

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CULTIVO DE *Haematococcus pluvialis* SOB CONDIÇÕES
DE ESTRESSE E EM CONSÓRCIO MICROBIANO
VISANDO OBTER MAIOR RENDIMENTO DE
ASTAXANTINA**

Msc. Moira Nunes

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Outubro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CULTIVO DE *Haematococcus pluvialis* SOB CONDIÇÕES
DE ESTRESSE E EM CONSÓRCIO MICROBIANO
VISANDO OBTER MAIOR RENDIMENTO DE
ASTAXANTINA**

Moira Nunes

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SP– BRASIL
Outubro de 2011

Nunes, Moira
N972c Cultivo de *Haematococcus pluvialis* sob condições de estresse e em consórcio microbiano visando obter maior rendimento de astaxantina / Moira Nunes. -- Jaboticabal, 2011
xv, 54 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001

Orientador: Antonio Carlos Monteiro

Banca examinadora: Ernani Pinto Júnior, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Ana Teresa Lombardi, Jackson Antonio Marcondes de Souza

Bibliografia

1. Microalga. 2. Bactéria promotora de crescimento. 3. *Azospirillum brasilense*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 663.18

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Moira Nunes – Zootecnista, graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP - em janeiro de 2003. Durante a faculdade direcionou os estudos e estágios para a Aqüicultura, e na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) obteve o título de mestre em Aqüicultura em 2005. No Laboratório de Moluscos Marinhos – UFSC - trabalhou em dois projetos voltados para o desenvolvimento de tecnologias de produção de concentrados de microalgas em escala comercial. Ingressou no Programa de Microbiologia Agropecuária em agosto de 2007, e desde então focou sua vida acadêmica para otimização da obtenção de compostos a partir de microalgas. Obteve o título de Doutora em Microbiologia Agropecuária em outubro de 2011.

Por quem os sinos dobram

Nunca se vence uma guerra lutando sozinho
Você sabe que a gente precisa entrar em contato
Com toda essa força contida que vive guardada
O eco de suas palavras não repercutem em nada!

É sempre mais fácil achar que a culpa é do outro
Evita o aperto de mão de um possível aliado
Convence as paredes do quarto, e dorme tranqüilo...
Sabendo no fundo do peito que não era nada daquilo

Coragem, coragem se o que você quer é aquilo que pensa e faz
Coragem, coragem eu sei que você pode mais!!!

Raul Seixas

*Dedico às pessoas que acreditaram e
ajudaram essa realidade a se
concretizar!*

Agradecimentos

À Deus, por nunca me deixar sozinha e sempre iluminar meu caminho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro, com quem muito aprendi, pela confiança depositada, amizade, orientação e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, a quem muito admiro pela competência profissional e genialidade. Agradeço por me acolher na hora em que eu mais precisei, e por sempre me deixar a vontade para realizar meu trabalho em seu laboratório.

Aos professores Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Dra. Fabiana Pilarski, Dra. Kátia Kupper e Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza, pelas sugestões no Exame de Qualificação.

Aos professores Dr. Ernani Pinto Júnior, Dra. Ana Teresa Lombardi, Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza, pela participação na banca de defesa e pelas valiosas sugestões as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil (Processo nº 2007/59390-1).

Aos meus amigos de Jaboticabal, Mari, Casé, Xun, Balboa, Verinha e Nanci, pela amizade incondicional, companhia e parceria nas horas boas e ruins.

Aos meus irmãos de coração Inca e Fioti, por me acolherem em vosso 'Lar doce Lar', e por mais inúmeros motivos.....

Ao pessoal da Algae Biotecnologia, Sérgio Goldemberg, Daniela, Luciana e Felipe, pelas ajudas ao longo do caminho, apoio, amizade e torcida!!!

Às inúmeras pessoas aqui não citadas que tiveram participação direta nessa etapa, seja pelo apoio, seja pelas valiosas ajudas ou socorros!!!

Aos professores e funcionários da FCAV, sempre dispostos ensinar e ajudar.

Aos meus pais Fernando e Silvana, e à minha irmã Luana, por ser a família unida, fiel, amorosa e mais perfeita que alguém pode ter!!!

À família Ciriello, pelo apoio durante esses anos, amor, carinho, compreensão e torcida!

Ao meu marido Eduardo pela ajuda e apoio incondicional, carinho e incentivo para finalizar este trabalho, e por sempre acreditar que ele seria possível. Meu amor eterno!

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A importância das microalgas.....	4
2.2. A microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	5
2.3. Importância e características dos carotenóides e da astaxantina.....	8
2.4. A bactéria <i>Azospirillum brasilense</i>	11
2.5. Cultivo de microalgas em consórcio com bactérias promotoras de crescimento.....	12
3. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 - CAROTENOGÊNESE EM CÉLULAS DE <i>Haematococcus pluvialis</i>:	
RESPOSTAS AOS ESTRESSES LUMINOSO E NUTRICIONAL	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Cultivo da microalga.....	23
2.2. Mensuração da excreção de carbono orgânico dissolvido e nitrato (N-NO ₃) dissolvido.....	24
2.3. Carotenogênese.....	24

2.4. Determinação da astaxantina.....	25
2.5. Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS.....	26
4. DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÕES.....	33
6. AGRADECIMENTOS.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 3 - CULTIVO CONSORCIADO DE <i>Haematococcus pluvialis</i> COM <i>Azospirillum brasiliense</i> VISANDO AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA PELA MICROALGA.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. Cultivo da microalga.....	41
2.2. Cultivo da bactéria.....	42
2.3. Cultivo consorciado dos microrganismos.....	42
2.4. Parâmetros mensurados.....	43
2.5. Análise estatística.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4. CONCLUSÕES.....	51
5. REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores médios de nitrato (N-NO₃), carbono orgânico dissolvido (COD) e astaxantina quantificados no 10º dia de estresse (25º dia de experimento), em cultivos de *Haematococcus pluvialis*. Médias seguidas do desvio padrão.....**30**

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Valores médios da máxima densidade celular, clorofila a e nitrato dissolvido (N-NO₃) obtidos no 15º dia de cultivo *consorciado* de *Haematococcus pluvialis* com *Azospirillum brasilense* V6, e produção de astaxantina pela microalga no último dia de estresse (25º dia de cultivo).....**46**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis*. O tamanho da barra indica 50 mm. FONTE: <http://www.bgu.ac.il/~aflaloc/images/LiCy.gif>.....5

Figura 2. Fases do ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis*: (a) célula vegetativa biflagelada; (b) cistos ricos em astaxantina. FONTE: LORENZ & CYSEWSKI, 2000.....6

Figura 3. Molécula da astaxantina. Fonte: LORENZ & CYSEWSKI, 2000.....9

Figura 4. Via de síntese de astaxantina pela *Haematococcus pluvialis*. Fonte: Lorenz, 1999.....10

CAPÍTULO 2

Figura 1. Valores médios de concentração celular (A), biomassa (B) e massa seca celular (C) obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis* expostos à 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (\blacklozenge) e a 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ combinado com 4% de CO_2 (*), durante 25 dias.....27

Figura 2. Valores médios da razão carotenóides/clorofila a (A), concentração de nitrato no meio (N-NO_3) (B) e carbono orgânico dissolvido (COD) (C) obtidos nos cultivos expostos à 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (\blacklozenge) e 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ combinado com 4% de CO_2 (*), durante 25 dias.....28

CAPÍTULO 3

Figura 1. Valores médios de densidade celular (A), biomassa seca (B) e clorofila a (C) obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis* consorciado com *Azospirillum brasilense* V6. T1 – cultivo apenas da microalga (◆); T2 – cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano (●); T3 – cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano (▲); T4 – cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano (x)..... **48**

Figura 2. Valores médios das concentrações de nitrato (N-NO₃) (A) e ácido indol-acético (B) no meio de cultura, obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis* consorciado com *Azospirillum brasilense* V6. T1 – cultivo apenas da microalga (◆); T2 – cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano (●); T3 – cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano (▲); T4 – cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano (x); T6 – cultivo da bactéria em meio suplementado com triptofano (■).....**50**

CULTIVO DE *Haematococcus pluvialis* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE E EM CONSÓRCIO MICROBIANO VISANDO OBTER MAIOR RENDIMENTO DE ASTAXANTINA

RESUMO - A microalga *Haematococcus pluvialis* é conhecida como o microrganismo que apresenta maior rendimento final de astaxantina em sua biomassa, quando submetida a fatores de estresse celular eficientes. Contudo ainda apresenta uma característica de crescimento desfavorável quando comparada a outras espécies de microalgas cultivadas em escala comercial, visto que possui uma taxa de crescimento intrínseca, resultando em baixa densidade celular ao final dos cultivos. Assim, o rendimento final do pigmento é relativamente baixo. Neste sentido, este estudo teve por objetivo avaliar a resposta de *Haematococcus pluvialis* ao processo de indução à carotenogênese por meio de estresse luminoso e nutricional, e promover o aumento de biomassa vegetativa da microalga através da adição da rizobactéria promotora de crescimento em plantas, *Azospirillum brasilense* V6, estirpe produtora do fito hormônio AIA (ácido indol – acético), em cultivos estanques, visando obter maior rendimento final de astaxantina. O trabalho foi dividido em duas fases. Primeiramente, no cultivo referente ao controle (contendo apenas *H. pluvialis*) foram aplicadas duas combinações de fatores de estresse celular para indução a síntese de astaxantina pela microalga, visando a escolha do método de estresse a ser aplicado na fase seguinte. As células de *H. pluvialis* foram submetidas ao estresse por alta intensidade luminosa ($350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ou ao mesmo estresse luminoso aliado a suplementação com CO_2 (4%) na aeração fornecida na fase exponencial de crescimento. Avaliou-se, entre outros fatores de resposta celular, a concentração final de astaxantina na biomassa após 10 dias de estresse. As concentrações do pigmento foram 4,15 e 17,66 mg g^{-1} , respectivamente, para as culturas submetidas ao estresse luminoso e para as que receberam o mesmo estresse luminoso aliado ao aumento da relação C/N no meio de cultura. Sendo assim, para a etapa experimental seguinte, decidiu-se optar pela combinação de fatores estressantes para indução a carotenogênese. A segunda fase

do trabalho foi conduzida com o objetivo de promover o aumento da densidade celular de *H. pluvialis* através do cultivo em consórcio com a rizobactéria produtora do hormônio ácido indol acético (AIA), *A. brasilense*, visando maior rendimento final da biomassa e do pigmento astaxantina. Os cultivos foram realizados em frascos com capacidade de 1L, contendo 900mL de meio WC e aeração com ar atmosférico sintético filtrado com fluxo de 100 mL min⁻¹. As culturas foram mantidas em intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12hs e temperatura de 23°C. O meio de cultura contido nos frascos foi inoculado com uma concentração final de 10.000 céls mL⁻¹ de *H. pluvialis* e 204.500 UFC mL⁻¹ de *A. brasilense* V6. O desenho experimental foi conduzido com 6 tratamentos, tendo três deles a adição de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano e três sem adição deste aminoácido, para controle, visto que esse composto é precursor da síntese de AIA na bactéria *A. brasilense*. O experimento foi conduzido durante 25 dias, sendo nos primeiros 15 dias avaliados a máxima densidade celular obtida, clorofila a, biomassa seca, e a quantificação do AIA e nitrato no meio de cultivo. Após esse período, as células foram expostas a combinação de fatores estressantes determinadas anteriormente, durante 10 dias, para indução à carotenogênese. Ao final, foi mensurada a quantidade de astaxantina na biomassa obtida. Durante a fase vegetativa de crescimento, não foi observada diferença significativa na máxima densidade celular e concentração de clorofila a, entre os tratamentos contendo a microalga. Contudo houve diferença na concentração final de nitrato dissolvido no meio, e após o período de estresse os valores de astaxantina na biomassa também apresentaram uma diferença estatística. As concentrações do pigmento foram 17,66 e 13,62 mg g⁻¹, respectivamente, para as culturas controle contendo apenas microalgas e para as culturas consorciadas com adição de triptofano. O cultivo da microalga *H. pluvialis* consorciado com a bactéria *A. brasilense* V6, na presença do hormônio ácido indol-acético, não promoveu um aumento do crescimento celular microalgal e nem da quantidade de astaxantina na biomassa submetida a fatores de estresse celular.

