, Aiko; KAWANO, Shigeyuki. Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0053618.

WICHUK, Kristine; BRYNJÓLFSSON, Sigurður; FU, Weiqi. Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae. **Bioengineered**, [S. l.], v. 5, n. 3, 2014. DOI: 10.4161/bioe.28720.

WILD, K. J.; TRAUTMANN, A.; KATZENMEYER, M.; STEINGAß, H.; POSTEN, C.; RODEHUTSCORD, M. Chemical composition and nutritional characteristics for ruminants of the microalgae *Chlorella vulgaris* obtained using different cultivation conditions. **Algal Research**, v. 38, 2019. DOI:10.1016/j.algal.2018.101385

YAMAMOTO, Maki; KURIHARA, Ippei; KAWANO, Shigeyuki. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, *Trebouxiophyceae*). **Planta**, [S. l.], v. 221, n. 6, p. 766–775, 2005. DOI: 10.1007/s00425-005-1486-8.

YE, Zhi Wei; JIANG, Jian Guo; WU, Guang Hong. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 352–360, 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.03.004.

YING, K.; GILMOUR, D. J.; ZIMMERMAM, W. B. Effects of CO₂ and pH on Growth of the Microalga *Dunaliella salina*. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v.6, n.3, 2014. DOI: 10.4172/1948-5948.1000138

ZHANG, Bing; LI, Wei; GUO, Yuan; ZHANG, Zhiqiang; SHI, Wenxin; CUI, Fuyi; LENS, Piet N. L.; TAY, Joo Hwa. Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 118, p. 109563, 2020. DOI: 10.1016/j.rser.2019.109563.

ZHANG, Wenduo; WANG, Junfeng; WANG, Jialin; LIU, Tianzhong. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 158, p. 329–335, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.044.

ZHANG, Xinxin; TANG, Xuexi; ZHOU, Bin; HU, Shunxin; WANG, You. Effect of enhanced UV-B radiation on photosynthetic characteristics of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 469, p. 27–35, 2015. DOI: 10.1016/j.jembe.2015.04.002.

ZHOU, Si Yu.; HU, Yi Jie; MENG, Fan-Cheng; QU, Shen-Yue; WANG, Rui; ANDERSEN, Raymond; LIAO, Zhi-Hua; CHEN, Min. Bacillamidins A–G from a Marine-Derived *Bacillus pumilus*. **Marine Drugs**, v.16, n. 9, 2018. DOI:10.3390/md16090326

APÊNDICE

APÊNDICE A – Soluções para a manutenção dos esporos para as cepas de *Bacillus*

A.1 Preparo da solução de acetato de cálcio 0,02 M

Dissolveu-se 3,51 de acetato de cálcio em 1L de água destilada, a solução foi autoclavada a 121° C por 15 minutos e armazenada sob refrigeração a 8° C até o momento do uso.

A.2 Preparo da solução de hidróxido de cálcio 0,14% (p/v)

Dissolveu-se 1,4g de hidróxido de cálcio em 1L de água destilada, a solução foi autoclavada a 121° C por 15 minutos e armazenada sob refrigeração a 8° C até o momento do uso

APÊNDICE B – TÉCNICAS DE COLORAÇÃO MICROBIANA

B.1 Técnica de coloração de Gram

A lâmina foi preparada com o auxílio de uma alça de platina, para a fixação do esfregaço utilizou-se o calor da chama do bico de Bunsen. Cobriu-se o esfregaço com corante violeta de genciana aguardando por 1 minuto em seguida o esfregaço foi lavado com água destilada, cobriu-se o esfregaço com lugol por 1 minuto em seguida lavou-se novamente com água destilada então o esfregaço foi coberto com álcool acetona (1:1) por 15 segundos, novamente lavou-se com água destilada e aplicou o corante Fucsina de Ziehl diluído (1:10) por 30 segundos e por fim lavou se com água destilada e aguardamos a secagem das lâminas que então foram observadas com objetiva de imersão.

B.2 Técnica de coloração de Wirtz

A lâmina foi preparada com o auxílio de uma alça de platina, para a fixação do esfregaço utilizou-se o calor da chama do bico de Bunsen. O esfregaço foi corado com solução verde malaquita (5%) e mantido próximo ao calor da chama por 3 minutos, sem deixar o corante secar, lavou-se com água destilada e cobriu o esfregaço com solução de safranina (1%) por 30 segundos, novamente valou-se a lamina e aguardou a secagem. As laminas foram observadas com objetiva de

imersão.

APÊNDICE C – Solução para a manutenção da cepa de *Brevundimonas aurantiaca*. Preparo da solução de sulfato de magnésio heptahidratado 0,01 mol.L⁻¹

Dissolveu-se 1,5g de sulfato de magnésio heptahidratado em 1L de água destilada, a solução foi autoclavada a 121° C por 15 minutos e armazenada sob refrigeração a 8° C até o momento do uso.

APÊNDICE D – Curva de calibração de biomassa *B. atrophaeus*

Para a determinação da curva de calibração da biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 (Figura 44), 1 mL da suspensão matriz foi adicionada em 99mL de TSB e incubada a 37° C/ 150rpm/24horas em frasco Erlenmeyer de 250mL fechado com gaze. Utilizou-se 30mL desse cultivo para inocular 270mL de TSB, no qual foi distribuído 100 mL em cada erlenmeyer e incubado a 37° C/ 150rpm/24horas em erlenmeyer de 250mL fechado com gaze. O conteúdo foi centrifugado a 4000rpm/4° C/ 30 minutos desprezou-se o sobrenadante e o pellet de células foi ressuspensão em água deionizada estéril, agitando em vórtex em condições pré-determinadas. Foram feitas as leituras de absorvâncias a 600 nm e foi feita a correlação com a concentração celular expressa em massa seca por litro de suspensão.