Palavras-chave: bactéria promotora de crescimento, carotenóide, *Azospirillum brasilense*, microalga, estresse luminoso e nutricional, ácido indol acético

CULTURE OF *Haematococcus pluvialis* UNDER STRESS CONDITIONS AND IN A MICROBIAL CONSORTIUM AIMING TO OBTAIN HIGHER YIELD OF ASTAXANTHIN

ABSTRACT - The microalgae *Haematococcus pluvialis* is known as the microorganism that has a highest final yield of astaxanthin in its biomass, when induced by efficient stress factors. However, still presents a characteristic of unfavorable growth when compared to other species of microalgae grown on a commercial scale, once it has an intrinsic growth rate that provides low cell density in the culture. Thus, the final yield of the pigment is relatively low. Thus, this study aimed to evaluate the response of *Haematococcus pluvialis* submitted to carotenogenesis induction process through light and nutrient stress, and promotion of vegetative microalgae biomass increase through the addition of the growth promoter bacteria in plants, *Azospirillum brasilense* V6, a strain that produce the phyto hormone IAA (indole - acetic acid). The experiments were performed in “batch” systems, aiming to obtain higher final yield of astaxanthin. The work was divided into two phases. First, to the control (containing only *H. pluvialis*) it was applied two combinations of stress factors to induce cellular synthesis of astaxanthin by the microalgae, to define the method of stress to be applied in the next phase. The cells of *H. pluvialis* were submitted to stress by high light intensity (seven times the original) or the same light stress combined with CO₂ supplementation (4%) in the aeration provided in the exponential growth phase. We evaluated, among other factors of cellular response, the final concentration of astaxanthin in the biomass after 10 days of stress. The pigment concentrations were 4.15 and 17.66 mg g⁻¹, respectively, for cultures submitted to light stress and to those who received the same light stress add with the increase of C / N ratio in the culture medium. So, for the next experimental phase, the combination of stress factors for inducing carotenogenesis was used. In the second phase the work has the objective to promote increased cell density of *H. pluvialis* by the consortium growth with the bacteria *A. brasilense*, aiming to increase the final yield of biomass and pigment astaxanthin. The cultures were performed in erlenmeyer flask with 1L capacity containing 900ml of WC medium and aeration with filtered atmospheric synthetic air at a flow of 100 ml min⁻¹. The cultures were maintained in light

intensity of 50 mol photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a photoperiod of 12 hours and 23° C. The culture media were inoculated with a final concentration of 10,000 cells mL^{-1} of *H. pluvialis* and 204,500 CFU mL^{-1} of *A. brasilense* V6. The experimental design was conducted with six treatments, three of them with the addition of 100 mg mL^{-1} of tryptophan and three without the addition of this amino-acid, for control, since this compound is a precursor of IAA synthesis in the bacterium *A. brasilense*. The experiment was conducted for 25 days, and in the first 15 days it was evaluated the maximum cell density obtained, chlorophyll *a*, biomass, and quantification of IAA and nitrate in the culture medium. After this period, cells were exposed to a combination of stress factors as determined before, during 10 days, for induction of carotenogenesis. At the last day, the amount of astaxanthin in the biomass was determined. During the vegetative stage of growth, there was no significant difference in maximum cell density and chlorophyll *a* concentration among the treatments containing the microalgae. However there was a difference in the final concentration of dissolved nitrate in the medium, and after the stress factors the values of astaxanthin in the biomass also showed a statistical difference. The pigment concentrations were 17.66 and 13.62 mg g^{-1} , respectively, for control cultures containing only microalgae, and for consorted cultures with tryptophan added. The cultivation of microalgae *H. pluvialis* consorted with the bacterium *A. brasilense* V6 in the presence of the hormone indole-acetic acid, did not promote an increase of microalgal cell growth and astaxanthin amount, in the biomass submitted to cellular stress factors.

Keywords: promoting growth bacteria, carotenoid, *Azospirillum brasilense*, microalgae, light and nutrient stress, indole-acetic acid

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse no estudo de microrganismos como microalgas, bactérias e fungos deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, controle biológico, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentar, química e farmacêutica.

Atualmente, as pesquisas em biotecnologia alimentar empregando microalgas vêm ganhando especial atenção, visto que esses organismos sintetizam compostos únicos, de acordo com a particularidade de cada microalga. Algumas espécies são cultivadas industrialmente em vários países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria nutracêutica e farmacológica.

Dentre os compostos bioativos de interesse, os carotenóides se destacam devido a sua excelente propriedade antioxidante. Recentemente diversas pesquisas vêm enfatizando o potencial da astaxantina, em especial, uma vez que possui a maior atividade antioxidante já relatada quando comparada com a vitamina E, β -caroteno, luteína e licopeno, por exemplo.

A astaxantina é produzida mundialmente por via sintética (BASF, Hoffman-La Roche), majoritariamente. Contudo, a síntese química além de ser uma forma cara de produção devido ao fato da molécula ser muito complexa, invariavelmente pode conter moléculas com configuração diferente da natural, fato que diminui a estabilidade do produto. Adicionalmente, observa-se uma tendência mundial de exclusão de compostos sintéticos da cadeia alimentar.

Existem algumas iniciativas de obtenção através da rota microbiológica, principalmente extraída da microalga *Haematococcus pluvialis*, nos EUA (Cyanotech,

Mera Pharmaceuticals), Israel (Algatech), e no Japão (Fuji Chemical Industry). Contudo, a maior dificuldade encontrada nesse segmento é a obtenção de grande quantidade de biomassa celular, visto que esta espécie apresenta baixa taxa de crescimento, o que resulta em baixa produtividade final de astaxantina.

Por esse motivo, o cultivo desta microalga apresenta algumas dificuldades que necessitam ser vencidas quando comparadas a outras espécies de microalgas mundialmente produzidas em escala industrial. Durante décadas estudos de cinética continuam a ser conduzidos com objetivo de determinar as condições ideais de cultivo da célula vegetativa e posterior indução da síntese de astaxantina. Características como sistemas de cultivo, meios de culturas, fotoperíodos, intensidade luminosa, temperatura, relação C/N, deprivação de nutrientes e estresse osmótico como a adição de NaCl foram investigadas, visando aumentar o rendimento em biomassa ao final do cultivo vegetativo e em seguida melhorar a eficiência na indução à síntese de astaxantina por *H. pluvialis*.

Alguns estudos sugerem que a resposta da aplicação de rizobactérias, conhecidas como promotoras de crescimento de plantas, em cultivos de microalgas verdes trazem benefícios para o crescimento populacional microalgal, sendo relatados aumentos significativos na taxa de reprodução e de clorofila, por exemplo. A resposta das microalgas está relacionada com hormônio secretado pelas bactérias, abrindo uma nova frente promissora de investigação. No entanto, os efeitos de hormônios promotores de crescimento em microalgas são pouco estudados.

Pesquisas com microalgas estão em crescente expansão no Brasil e no mundo. Explorar seu amplo potencial permite aprimorar a obtenção de compostos de interesse a partir da engenharia biotecnológica para futuras aplicações na indústria, atendendo à crescente demanda do mercado. Neste contexto, é possível que o cultivo consorciado da microalga com a rizobactéria traga um aumento dos índices produtivos dos cultivos microalgais. Essa idéia está fundamentada nos benefícios que o hormônio secretado pela bactéria possa ocasionar no desempenho das células de microalgas durante o crescimento vegetativo e posteriormente, quando as células forem submetidas a fatores estressantes para indução da síntese de astaxantina.

Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a resposta de *Haematococcus pluvialis* ao processo de indução à carotenogênese por meio de estresse luminoso e nutricional, e promover o aumento de biomassa vegetativa da microalga através da adição da rizobactéria promotora de crescimento de plantas, *Azospirillum brasilense* V6, estirpe produtora do fito hormônio ácido indol-acético (AIA), em cultivos estanques, visando obter maior rendimento final de astaxantina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância das microalgas

As microalgas são microrganismos aquáticos encontrados tanto em ambientes dulcícolas, como em salobros, marinhos e hipersalinos. São seres fotossintetizantes, contudo, podem apresentar comportamento heterotrófico (SIGEE, 2004). Apresentam taxas de crescimento elevadas e constituem um dos mais eficientes 'sistemas biológicos' de transformação de energia solar e CO₂ em compostos orgânicos, através da fotossíntese.

Historicamente, o fitoplâncton é conhecido como a base da cadeia alimentar aquática, sendo portanto o alimento inicial da maioria dos organismos deste ambiente. Muitos ainda dependem dessa fonte de alimento direta ou indiretamente durante o resto do seu ciclo de vida. Também são ministrados como alimento de diversos animais aquáticos cultivados, podendo ser fornecido diretamente em forma de cultivos frescos, liofilizado adicionada à ração, ou ainda em forma de pastas e concentrados (NUNES et al., 2009).

Atualmente, as microalgas estão sendo mundialmente reconhecidas por estarem relacionadas a diversas finalidades ligadas desde o tratamento eficaz de diferentes tipos de efluentes como da indústria de laticínio, parabolização do arroz, vinhaça e águas residuárias (QUEIROZ et al., 2007; MARIANO, 2006; de-BASHAN et al., 2002), até destinos mais refinados como a produção de cosméticos, alimentos, suplementos vitamínicos e protéicos, produtos nutracêuticos e farmacológicos, fins terapêuticos e medicinais (BOROWITZKA, 1995; OLAIZOLA, 2003).

Compreendem um dos microrganismos mais promissores dentro do mercado da biotecnologia, visto que produzem compostos primários e secundários altamente valorizados como metabólitos específicos e polissacarídeos, pigmentos de interesse como a clorofila, carotenóides e ficocianinas, esteróis, ácidos graxos poliinsaturados

(PUFA), proteínas específicas, toxinas, etc (BOROWITZKA, 1995; CARDOZO et al, 2007).

Há mais de 10 mil espécies de microalgas conhecidas, porém poucas são comercialmente cultivadas. Os principais gêneros cultivados para fins de consumo humano são *Spirulina* sp., *Chorella* sp., *Dunaliella* sp. e *Haematococcus* sp. (OLAIZOLA, 2003; DONG & ZHAO, 2004).

2.2. A microalga *Haematococcus pluvialis*

A alga verde *Haematococcus pluvialis* pertence à divisão Chlorophyta, ordem Volvocales, família Haematococcaceae e caracteriza-se por ser unicelular, biflagelada, móvel, possuindo tamanho médio de 10µm. É considerada cosmopolita e pode ser encontrada em todo o mundo, principalmente em águas continentais e costeiras (LORENZ, 1999). Apresenta um ciclo de vida bastante complexo, que demanda conhecimento das condições ótimas para crescimento (fase vegetativa) e produção de astaxantina (indução ao encistamento).

O ciclo de vida da célula vegetativa (Figura 1) compreende três etapas: sob condições favoráveis, as células (ainda menores e móveis) perdem seu flagelo (F), aumentam substancialmente seu tamanho e volume celular (P) e começam a se dividir. A célula Theca (mãe) pode gerar até 16 células filhas flageladas, móveis, que posteriormente perderão seu flagelo e recomeçarão o ciclo.

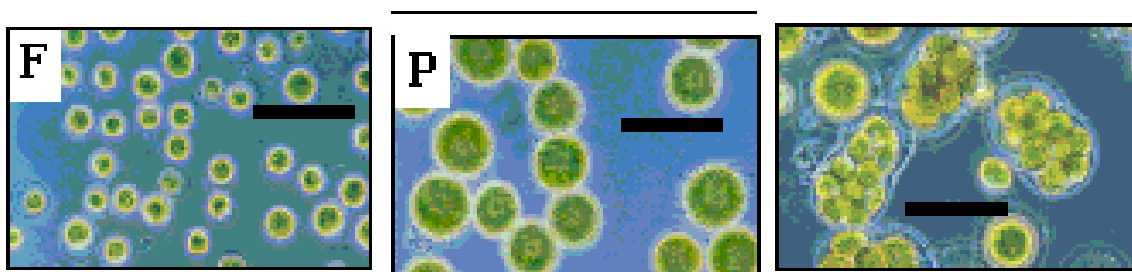


Figura 1 - Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis*. O tamanho da barra indica 50 mm. Fonte: <http://www.bgu.ac.il/~aflaloc/images/LiCy.gif>

Em situações em que as condições de cultivo se tornem desfavoráveis e/ou tornem o meio estressante, as células desta microalga param de se dividir e crescer de forma vegetativa, e encistam (Figura 2). Assim acumulam rapidamente grandes quantidades de astaxantina, e mudam sua coloração para vermelho. Entretanto, mesmo após longos períodos de dormência, quando as condições se tornarem propícias novamente, estes cistos podem voltar a ser células vegetativas, fato que confere uma característica de resistência devido ao acúmulo de astaxantina nesta espécie.

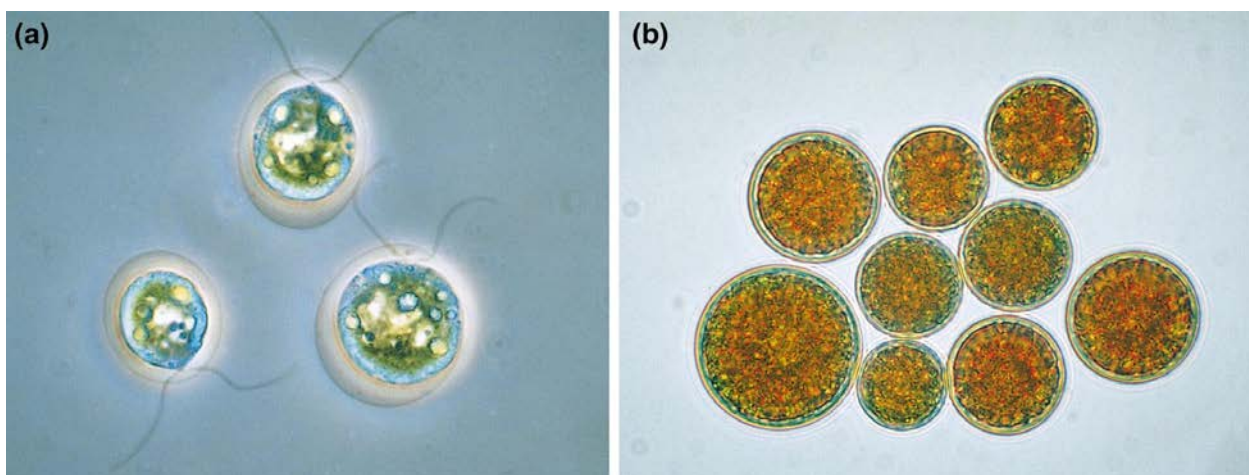


Figura 2. Fases do ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis*: (a) célula vegetativa biflagelada; (b) cistos ricos em astaxantina. Fonte: LORENZ & CYSEWSKI, 2000.

A *Haematococcus pluvialis* é capaz de sintetizar uma grande quantidade de astaxantina comparado a outras fontes naturais, uma vez que é capaz de acumular 4% de astaxantina em relação ao seu peso seco (BECKER, 2004).

No entanto, esta espécie de microalga apresenta algumas características desfavoráveis quando comparada a outras microalgas cultivadas com êxito em escala industrial, como a *Dunaliella sp.* e a *Spirulina sp.* (CIFUENTES et al., 2003). A maior dificuldade está relacionada à sua lenta velocidade de crescimento (μ) durante a fase vegetativa 0,5 – 0,9 div/dia (HAGEN et al., 1993; FAN et al., 1994; OROSA et al., 2005). Este parâmetro está diretamente ligado à baixa densidade celular obtida nos cultivos

comerciais, que excepcionalmente alcança valores próximos a 55×10^4 células/mL (KOBAYASHI, 1993).

Diversos estudos de cinética são relatados, direcionados a propiciar condições ideais de cultivo da célula vegetativa para obtenção de grande quantidade de biomassa, e posterior indução da síntese de astaxantina através da promoção de estresse nas células. Os principais fatores estudados para otimização do crescimento vegetativo de *H. pluvialis* estão relacionados com sistemas de cultivo, manipulação de nutrientes disponíveis para a célula, fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura (FABREGAS et al., 2001; HATA et al., 2001; IMAMOGLU et al., 2007).

Dentre as formas de estresse celular mais funcionais para obtenção de astaxantina podemos destacar privação de nutrientes específicos, como o nitrogênio ou fósforo (FABREGAS et al., 2003; IMAMOGLU et al., 2009); adição de NaCl (KOBAYASHI et al., 1997); estresse oxidativo, promovido através da adição de ferro e espécies reativas de oxigênio (EROs) (KOBAYASHI et al., 1993); aumento da relação C/N disponível para a célula (KANG et al., 2007) ou ainda aumento substancial da intensidade luminosa (WANG et al., 2003; TORZILLO et al., 2005).

Além da biosíntese de astaxantina, as células também respondem ao estresse através de diversas alterações morfofisiológicas, como por exemplo, o aumento da excreção de carbono orgânico dissolvido (COD) pelas células. Esses compostos desempenham um papel fundamental no equilíbrio do ecossistema aquático, e o aporte nutricional do meio afeta diretamente a quantidade e a composição do exsudato fitoplanctônico, sendo esta relação altamente espécie-específica (SIGEE, 2004). A quantidade de luz que incide sobre a célula também é um fator modulador da excreção de COD celular. O aumento da irradiância incrementa o fluxo de carbono no fitoplâncton, e caso outros nutrientes não estejam disponíveis na mesma proporção resultará na limitação do crescimento e acréscimo da excreção de COD (DUBINSKY & BERMAN-FRANK, 2001). Esses produtos são derivados diretamente da fotossíntese, seja de forma passiva (difusão de compostos como carboidratos, polissacarídeos, polipeptídeos, aminoácidos livres e ácidos orgânicos) ou ativa (secretados como enzimas extracelulares, sideróforos, etc) (SIGEE, 2004), e, portanto possuem estreita

relação com o nível de estresse celular. Muitos destes compostos apresentam propriedades de interesse industrial químico e farmacêutico (CARDOZO et al, 2007).

2.3. Importância e características dos carotenóides e da astaxantina

Entre os compostos mais valorizados no mercado nutracêutico estão os carotenóides, devido principalmente à sua alta atividade antioxidante. Pertencem a um grupo de pigmentos acessórios que compreende duas classes principais, os carotenos (β -caroteno) e as xantofilas (astaxantina, zeaxantina e luteína). São pigmentos amplamente utilizados na alimentação humana como corantes e moléculas bioativas, e aditivos alimentares na ração de animais como peixes (salmão e truta), camarões, aves poedeiras e de corte (KOBAYASHI et al., 1997; CARDOZO et al., 2007), entre outros fins.

Os carotenóides são estruturas cujo esqueleto é composto de unidades de cinco carbonos, e podem ser classificados em dois grupos, os carotenos e oxicarotenóides (como as xantofilas, por exemplo). A diferença fundamental consiste em suas estruturas: os carotenos são hidrocarbonetos e as xantofilas contêm oxigênio, além de carbono e hidrogênio em sua molécula (VIEIRA et al.,1991). As variantes estruturais estão descritas a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores, sendo estes organismos fotossintéticos os únicos responsáveis pela biosíntese dos carotenóides na natureza.

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu modo de agir como seqüestradores de moléculas reativas de oxigênio singleto (EROs), e quelantes de íons metálicos. Previnem os prejuízos nas células ao inibir a peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados essenciais e a formação de radicais livres, que são gerados como subprodutos durante reações metabólicas normais no corpo humano. No homem, danos oxidativos têm sido ligados ao envelhecimento celular, à doenças degenerativas como a arteriosclerose e neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, à degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e principalmente a diversos tipos de câncer (NAGUIB, 2000; LORENZ, 2001).

Os carotenóides também atuam favorecendo o aumento das lipoproteínas de alta-densidade (HDL- colesterol bom), com conseqüente melhora da função cardíaca, auxiliando também na prevenção de doenças cardiovasculares (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). Possuem papel fundamental na fertilidade, na proteção contra efeitos da luz ultravioleta (UV), na resistência ao estresse e são excelentes precursores de vitamina A (retinol) (LORENZ, 2001; CARDOZO et al, 2007).

Dentre os carotenóides de maior interesse comercial está a astaxantina, visto que apresenta alta atividade antioxidante, a maior citada na literatura quando comparada a outros compostos que apresentam tal propriedade. A eficiência deste pigmento em comparação a outros carotenóides como a luteína, o licopeno e β -caroteno é muito superior, por seu poder antioxidante ser aproximadamente 10 vezes maior que o β -caroteno e 500 vezes maior que o α -tocoferol (Vitamina E) (NAGUIB, 2000; LORENZ, 2001). Seu mecanismo de ação está relacionado com sua alta capacidade de interagir quimicamente com espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto e os radicais livres.

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) (Figura 3) é um carotenóide de coloração vermelho-alaranjada, do grupo das xantofilas, amplamente distribuído na natureza e comumente presente em animais marinhos como o salmão e o flamingo.

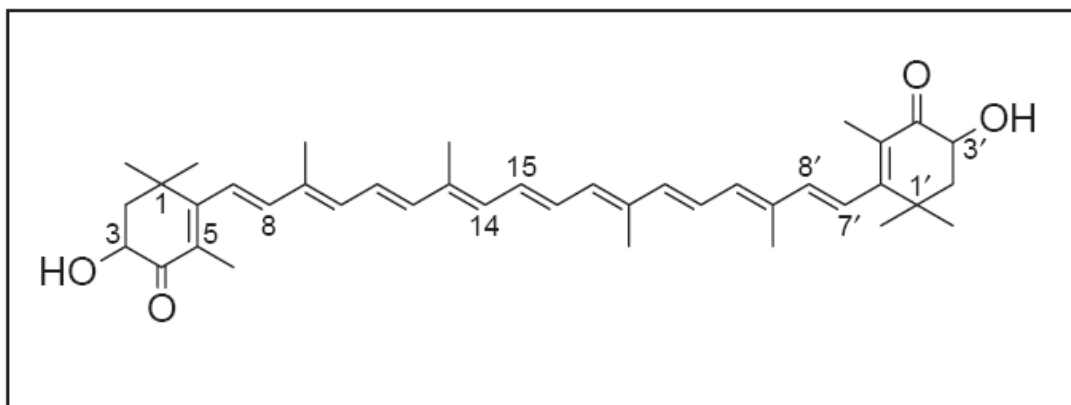


Figura 3. Molécula da astaxantina. Fonte: LORENZ & CYSEWSKI, 2000.

Entre os pigmentos produzidos pela *H. pluvialis* durante a fase de encistamento, a astaxantina compreende 80-90% do conteúdo de carotenóides totais. Outros como a cantaxantina, luteína e betacaroteno representam apenas uma pequena porcentagem do conteúdo total de carotenóides nas células encistadas (LORENZ, 2001). Nesta microalga a astaxantina está presente principalmente complexada com éster, formado por combinação de vários ácidos graxos. A composição padrão da molécula de astaxantina proveniente deste microorganismo é aproximadamente 70% monoésteres, 25% diésteres e 5% livre (LORENZ e CYSEWSKI, 2000), sendo os monoésteres ligados aos ácidos graxos 16:0, 18:1 e 18:2.

Na microalga *H. pluvialis* a astaxantina é biosintetizada através da via isoprenóide (Figura 4) a qual é responsável pela complexação de diversas moléculas lipossolúveis como esteróis, esteróides, hormônios e vitaminas D, K e E. Essa via se inicia com a atuação da acetil-CoA e prossegue até o último passo oxidativo, resultando na molécula de astaxantina.