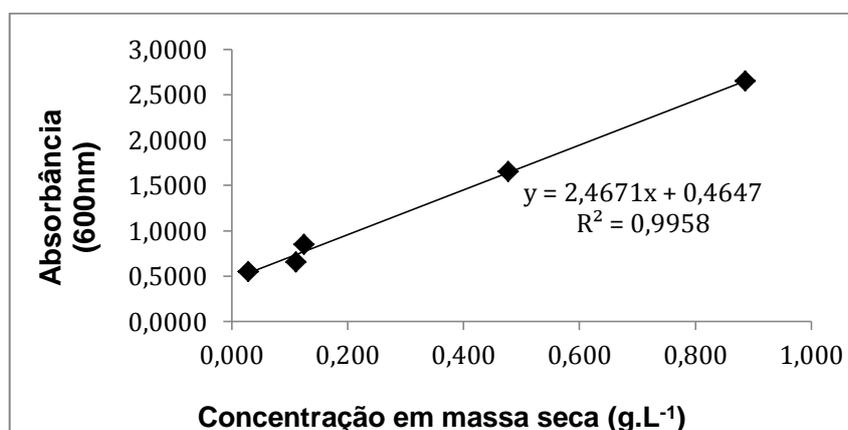


Figura 44. Curva de calibração de *B. atrophaeus* ATCC 9372, relacionando absorbância (600nm) e concentração em massa seca (g.L⁻¹).

APÊNDICE E– Curvas de calibração de microrganismos fotossintetizantes

Para os microrganismos fotossintetizantes, foram utilizados cultivos bem concentrados obtidos a 25°C, 110 rpm, 80 (± 10) $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ por um per\u00edodo de 20 dias. De cada dilui\u00e7\u00e3o, foram filtrados 10 mL em membrana com di\u00e2metro de poro 0,45 μm (Millipore, S\u00e3o Paulo, SP, Brasil) previamente tarada. As membranas foram secas em estufa \u00e0 80\u00b0 C por 40 minutos, colocadas em dessecador com s\u00edlica gel por 30 minutos e pesadas. A massa seca foi determinada atrav\u00e9s de diferen\u00e7a de massa das membranas ap\u00f3s a filtra\u00e7\u00e3o. As absorb\u00e2ncias das dilui\u00e7\u00f5es foram determinadas nos seguintes comprimentos de onda, *Chlorella vulgaris* (Figura 45) em 682 nm, e *Arthrospira platensis* (Figura 46) em 560 nm (UV-1650 PC, Shimadzu Corporation, Kioto, Jap\u00e3o).

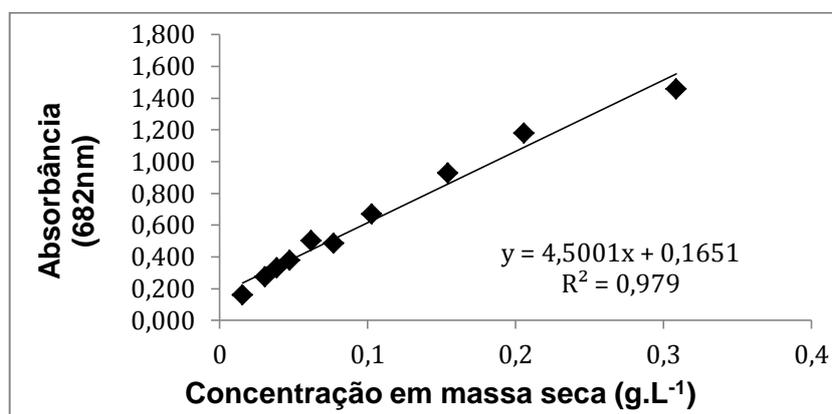


Figura 45. Curva de calibração de *Chlorella vulgaris*, relacionando absorbância (682nm) e concentração em massa seca (g.L⁻¹)

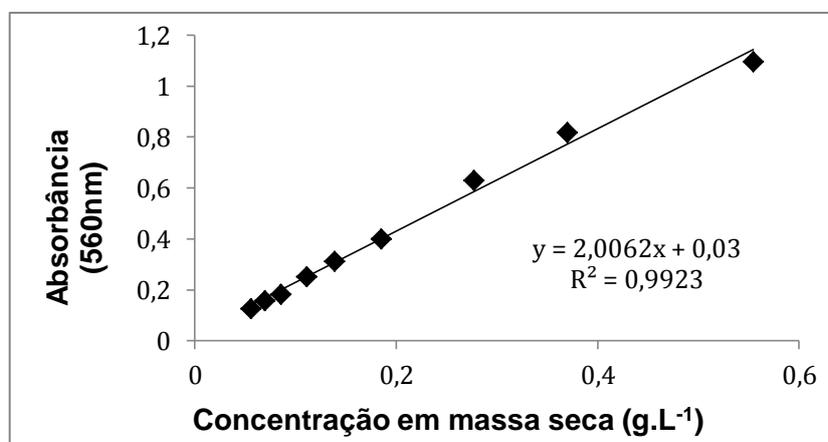


Figura 46. Curva de calibração de *Arthrospira platensis*, relacionando absorbância (560nm) e concentração em massa seca (g.L⁻¹).