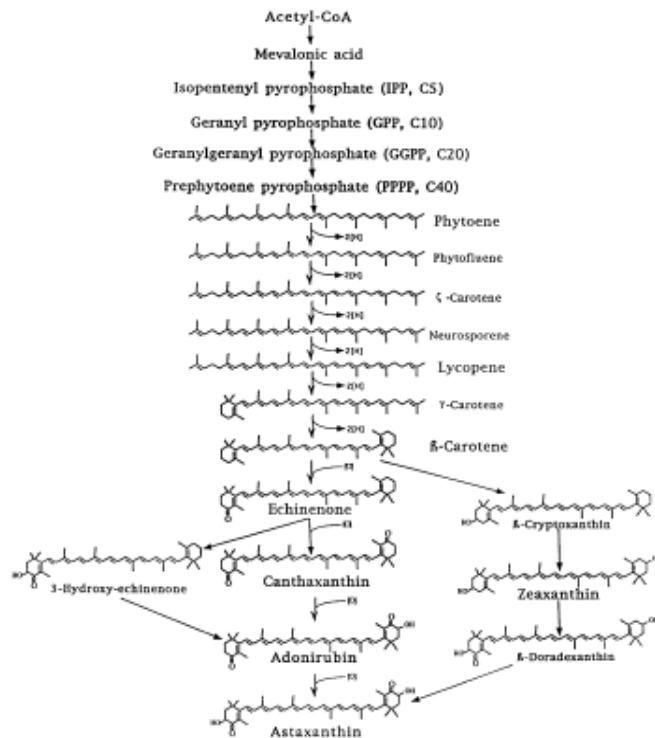


Figura 4. Via de síntese de astaxantina pela *Haematococcus pluvialis*. Fonte: LORENZ, 1999.

2.4. A bactéria *Azospirillum brasilense*

O Brasil é um dos países pioneiros na utilização de produtos comerciais agrícolas compostos por bactérias diazotróficas do solo chamadas rizóbios. As Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) representam uma grande variedade de bactérias, em sua grande maioria Gram negativas. Quando associadas com plantas, formam estruturas especializadas nas raízes para a redução e o repasse do nitrogênio atmosférico em uma forma assimilável, e levam a alterações nos padrões morfofisiológicos das raízes, como: incremento no diâmetro, densidade e comprimento dos pêlos radiculares, maior eficiência na absorção de água, macro e micronutrientes, maior atividade metabólica e de enzimas nas raízes (HUNGRIA et al., 2010). Contudo, o principal efeito sobre as plantas é o fornecimento de fitohormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas (EL-KHAWAS & ADACHI, 1999). A presença desses compostos auxilia o crescimento da raiz e da parte aérea do vegetal. Outro aspecto importante é o efeito antagônico sobre muitos microrganismos patogênicos (CORREA et al., 2008), promovendo, portanto, um eficiente controle biológico na natureza.

A principal RPCP estudada atualmente no Brasil com capacidade de síntese da auxina ácido indol-acético (AIA) pertencente ao gênero *Azospirillum* (TIEN et al., 2008). Este microrganismo é caracterizado como de vida livre, aeróbico, heterotrófico, sendo extensivamente encontrado nas rizosferas de diversas culturas. O AIA pode ser sintetizado e excretado por bactérias diazotróficas associativas como as pertencentes ao gênero *Azospirillum* a partir do triptofano, que é utilizado como precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em diversas plantas e microrganismos.

Há décadas, com o objetivo de reduzir custo excessivo com fertilizantes, a Embrapa Soja vem pesquisando a utilização de RPCPs como inoculante em diversas culturas de gramíneas. A estirpe *A. brasilense* V6 (AbV6), proveniente da Embrapa, é recomendada como inoculante da cultura do milho e sorgo, gerando um aumento de até 30% no rendimento final da safra do milho (HUNGRIA, 2011).

As pesquisas com *A. brasilense* foram além da inoculação em plantas terrestres, e de-BASHAN et al. (2002) documentaram a aplicação dessa bactéria co-imobilizada em esferas de alginato com a microalga *Chlorella vulgaris*, para o tratamento de águas residuárias, supondo que os microrganismos atuariam em conjunto no processo de despoluição e absorção de nutrientes.

2.5. Cultivo de microalgas em consórcio com bactérias promotoras de crescimento

Os hormônios vegetais, como as auxinas, são reguladores naturais de crescimento e influenciam diretamente nos processos fisiológicos de vegetais terrestres. Apesar de haverem relatos evidenciando a presença de fito hormônio ácido indol-acético (AIA) em amostras de algas coletadas em ambiente, estudos relacionando os efeitos de hormônios promotores de crescimento no desempenho de microalgas são escassos.

Ao aplicarem AIA diretamente em cultivos de *Chlorella pyrenoidosa*, CZERPAK et al. (1999) observaram um aumento no total de clorofilas 'a' e 'b', fator que está diretamente relacionado com o aumento da biomassa. Adicionalmente, demonstraram um aumento significativo nas quantidades excretadas de proteína e carboidratos (monossacarídeos – aldohexoses), comprovando uma alteração no metabolismo celular das microalgas. Do mesmo modo, GONZALEZ & BASHAN (2000), comprovaram que a adição de AIA comercial promoveu um aumento significativo da multiplicação celular de *Chlorella vulgaris*. Concluíram que, para a microalga estudada, a concentração indicada para adição desse hormônio está na faixa de $10^{-5}M$.

Estudando microalgas co-imobilizadas com *Azospirillum brasilense* em alginato para tratamento de efluentes, de-BASHAN et al. (2002) e de-BASHAN et al. (2008) demonstraram que os benefícios relacionados com o aumento da densidade celular, tamanho, biomassa seca e conteúdo de clorofila e lipídeos totais nas células de microalgas estavam diretamente relacionados com a presença e consumo do hormônio AIA secretado pelas bactérias.

Com isso, estudos sugerem que respostas no cultivo de bactérias conhecidas como promotoras de crescimento em plantas – produtoras de auxinas – consorciado com microalgas verdes são positivas, podendo levar a um aumento dos índices produtivos das culturas microalgais.

3.REFERÊNCIAS

BECKER, W. Microalgae for aquaculture – The nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, 2004. p.380 - 391.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticas and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v.7, p.3-15, 1995.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p. 60–78, 2007.

CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZÁLEZ, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. **Biology Reserch**, v.36, p.343-357, 2003.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.

CZERPAK, R.; KROTKE, A.; MICAL, A. Comparison of stimulatory effect of auxins and cytokinins on protein, saccharides and chlorophylls conten content in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. **Polskie Archiwum Hydrobiologii.**, v.46, p.71–82, 1999.

de-BASHAN, L.E; MORENO M.; HERNANDEZ JP; BASHAN J. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris*

coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, v.36, p.2941–2948, 2002.

de-BASHAN, L.E.; ANTOUN, H.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v.44, p.938–947, 2008.

DONG, QL.; ZHAO, XM. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today**, v.98, p. 537–544, 2004.

DUBINSKY Z.; BERMAN-FRANK, I. Uncoupling primary production from population growth in photosynthesizing organisms in aquatic ecosystems. **Aquatic Science**, v.63, p.4–17, 2001.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiela* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.28, p.377-381, 1999.

FABREGAS, J.; DOMINGUEZ, A.; MASEDA, A.; OTERO, A. Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. **Microbiology and Biotechnology**, v.61, p. 545–551, 2003.

FABREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMINGUEZ A. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v.89, p.65–71, 2001.

FAN. L.; VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S. Effect of the temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v.30, p.829-833, 1994.

GONZALEZ, L. E.; BASHAN, Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting

bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1527–31, 2000.

HAGEN C.; BRAUNE W.; GREULICH. F. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris*. Protection from photodynamic damage. **J. Photochem. Photobiol.**, v.20, p.153-160, 1993.

HATA, N.; OGBONNA, J.C.; HASEGAWA, Y.; TARODA, H.; TANAKA, H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.395–402, 2001.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos, 325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, p.413-425, 2010.

IMAMOGLU, E.; DALAY, M.C.; SUKAN, F.V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **New Biotechnology**, v.26, p.199-204, 2009.

KANG, C. D. ; LEE, J. S.; PARK, T. H.; SIM, S. J. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p.987–994, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.867-873, 1993.

KOBAYASHI; M., KAKIZONO, N.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI, V. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p.351–356, 1997.

LORENZ, R. T. **A Technical Review of *Haematococcus* Algae**. NatuRose Technical Bulletin. Cyanotech Corporation, n.60, 1999. 9p.

LORENZ, R.T. **HPLC and spectrophotometric analysis of carotenoids from *Haematococcus* algae powder**. Cyanotech Corporation, n.15, 2001. 10p.

LORENZ, R.T., CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**. v.18, p.160–167, 2000.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Rio Claro, 2006. 162p. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Universidade Estadual Paulista.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1150–1154, 2000.

NUNES, M.; PEREIRA, A.; FERREIRA, J. F., YASUMARU, F. Evaluation of the microalgae paste quality produced in a mollusk hatchery in southern Brazil. **Journal of the World Aquaculture Society**. , v.40, p.87 - 94, 2009.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v.96, p.373-378, 2005.

QUEIROZ, M.I., E. JACOB-LOPES, L.Q. ZEPKA, R. BASTOS, R. GOLDBECK. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor, **Bioresource Technology**. v.98, p.2163–2169, 2007.

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment**. Wiley, 2004. 524p.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

TORZILLO, G.; GOKSAN, T.; ISIK O.; GOKPINAR. S. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **European Journal of Phycology**, v 40, p.233-240, 2005.

VIEIRA, E.C., GAZZINELLI, G., MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2^aed., Atheneu, 1991. 360p.

WANG, B.; ZARKA, A.; TREBST, A., BOUSSIBA, S. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active protective process under high irradiance. **Journal of Phycology**, v.39, p.1116–1124, 2003.

CAPÍTULO 2 - CAROTENOGÊNESE EM CÉLULAS DE *Haematococcus pluvialis*: RESPOSTAS AOS ESTRESSES LUMINOSO E NUTRICIONAL

RESUMO - Esse trabalho teve por objetivo avaliar as respostas das células de *Haematococcus pluvialis* ao processo de indução à carotenogênese, quando submetidas ao estresse por alta intensidade luminosa ou ao mesmo estresse luminoso aliado a suplementação com CO₂ (4%) em aeração fornecida durante a fase exponencial de crescimento. Avaliou-se a concentração de astaxantina, a razão carotenóides/clorofila *a*, a biomassa seca e concentração celular, o nitrato e a excreção de carbono orgânico dissolvido. Na condição de suplementação com CO₂ e incremento da iluminação, observou-se aumento da razão carotenóides/clorofila *a* e biomassa celular. As células cessaram a divisão no segundo dia de estresse, quando o nitrato se tornou limitante e aumentaram significativamente seu biovolume. A excreção de carbono orgânico e a concentração de astaxantina também aumentaram, e ao final de 10 dias de estresse foram de $1,32 \times 10^{-3} \mu\text{g cel}^{-1}$ e $17,66 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente. Quando as culturas foram submetidas apenas ao aumento da intensidade luminosa não foram observados aumentos relevantes nos parâmetros avaliados, exceto a concentração celular. Estes resultados demonstram que o estresse por intensidade luminosa aliado a suplementação com CO₂ otimiza a carotenogênese em *H. pluvialis*, aumentando a produção de astaxantina.

Palavras-chave: excreção, astaxantina, CO₂, carbono orgânico dissolvido, microalga, carotenóide

CHAPTER 2 - CAROTENOGENESIS IN *Haematococcus pluvialis* CELLS: RESPONSES TO LIGHT AND NUTRIENT STRESS

ABSTRACT - This work aimed to evaluate the responses of *Haematococcus pluvialis* cells to carotenogenesis induction process, when subjected to stress by high light intensity (seven times the original) or the same stress combined with light supplementation with CO₂ (4%) in the aeration provided in the exponential growth phase. Was evaluated the concentration of astaxanthin, the carotenoids / chlorophyll *a* ratio, biomass and cell concentration, the nitrate and excretion of dissolved organic carbon. With a supplemental CO₂ and increase in lighting, there was an increase of the carotenoids / chlorophyll *a* ratio and cell biomass. The cells stopped dividing on the second day of stress, when nitrate became limiting and significantly increased their biovolume. The excretion of organic carbon and the concentration of astaxanthin also increased, and the final of 10 days of stress were $1.32 \times 10^{-3} \text{ g cel}^{-1}$ and 17.66 mg g^{-1} , respectively. When cultures were subjected only to the increase in light intensity was not observed significant increases in the assessed parameters except cell concentration. These results demonstrate that stress for light intensity combined with CO₂ supplementation optimizes carotenogênese *H. pluvialis*, increasing the production of astaxanthin.

Keywords: release, astaxanthin, CO₂, dissolved organic carbon, microalgae, carotenoid

1. INTRODUÇÃO

A microalga *Haematococcus pluvialis* vem despertando o interesse acadêmico e industrial há décadas, sendo reconhecida como um dos microrganismos que mais produzem astaxantina (BECKER, 2004). A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) é um pigmento vermelho amplamente utilizado na alimentação de peixes como salmão e truta, aves e suínos (CARDOZO et al., 2007). Tem sido apontada como um agente promotor de melhoras significativas no desempenho animal, sendo relatado o incremento de alguns parâmetros do sistema imunológico da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (AMAR et al., 2004). Igualmente, CUZON et al. (2004) demonstrou que o fornecimento de astaxantina na alimentação do camarão *Litopennaeus vannamei* proporcionou maior sobrevivência de larvas náuplios.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos visando o aumento do rendimento da produção de astaxantina durante o cultivo de *H. pluvialis* (SARADA et al., 2002). Grande parte dos resultados demonstra que a adição de mais de um fator estressante à célula aumenta, até devida proporção, a produtividade final deste carotenóide na biomassa (FABREGAS et al., 2003).

Dentre as formas mais funcionais de estresse celular podemos destacar a privação de nutrientes específicos, como o nitrogênio ou fósforo (FABREGAS et al., 2003; IMAMOGLU et al. 2009); adição de NaCl (KOBAYASHI et al., 1997); estresse oxidativo, promovido através da adição de ferro (KOBAYASHI et al., 1993); aumento da relação carbono/nitrogênio (C/N) disponível para a célula (KANG et al., 2007) e aumento da intensidade luminosa (WANG et al., 2003; TORZILLO et al., 2005).

Um ótimo desempenho no processo de carotenogênese invariavelmente está relacionado com o aumento substancial da intensidade luminosa. Esta relação positiva entre o incremento da iluminação e o desempenho da carotenogênese pôde ser observada em células submetidas a uma intensidade de $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (KANG et al., 2007), que nesse caso representou um aumento de 4 vezes o valor inicial da intensidade luminosa. Outros pesquisadores, ao trabalharem com uma intensidade

luminosa inicial de $75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, recomendaram um aumento no valor de 6 a 7 vezes o valor da irradiação inicial, nesse caso, $546 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (IMAMOGLU et al., 2009).

De outra forma, ao adicionarem acetato de sódio no meio de cultura de células de *Haematococcus pluvialis* no final da fase exponencial, GÖKSAN et al. (2010) obtiveram células encistadas (aplanósporos vermelhos) com um maior peso seco e maior concentração de pigmentos, demonstrando que a adição de uma fonte de carbono é benéfica nessa etapa de indução à carotenogênese. Resultados semelhantes foram obtidos por KOBAYASHI et al. (1993) quando adicionaram acetato de sódio em culturas na fase exponencial de crescimento.

Esses fatores indutores do aumento da síntese de astaxantina pela célula de *H. pluvialis* podem ser acompanhados através das alterações de alguns parâmetros fisiológicos e abióticos, como o aumento do tamanho e biomassa celular (CIFUENTES et al., 2003), da razão carotenóides/clorofila *a* (Car/Chl *a*) intracelular (KOBAYASHI et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1997; OROSA et al., 2005), ou ainda da razão C/N disponível para a célula (KOBAYASHI et al., 1997; KANG et al., 2007).

O carbono orgânico excretado pelas células do fitoplâncton desempenha papel fundamental no equilíbrio do ecossistema aquático, contribuindo com grande parte do carbono orgânico dissolvido neste ambiente. Muitos destes compostos apresentam propriedades de interesse industrial químico e farmacêutico (DUBINSKY & BERMAN-FRANK, 2001; CARDOZO et al, 2007). Sendo metabólitos primários possuem estreita relação com o processo de fotossíntese, podendo ser liberados de forma passiva (difusão de compostos como carboidratos, polissacarídeos, polipeptídeos, aminoácidos livres e ácidos orgânicos) ou ativa (secretados como enzimas extracelulares, sideróforos, etc.) (SIGEE, 2004). A excreção de carbono orgânico dissolvido pelas células também indica o estresse celular, visto que o aporte nutricional do meio afeta diretamente a quantidade e a composição do exsudato, sendo esta relação altamente espécie-específica (SIGEE, 2004).

Estudos relacionados à excreção de carbono orgânico pelas células de *H. pluvialis* são escassos, e o mecanismo de excreção da microalga estudada é pouco

conhecido. Também é escassa a fonte de informação sobre a relação da concentração de astaxantina e esta excreção. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar as respostas das células de *H. pluvialis* durante o processo de indução à carotenogênese quando submetida ao aumento da intensidade luminosa em sete vezes e adição de 4% de CO₂ na aeração fornecida na fase exponencial de crescimento celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo da microalga

A cepa axênica de *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1), proveniente da coleção da Universidade Federal Fluminense – RJ, foi cultivada em meio WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972), com pH 7,0 e a seguinte composição final: NaNO₃ (1,0 x 10⁻³ M), CaCl₂.2H₂O (2,5 x 10⁻⁴ M), MgSO₄.7H₂O (1,5 x 10⁻⁴ M), NaHCO₃ (1,5 x 10⁻⁴ M), K₂HPO₄ (5,0 x 10⁻⁵ M), Na₂SiO₃.9H₂O (1,0 x 10⁻⁴ M), tampão TRIS (0,5 g/L⁻¹); Solução de micronutrientes CuSO₄.5H₂O (4,01 x 10⁻⁸ M), ZnSO₄. (7,65 x 10⁻⁸ M), CoCl₂.6H₂O (4,20 x 10⁻⁸ M), MnCl₂.4H₂O (9,10x 10⁻⁷ M), Na₂MoO₄.2H₂O (2,48 x 10⁻⁸ M), H₃BO₃ (1,62x 10⁻⁵ M); Solução de Ferro e EDTA (FeCl₃.6H₂O = 1,17 x 10⁻⁵ M e Na₂EDTA.2H₂O = 1,17 x 10⁻⁵ M) e Solução de vitaminas (mg L⁻¹ de água destilada): Tiamina/HCl= 0,1 ; Biotina= 0,0005; Vitamina B₁₂ = 0,0005.

Durante 15 dias, tempo necessário para a cultura atingir a fase exponencial, as células foram aclimatadas nas condições descritas a seguir, as quais foram determinadas em ensaios prévios: frascos com capacidade de 1L, contendo inicialmente 900 mL de meio WC, e aeração com ar atmosférico sintético filtrado com fluxo de 100 mL min⁻¹, receberam células de *H. pluvialis* numa concentração final de 10⁴ céls mL⁻¹. As culturas foram mantidas em intensidade luminosa de 50 μmol photons m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 12hs claro/ 12hs escuro e temperatura de 23°C.

No 16° dia a concentração foi de 5,25 x 10⁴ céls mL⁻¹, e os cultivos foram distribuídos em frascos contendo 500 mL de cultura, para constituir dois tratamentos. No primeiro a intensidade luminosa foi alterada para 350 μmol photons m⁻² s⁻¹, mantendo o fotoperíodo, a aeração e temperatura. No segundo, além do aumento da iluminação na mesma proporção, a aeração nos cultivos foi substituída por uma mistura

gasosa (semelhante ao ar atmosférico) contendo 4% de CO₂, sendo mantido o fluxo de aeração (100 mL min⁻¹), fotoperíodo e a temperatura. Essas condições de estresse foram mantidas durante 10 dias.

Os tratamentos foram conduzidos em triplicada. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, e a taxa de crescimento específica (μ) determinada de acordo com a seguinte equação: $\mu = (3,322/(T_2 - T_1)) \cdot (\text{Log } N_2/N_1)$, onde μ = velocidade de crescimento; 3.322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10; (T₂ - T₁) = intervalo de tempo em dias; N₁ = densidade celular inicial; N₂ = densidade celular final; Log = Logaritmo em base 10. A velocidade ou taxa de crescimento específica de cada unidade experimental foi obtida considerando o dia de cultivo no qual a população alcançou a máxima densidade celular.

A biomassa seca foi determinada através da filtração de alíquotas de 10 mL em filtros de fibra de vidro (1,2 μm), previamente incinerados em mufla e calibrados. O cálculo da biomassa seca (células mL⁻¹; $\mu\text{g célula}^{-1}$) foi realizado após a secagem dos filtros em estufa à 60°C durante 3 horas, usando uma balança analítica Mettler-Toledo AT21 Comparator, a qual possui uma precisão de 6 casas decimais.

2.2. Mensuração da excreção de carbono orgânico dissolvido e nitrato (N-NO₃) dissolvido

Para determinação da quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) e nitrato dissolvido nos cultivos, 5 mL de amostra foi filtrada em filtros de acetato estéreis com diâmetro de poro de 0,22 μm durante todo o período experimental.

O carbono orgânico dissolvido foi mensurado através do aparelho Total Organic Analyzer, TOC-V CPH Shimadzu. O nitrato foi determinado através da reação colorimétrica segundo MACKERETH (1978).

2.3. Carotenogênese

Para quantificação de clorofila a e carotenóides totais, amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro (1,2 μm) e maceradas em acetona a 90% durante a fase de aclimatação. Durante a etapa em que as células foram submetidas a fatores

estressantes, a extração dos pigmentos foi realizada com uma solução 50% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) e acetona 90%. As amostras permaneceram no escuro, durante 24hs, refrigeradas a 4°C. A determinação foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 480, 665 e 750 nm.

A quantidade celular dos carotenóides totais e da clorofila a foi calculada através da fórmula descrita por STRICKLAND & PARSONS (1968). A maturação celular foi acompanhada através da razão intracelular carotenóide/clorofila a (Car/Chl a) (KOBAYASHI et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1997), a qual distingue células vegetativas (verdes), cistos imaturos (marrom) e cistos maduros (vermelhos).

2.4. Determinação da astaxantina

Ao final do experimento (25° dia de cultivo), as culturas foram centrifugadas a 3500 x g, a 10°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células concentradas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e liofilizadas.

A extração dos pigmentos foi realizada com DMSO (Sigma- Aldrich), aquecido a 50° C, e as amostras homogeneizadas em vortex a cada 10 minutos durante a incubação (LORENZ, 2001).

A concentração de astaxantina foi determinada por técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), equipado com bombas LC – 10ATVP (Shimadzu) e detector UV-VIS SCL-10AVP (Shimadzu). Os extratos foram separados utilizando uma coluna analítica LUNA C18, 100A – 250 x 4,6 mm, 5µm, com fluxo de 1mL. min⁻¹. Foram injetados 50 µL de amostra do tratamento em que as culturas foram expostas apenas à maior iluminação, e 20 µL de amostra do tratamento em que, além do aumento da intensidade luminosa foi adicionado 4% de CO₂ a aeração. Os pigmentos foram separados em condições de gradiente com o uso de solução A (acetato de amônia: metanol - 20:80 v/v) e B (acetona:metanol - 20:80 v/v), e a corrida seguiu com o gradiente: 0 min 40% A, 60% B; 10 min 20% A, 80% B; 20 min 20% A, 80% B; 22 min 0% A, 100% B; 32 min 0% A, 100% B; 40 min 40% A, 60% B; 55 min 40% A, 60% B.

A coluna foi calibrada com padrão de astaxantina livre (Sigma-Aldrich / A9335, 98% de pureza). Picos correspondentes ao espectro de absorção da astaxantina livre

foram mensurados em 478 (± 4) nm (BRITTON, 1995) e considerados como astaxantina não hidrolisada. O software utilizado para quantificação dos picos de astaxantina foi LC10, e a equação da linearidade obtida foi $y=7E+06x-186457$. Os valores da quantificação de astaxantina por HPLC são apresentados como o total de equivalentes de astaxantina por grama de massa seca celular.

2.5. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e as análises realizadas através do programa estatístico SAS 8.0. (2001). Foi aplicada uma análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias das triplicatas comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

A aclimação da cultura de *Haematococcus pluvialis* foi realizada com intuito de que as respostas fisiológicas e metabólicas das células demonstrassem maior eficiência quando expostas aos fatores estressantes. No início do cultivo (primeiros 15 dias), a máxima densidade celular obtida foi de $4,45 \times 10^4$ céls mL⁻¹ e a taxa de crescimento específica (mensurada no 15° dia de cultivo) foi de $\mu=0,24$. Nessa etapa inicial, a densidade celular e o aumento da biomassa da alga apresentaram um desempenho semelhante (Figura 1A e B), e a razão carotenóides/clorofila \underline{a} (Car/Chl \underline{a}) sofreu pouca modificação, se mantendo próximo a 0,3 durante o período de crescimento e aclimação (Figura 2A). Houve pequena variação na quantidade de carbono excretado pelas células (Figura 2C), decorrente do aumento da quantidade de células.

A partir do 16° dia de cultivo, as células de *H. pluvialis* expostas às duas condições estressantes apresentaram respostas distintas. Na situação em que as culturas foram expostas apenas à maior iluminação, as células continuaram em fase vegetativa e houve um aumento gradual na concentração celular, atingindo a máxima densidade ($14,44 \times 10^4$ cél mL⁻¹) no último dia de cultivo. No tratamento em que, além do aumento da intensidade luminosa foi adicionado 4% de CO₂ a aeração, a concentração celular atingida foi $8,88 \times 10^4$ cél mL⁻¹ (Figura 1A).

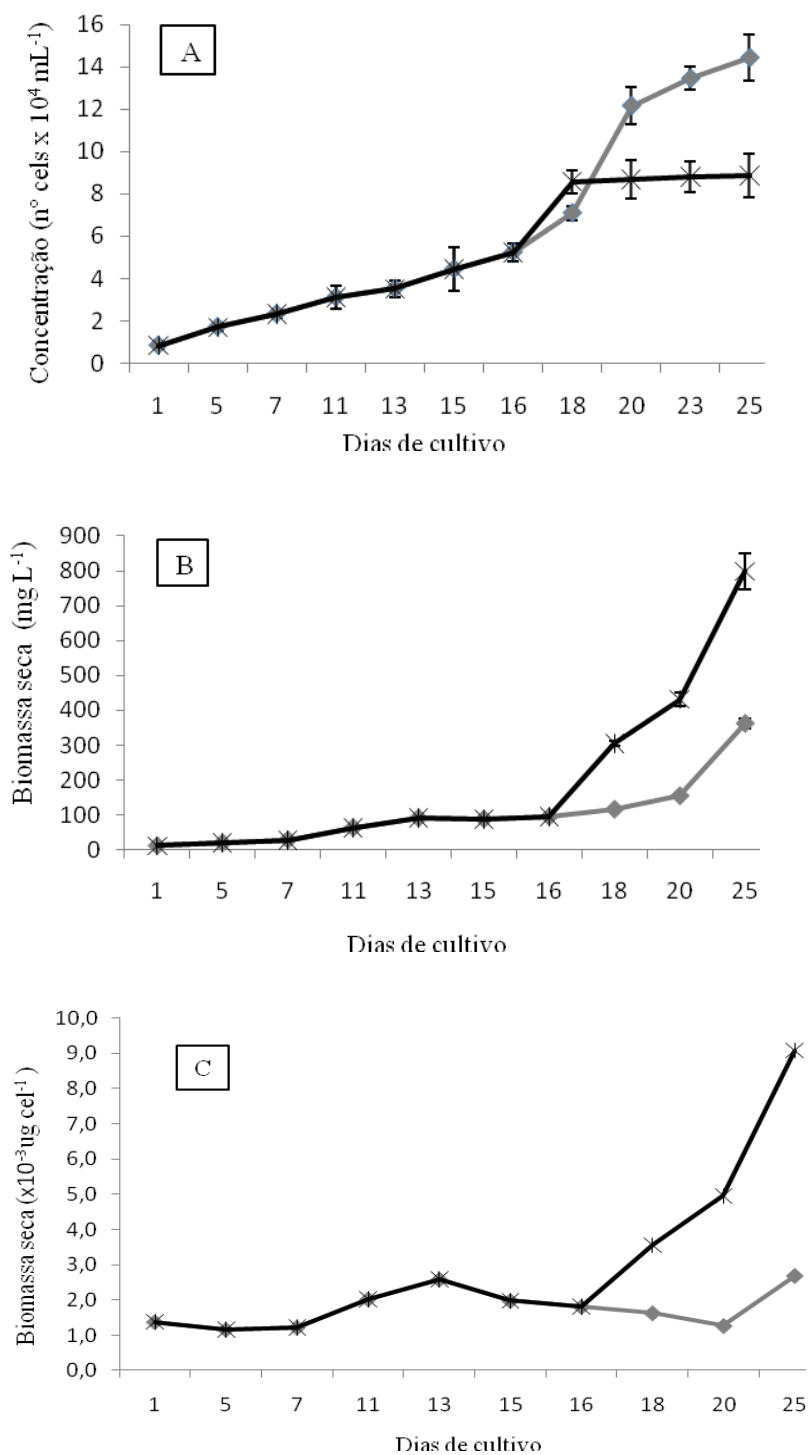


Figura 1. Valores médios de concentração celular (A), biomassa (B) e massa seca celular (C) obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis* expostos à 350 μmol photons m⁻² s⁻¹ (♦) e a 350 μmol photons m⁻² s⁻¹ combinado com 4% de CO₂ (+), durante 25 dias.

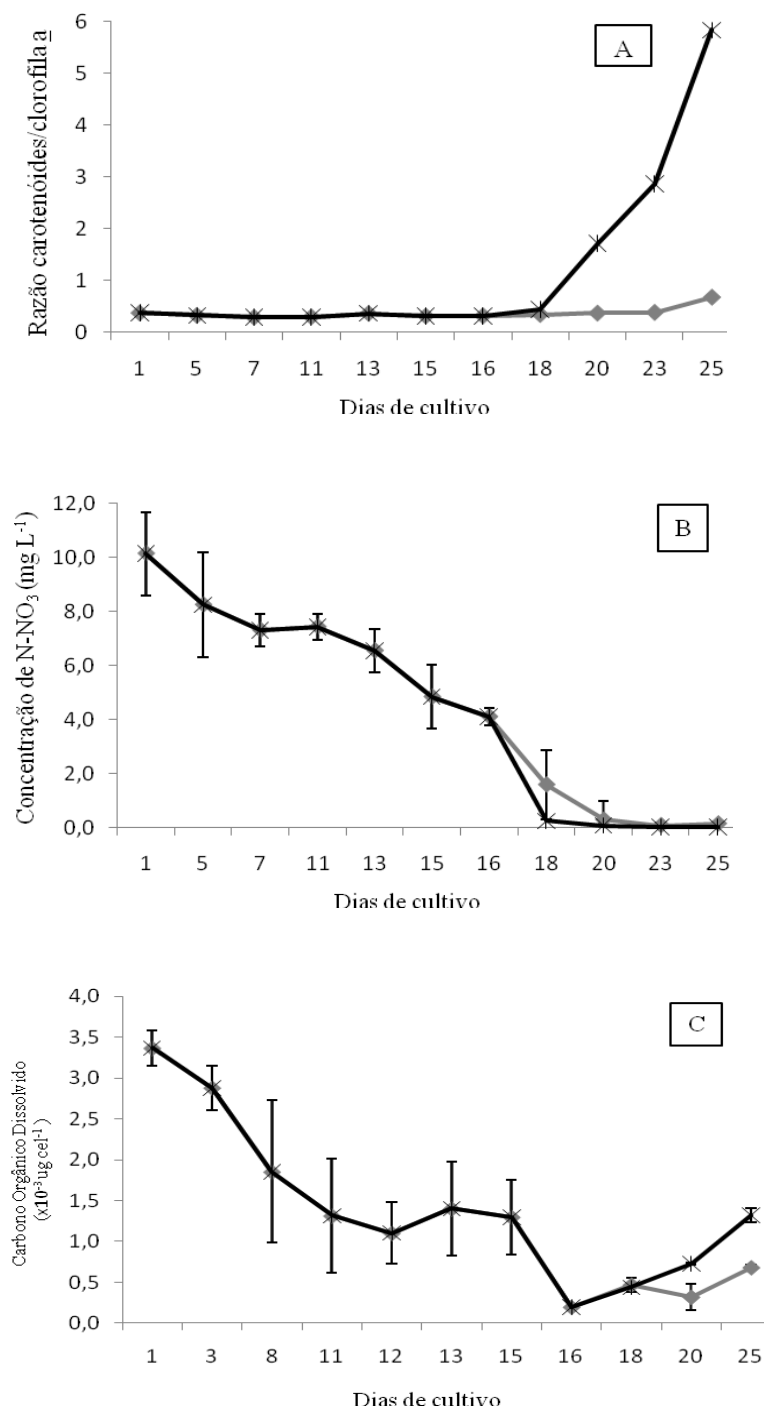


Figura 2. Valores médios da razão carotenóides/clorofila *a* (A), concentração de nitrato no meio (N-NO₃) (B) e carbono orgânico dissolvido (COD) (C) obtidos nos cultivos expostos à 350 μmol photons m⁻² s⁻¹ (◆) e 350 μmol photons m⁻² s⁻¹ combinado com 4% de CO₂ (*), durante 25 dias.

Com a adição de CO₂ nos cultivos, houve um pequeno incremento na concentração celular, porém a reprodução foi interrompida no segundo dia de estresse (18° dia de cultivo), quando a quantidade de nitrato tornou-se um fator limitante (Figura 2B). Esses fatores estressantes induziram a uma mudança morfológica das células, que perderam seus flagelos e começaram a se encistar, adquirindo a coloração avermelhada. O volume e tamanho celular começaram a aumentar significativamente o que foi traduzido em uma produtividade final de biomassa que foi 798,3 mg L⁻¹ no 25° dia de exposição aos fatores de estresse (Figuras 1C e B).

A razão Car/Chl a de ambos os tratamentos começou a diferir a partir do segundo dia de estresse (Figura 2A). O valor observado foi de 5,83 no último dia de cultivo nas culturas em que houve um aumento da relação C/N no meio, enquanto que no tratamento com alteração apenas da quantidade de luz a razão final foi 0,67.

Do mesmo modo, o consumo da fonte de nitrogênio foi diferenciado entre os cultivos. Quando adicionado 4% de CO₂ na aeração, houve uma rápida depleção do nitrato no meio, e os resultados demonstraram deficiência desse nutriente logo no segundo dia de estresse (Figura 2B). No tratamento condicionado apenas pelo aumento de iluminação, essa condição foi observada no oitavo dia de estresse. As variações na concentração de nitrato condicionaram diferentes razões C/N entre os tratamentos. As razões C/N consideradas no 16°, 18°, 20° e 25° dia de experimento foram respectivamente 1,47; 5,03; 23,38; 50,43 para o tratamento em que as culturas foram expostas apenas à maior iluminação, e 5,39; 90,08; 305,75; 749,37 para a condição em que, além do aumento da intensidade luminosa foi adicionado 4% de CO₂ a aeração.

Os resultados observados na Tabela 1 apontam uma diferença significativa na quantidade de nitrato presente nos diferentes tratamentos ao final do experimento. A taxa de excreção de carbono orgânico dissolvido/célula aumentou exponencialmente em ambos os tratamentos logo após as células serem submetidas aos fatores estressantes (Figura 2C). Os resultados da Tabela 1 evidenciam que, ao final do experimento, a quantidade de carbono orgânico dissolvido presente nos cultivos de *H. pluvialis* em que foi fornecido CO₂ na aeração, foi maior ($p \leq 0,05$) do que nos cultivos de células expostas somente ao aumento de iluminação.

A quantificação da astaxantina corroborou com os demais parâmetros apresentados. O teor de astaxantina obtido (mg eq. astax /g células) foi 17,66 mg g⁻¹ para o tratamento em que adicionalmente foi fornecido 4% de CO₂ na aeração e 4,15 mg g⁻¹ para a repetição que sofreu apenas estresse luminoso (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de nitrato (N-NO₃), carbono orgânico dissolvido (COD) e astaxantina quantificados no 10^o dia de estresse (25^o dia de experimento), em cultivos de *Haematococcus pluvialis*. Médias seguidas do desvio padrão.

Tratamento	N-NO₃ dissolvido (mg L⁻¹)	Carbono orgânico dissolvido (x 10⁻³ µg cel⁻¹)	Astaxantina (mg eq. astax /g de células)
350 µE photons m ⁻² s ⁻¹	0,14 ± 0,041 ^A	0,68 ± 0,03 ^B	4,15 ± 0,09 ^B
350 µE photons m ⁻² s ⁻¹ + 4% de CO ₂	0,03 ± 0,003 ^B	1,32 ± 0,09 ^A	17,66 ± 1,22 ^A
Teste F	133,02*	111,7*	722,83*
CV (%)	14,27	7,62	7,98

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente (Tukey p≥0,05).

* Significativo a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A baixa concentração celular e taxa específica de crescimento obtidas em cultivos dessa espécie de microalga foram relatadas em diversos estudos e nas mais variadas condições experimentais (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004; OROSA et al., 2005). Trabalhando com o mesmo fotoperíodo e iluminação aplicados nesse estudo durante a fase de aclimatação, KANG et al. (2005) obtiveram valores máximos de $\mu=0,23$ dia⁻¹. Ao cultivarem células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* em meios alternativos contendo acetato de sódio, com fotoperíodo semelhante e iluminação de 50 µmol photons m⁻² s⁻¹, KOBAYASHI et al., (1993) alcançaram valores excepcionais de concentração celular, próximos a 55 x 10⁴ células mL⁻¹. Contudo, essa fonte de

carbono propicia um ambiente favorável a contaminação bacteriana, e por esse motivo o cultivo mixotrófico ainda é um ponto muito questionado por diversos autores (KOBAYASHI et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1997). Além disso, a aplicação de CO₂ como fonte de carbono é mais barata devido à disponibilidade a partir da fermentação nas usinas produtoras de etanol.

Nas culturas em que foi aplicado apenas um fator estressante, foi observado um acréscimo na taxa de crescimento logo após o aumento na intensidade luminosa (16° dia de cultivo). Nesse tratamento o crescimento vegetativo se estendeu até o último dia de experimento, quando a razão Car/Chl a apresentou um pequeno aumento.

O início do processo de carotenogênese em células induzidas através da adição de 4% de CO₂ a aeração aliado ao aumento da intensidade luminosa foi evidenciado no segundo dia de estresse (18° dia de cultivo), quando foi observado o esgotamento da fonte de nitrogênio, o cessamento da divisão celular, e a massa seca celular aumentou gradativamente.

Condicionada pelo aumento da relação C/N no meio, no 18° dia de cultivo também pôde ser observado que a razão Car/Chl a aumentou rapidamente, coincidindo com a depleção do nitrato no meio. Esse comportamento também foi reportado por OROSA et al. (2005), que demonstrou que as células apresentaram um rápido aumento da razão Car/Chl no momento em que houve deficiência de nitrato no meio de cultivo. Adicionalmente, KOBAYASHI et al. (1997) e JEON et al. (2006) comprovaram que manipulação da relação C/N para produção de astaxantina somente é eficaz na presença de luz.

A taxa de excreção celular de COD teve um incremento contínuo a partir do momento em que as culturas receberam um estresse luminoso aliado a suplementação com CO₂, contudo, esse gradiente foi menor em culturas que receberam apenas estresse luminoso. Nesse caso, acréscimo substancial na taxa de excreção de carbono foi observado no 20° dia de cultivo, período que coincidiu com a depleção do nitrogênio (N-NO₃).

Os organismos fitoplanctônicos podem liberar para o meio ambiente quantidades de carbono orgânico dissolvido derivado diretamente da fotossíntese, seja de forma

ativa ou passiva (SIGEE, 2004). Fatores de estresse, como depleção de nutrientes e outros que incrementem a fotossíntese, mas não a citocinese, aumentam as taxas de excreção de carbono orgânico dissolvido (DUBINSKY & BERMAN-FRANK, 2001). De fato, quando as condições ideais de crescimento foram mantidas, a quantidade de carbono excretado foi relativamente constante. Portanto, os aumentos das taxas de excreção nas culturas comprovam o efeito de stress causado pelo aumento da intensidade de luz e do CO₂.

Contudo, células expostas a condições nas quais os nutrientes tornam-se limitante, porém com o aparelho fotossintético ainda ativo, aumentam sua taxa de excreção por não haver divisão celular, sendo o carbono assimilado em excesso eliminado por difusão. A quantidade de carbono excretado pelas células varia muito de acordo com as espécies estudadas, ambiente em que estão expostas, estado fisiológico e tamanho da célula (DUBINSKY & BERMAN-FRANK, 2001).

A inexistência de dados na literatura especificamente sobre a espécie de microalga estudada, *H. pluvialis*, dificulta a comparação da taxa de excreção de carbono celular apresentada desse estudo. No entanto, a excreção de COD foi efetivamente maior nas culturas em que a síntese de astaxantina foi induzida através da manipulação da relação C/N aliada ao aumento da irradiação. A eficiência desta forma de estresse foi confirmada com a quantidade significativamente maior de astaxantina produzida nesse tratamento (1,77%) comparada com o estresse apenas luminoso (0,41%).

Parte do carbono absorvido é utilizado para acumular reservas, na forma de compostos nitrogenados ligados a cadeia de carbonos – como exemplo os carotenóides, que nesse caso servirão principalmente como proteção à célula (DUBINSKY & BERMAN-FRANK, 2001). Considerados como pigmentos acessórios, os carotenóides são fundamentais na transferência de energia no fotossistema II, e de acordo com WANG et al. (2003) as células de *H. pluvialis* mantém sua função PSII durante a fase de carotenogênese, mantendo a fixação de carbono inorgânico através da atividade fotossintética.

Em situações de estresse, a atividade do fotossistema I (PSI) é reduzida, e o O₂ gerado no PSII continua a ser eliminado e acumulado, podendo rapidamente ser convertido em H₂O₂ e HO (WANG et al., 2003). Essas formas reativas de oxigênio, conhecidas como ROS (reactive oxygen species), podem causar diversos danos irreversíveis às células como, por exemplo, destruição de membranas ou inibição da atividade enzimática. Assim, como mecanismo de defesa, a célula de *H. pluvialis* produz a astaxantina, um composto antioxidante que inibe os danos causados pelo ROS gerado. KOBAYASHI et al. (1993) concluíram que a carotenogênese é uma resposta da célula mediada pelo ROS.

Nesse contexto, o aumento na excreção de carbono dissolvido comprova que a atividade fotossintética é mantida, gerando excesso de O₂, que por sua vez induz a um processo de biosíntese e acúmulo de astaxantina. Alguns autores sugerem ainda que o estresse gerado pela depleção de nutrientes é a forma mais efetiva de geração de ROS, o que leva a uma forma eficaz de indução à carotenogênese (WANG et al., 2003).

5. CONCLUSÕES

A síntese de astaxantina, a biomassa seca final e a excreção de carbono orgânico dissolvido por *H. pluvialis* são maiores quando aplicado o estresse luminoso em combinação com adição de 4% de CO₂ na fase exponencial de crescimento.

O aumento da taxa de excreção de carbono orgânico pelas células está diretamente relacionado à efetividade do estresse quando aplicado os dois fatores de indução à carotenogênese.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio de Oliveira Lourenço, do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (UFF), pela doação da cepa de *Haematococcus pluvialis*.

7. REFERÊNCIAS

AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p.527-537, 2004.

BECKER, W. Microalgae for aquaculture – The nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, 2004. p. 380 - 391.

BRITTON, G. UV/Visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Ed) **Carotenoids. Volume 1 B: Spectroscopy**. Birkhauser Verlag, Basel, 1995. 57p.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.60–78, 2007.

CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZÁLEZ, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. **Biology Reserch**, v.36, p.343-357, 2003.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutricion of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v.235, p.513-551, 2004.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R.; LEGARRETA, I.G; JERONIMO, F.M.; CAMPOCOSIO, A.T. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresources Technology**, v.92, p.209–214, 2004.

DUBINSKY Z.; BERMAN-FRANK, I. Uncoupling primary production from population growth in photosynthesizing organisms in aquatic ecosystems. **Aquatic Science**, v.63, p.4–17, 2001.

FABREGAS, J.; DOMINGUEZ, A.; MASEDA, A.; OTERO, A. Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.545–551, 2003.

GÖKSAN, T.; AK, L.; GÖKPINAR, S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.1276–1282, 2010.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidae. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

IMAMOGLU, E.; DALAY, M.C.; SUKAN, F.V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **New Biotechnology**, v.26, p.199-204, 2009.

JEON, Y.C.; CHO, C.W.; YUN, Y.S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.490-495, 2006.

KANG, C.D.; LEE, J.S.; PARK, T.H.; SIM, S.J. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.68, p.237– 241, 2005.

KANG, C. D. ; LEE, J. S.; PARK, T. H.; SIM, S. J. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p.987–994, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.867-873, 1993.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, N.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI, V. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.48, p.351–356, 1997.

LORENZ, R.T. **HPLC and spectrophotometric analysis of carotenoids from *Haematococcus algae powder***. Cyanotech Corporation, n.15, 2001. 10p.

MACKERETH, F.J.H.; HERON, J.; TALLING, J.F. **Water analysis: Some revised methods for limnologist**. Freshwater Biological Association. Scientific Association. Kendall: Titus Wilson & Son Ltd., 1978. 117p.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v.96, p.373-378, 2005.

SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v.37, p.623–627, 2002.

SAS INSTITUTE. SAS® user's guide: statistics, versão 8.0. Cary, 2004.

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment**. Wiley, 2004. 524p.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. Pigment analysis. In: STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. (Ed) **A practical handbook of seawater analysis**. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Ontario, Canada, 1968. p.185-206.

TORZILLO, G.; GOKSAN, T.; ISIK O.; GOKPINAR, S. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition

in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **European Journal of Phycology**, v.40, p.233-240, 2005.

WANG, B.; ZARKA, A.; TREBST, A., BOUSSIBA, S. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active protective process under high irradiance. **Journal of Phycology**, v.39, p.1116–1124, 2003.

CAPÍTULO 3 - CULTIVO CONSORCIADO DE *Haematococcus pluvialis* COM *Azospirillum brasilense* VISANDO AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA PELA MICROALGA

RESUMO - A microalga *Haematococcus pluvialis* é conhecida como o microrganismo que apresenta maior rendimento final de astaxantina em sua biomassa, quando induzida a fatores de estresse celular eficientes. Contudo ainda apresenta uma taxa de crescimento intrínseca que proporciona uma baixa densidade celular ao final dos cultivos. Neste sentido, este estudo teve por objetivo promover o aumento de biomassa vegetativa da microalga através da adição da bactéria promotora de crescimento em plantas, *Azospirillum brasilense* V6, estirpe produtora do fito hormônio ácido indol-acético (AIA), visando obter maior rendimento final de astaxantina. O desenho experimental foi conduzido com 6 tratamentos, tendo três deles a adição de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano e três sem adição deste aminoácido, para controle. O experimento foi conduzido durante 25 dias, sendo nos primeiros 15 dias avaliados a máxima densidade celular obtida, clorofila a, biomassa seca, e a quantificação do AIA e nitrato no meio de cultivo. Após esse período, as células foram expostas a combinação de fatores estressantes durante 10 dias, para indução à carotenogênese. Ao final, foi mensurada a quantidade de astaxantina na biomassa obtida. Durante a fase vegetativa de crescimento, não foi observada diferença significativa da máxima densidade celular e concentração de clorofila a, entre os tratamentos contendo a microalga; contudo houve diferença na concentração final de nitrato dissolvido. Após o período de estresse os valores de astaxantina na biomassa também apresentaram uma diferença estatística, e as concentrações do pigmento foram $17,66$ e $13,62 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente, para as culturas controle contendo apenas microalgas e para as culturas consorciadas com adição de triptofano. O cultivo da microalga *H. pluvialis* consorciado com a bactéria *A. brasilense* V6, na presença do hormônio ácido indol-acético, não promoveu um aumento do crescimento celular microalgal e nem da quantidade de astaxantina na biomassa submetida a fatores de estresse celular.

Palavras-chave: rizobactéria promotora de crescimento, carotenóide, carotenogênese, ácido indol acético

CHAPTER 3 - CONSORTED CULTIVATION OF *Haematococcus pluvialis* AND *Azospirillum brasiliense* AIMING TO INCREASE BIOMASS AND ASTAXANTHIN PRODUCTION BY MICROALGAE

ABSTRACT - The microalgae *Haematococcus pluvialis* is known as the microorganism that has a highest final yield of astaxanthin in its biomass, when induced by efficient stress factors. However, still has intrinsic growth rate that provides a low cell density in the culture. Thus, this study aimed to promote increased vegetative biomass of microalgae by the addition of promoting growth bacteria in plants, *Azospirillum brasiliense* V6, producing strains of the phyto hormone IAA (indole-acetic acid), to obtain higher final yield of astaxanthin. The experimental design was conducted with six treatments, three of them with the addition of 100 mg mL⁻¹ of tryptophan and three without addition of this amino acid to control. The experiment was conducted for 25 day, in the first 15 days was evaluated the maximum cell density obtained, chlorophyll a, biomass, and quantification of IAA and nitrate in the culture medium. After this period, cells were exposed to a combination of stress factors for 10 days, for induction of carotenogenesis. In the end of experiment, was measured the amount of astaxanthin in the biomass obtained. During the vegetative stage of growth, there was no significant difference in maximum cell density and chlorophyll a concentration among the treatments containing microalgae; however has difference in the final concentration of dissolved nitrate. After the period of stress the values of astaxanthin in the biomass also showed a statistical difference, and the pigment concentrations were 17.66 and 13.62 mg g⁻¹, respectively, for control cultures containing only microalgae, and for consorted cultures with tryptophan added. The cultivation of microalgae *H. pluvialis* consorted with the bacterium *A. brasiliense* V6 in the presence of the hormone indole-acetic acid, did

not promote an increase in the microalgal cell growth and astaxanthin amount, in the biomass submitted to cellular stress factors.

Keywords: growth promoting bacteria, carotenoid, carotenogenesis, indole-acetic acid

1. INTRODUÇÃO

A microalga *Haematococcus pluvialis* é mundialmente reconhecida por sua capacidade de sintetizar e acumular grande quantidade do carotenóide astaxantina em sua biomassa (BECKER, 2004). Possui um ciclo de vida complexo, que compreende uma fase vegetativa com células verdes flageladas, que em condições estressantes perdem seu flagelo e encistam, alterando sua coloração para vermelho devido ao acúmulo de astaxantina em sua célula.

Apresenta uma característica de crescimento desfavorável quando comparada a outras espécies de microalgas cultivadas em escala comercial, visto que possui uma taxa de crescimento intrínseca que proporciona uma baixa densidade celular ao final dos cultivos (HAGEN et al., 2001; OROSA et al., 2001). Nesse ponto, a desvantagem está relacionada a produção de uma reduzida biomassa celular que acumulará astaxantina, resultando em um rendimento final do pigmento relativamente menor. Diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de otimizar a obtenção de biomassa vegetativa, contudo o foco principal está na manipulação de fatores já conhecidos, como nutrientes, temperatura, fotoperíodo e intensidade de luz (HARKER et al., 1996; HAEGEN et al., 2001).

O aumento do crescimento vegetativo de microalgas através do consórcio com bactérias promotoras de crescimento tem sido reportado para poucas espécies de clorofíceas, muitos deles aplicando a bactéria *Azospirillum* ssp. (GONZALEZ & BASHAN, 2000; de-BASHAN et al., 2005). O maior interesse neste aspecto está

relacionado à secreção por esta bactéria, de hormônio que promove o desenvolvimento da microalga resultando em maior crescimento.

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento e influenciam diretamente nos processos fisiológicos. O ácido indol-acético (AIA), hormônio secretado pela bactéria *Azospirillum brasilense* (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000), é a auxina natural mais comum encontrada em plantas. Em microalgas, os fitohormônios podem levar a um aumento da população, da concentração de clorofila, tamanho celular e concentração de lipídeos (CZERPAK et al., 1999; de BASHAN et al., 2002).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi promover o aumento da densidade celular de *H. pluvialis* através do cultivo em consórcio com a bactéria produtora do hormônio AIA, *A. brasilense*, visando maior rendimento final da biomassa e do pigmento astaxantina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo da microalga

O inóculo da cepa axênica de *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1), proveniente da coleção da Universidade Federal Fluminense – RJ, foi cultivado e mantido em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972), com pH 7,0 e a seguinte composição final: NaNO_3 ($1,0 \times 10^{-3}$ M), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($2,5 \times 10^{-4}$ M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,5 \times 10^{-4}$ M), NaHCO_3 ($1,5 \times 10^{-4}$ M), K_2HPO_4 ($5,0 \times 10^{-5}$ M), $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-4}$ M), tampão TRIS ($0,5 \text{ g L}^{-1}$); Solução de micronutrientes $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($4,01 \times 10^{-8}$ M), ZnSO_4 ($7,65 \times 10^{-8}$ M), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($4,20 \times 10^{-8}$ M), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($9,10 \times 10^{-7}$ M), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($2,48 \times 10^{-8}$ M), H_3BO_3 ($1,62 \times 10^{-5}$ M); Solução de Ferro e EDTA ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 1,17 \times 10^{-5}$ M e $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 1,17 \times 10^{-5}$ M) e Solução de vitaminas (mg L^{-1} de água destilada): Tiamina/HCl = 0,1 ; Biotina = 0,0005; Vitamina B₁₂ = 0,0005. Culturas com 6 dias de idade foram utilizadas como inóculo para o experimento em consórcio com a bactéria.

2.2. Cultivo da bactéria

A estirpe de *Azospirillum brasilense* V6 (AbV6), cedida pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), foi cultivada em 50 mL de meio de cultura DYGS, composto de Glicose (2g L^{-1}), Peptona ($1,5\text{g L}^{-1}$), Extrato de Levedura ($2,0\text{g L}^{-1}$), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5\text{ L}^{-1}$), Acido Glutâmico ($1,5\text{ L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5\text{g L}^{-1}$); com pH 6,8, no escuro, a $30\text{ }^\circ\text{C}$ e agitação constante de 150 rpm.

Em experimento prévio, a curva de crescimento e quantificação da concentração celular correspondente foram estabelecidos a partir de uma curva padrão de absorbância (densidade ótica de 600 nm), com o ajuste da densidade bacteriana pela adição de solução salina a 0,85%. A quantidade de células foi determinada por diluições seriadas seguida de plaqueamento e determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Partindo desse padrão, o inóculo da bactéria foi adicionado quando a densidade ótica estava próxima a 0,9 ($\text{DO}_{600}=0,9$), sendo a quantificação conferida através do plaqueamento e contagem do número de UFC mL^{-1} da bactéria.

2.3. Cultivo consorciado dos microrganismos

O experimento foi conduzido em frascos com capacidade de 1L, contendo inicialmente 900 mL de meio WC suplementado com $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano, pH 7,0 e aeração (ar atmosférico sintético filtrado) com fluxo de 100 mL min^{-1} . O meio de cultura contido nos frascos foi inoculado com 10^4 céls mL^{-1} de *H. pluvialis* e $204.500\text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. brasilense* V6, sendo essa a quantificação bacteriana considerada como a do dia 0 (zero). Essas concentrações iniciais foram determinadas em ensaios prévios, baseados nos estudos realizados por GONZALEZ & BASHAN (2000) e de-BASHAN et al. (2008). As culturas foram mantidas em intensidade luminosa de $50\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 12hs e temperatura de 23°C durante 15 dias. A suplementação com triptofano foi necessária, pois, de acordo com STEENHOUDT & VANDERLEYDEN (2000) e de-BASHAN et al. (2008), esse aminoácido é precursor dos compostos indólicos secretados pelas bactérias.

O desenho experimental foi conduzido com 6 tratamentos, tendo três deles a adição de triptofano e três sem adição deste aminoácido, para controle. Os tratamentos estão representados por: T1 – cultivo apenas da microalga; T2 – cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano; T3 – cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano; T4 – cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano; T5 – cultivo apenas da bactéria; T6 – cultivo da bactéria em meio suplementado com triptofano. O tratamento T2 foi conduzido para certificação de que o hormônio ácido indol-acético (AIA) não seria produzido pela microalga e o T4 teve como objetivo comprovar o efeito do AIA produzido pela bactéria sobre a microalga. Dois controles negativos (T5 e T6 - ausentes de células da microalga) foram realizados para certificação da produção de AIA pelas bactérias em meio WC.

Essa primeira etapa do experimento foi conduzida durante 15 dias. No 16º dia, os cultivos referentes aos tratamentos T1 e T3 foram expostos a fatores de estresse celular para indução das células de microalga a síntese de astaxantina. Para isso, a intensidade luminosa foi alterada para $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a aeração nos cultivos foi substituída por uma mistura gasosa (semelhante ao ar atmosférico) contendo CO_2 (4%), sendo mantido o fluxo de aeração (100 mL min^{-1}), fotoperíodo e a temperatura. Essas condições de estresse foram mantidas durante 10 dias. No final do experimento (25 dias de cultivo), foi determinada a quantidade de astaxantina na biomassa.

2.4. Parâmetros mensurados

Crescimento vegetativo

Os tratamentos e análises foram conduzidos em triplicada. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, e a taxa de crescimento específica (μ) determinada de acordo com STEIN (1973). A biomassa seca foi determinada através da filtração de alíquotas de 10 mL em filtros de fibra de vidro ($1,2 \mu\text{m}$), previamente incinerados em mufla e calibrados. O cálculo da biomassa seca (mg L^{-1}) foi realizado

após a secagem dos filtros em estufa à 60°C durante 3 horas. A balança utilizada foi Mettler-Toledo AT21 Comparator, com precisão de 5 casas decimais.

Para quantificação de clorofila *a*, 5 mL foram filtrados em filtros de fibra de vidro (1,2 µm) e maceradas em acetona a 90%. As amostras permaneceram no escuro, durante 24hs, refrigeradas a 4°C. A leitura foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 665 e 750 nm. A quantidade celular foi calculada através da fórmula descrita por LORENZEN (1967).

Para mensuração da quantidade de nitrato dissolvido nos cultivos, 5 mL de amostra foi filtrada em filtros de acetato estéreis com diâmetro de poro de 0,22 µm durante todo o período experimental. O nitrato (N-NO₃) foi determinado através da reação colorimétrica segundo MACKERETH (1978).

A determinação do número de UFC foi realizada após 0, 10 e 15 dias de cultivo. Para contagem e quantificação, amostras foram diluídas em série (solução salina a 0,85%) e semeadas em placas contendo meio DYGS adicionada de Agar (9g L⁻¹), incubadas durante 72hs a 30°C, no escuro.

A quantificação de ácido indol-acético presente nos cultivos foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito por GORDON e WEBER (1951). Após 0, 5, 7, 9, 13 e 15 dias de cultivo, uma alíquota de 2 mL foi retirada de cada tratamento e centrifugada durante 10 minutos, a 7.000 x g e temperatura de 15°C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada repetição foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkolwisk (1 mL FeCl₃ 0,5M em 50 mL HClO₄ 35%). Os tubos foram mantidos no escuro por 30 minutos. A presença do hormônio foi quantificada pela absorbância a 530 nm em espectrofotômetro. Para a estimativa de produção de AIA, utilizou-se uma curva-padrão com ácido indol-acético (Sigma), com 98% de pureza.

Indução à síntese de astaxantina

Ao final do experimento, as culturas foram centrifugadas a 3500 x g, à 10°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células concentradas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. A extração dos

pigmentos foi realizada com dimetil sulfóxido (DMSO / Sigma- Aldrich) aquecido a 50°C, e as amostras homogeneizadas em vortex a cada 10 minutos durante a incubação (LORENZ, 2001).

A concentração de astaxantina foi determinada por técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), equipado com bombas LC – 10ATVP (Shimadzu) e detector UV-VIS SCL-10AVP (Shimadzu). Os extratos foram separados utilizando uma coluna analítica LUNA C18, 100A – 250 x 4,6 mm, 5µm, com fluxo de 1mL. min⁻¹. Foram injetados 20 µL de amostra. Os pigmentos foram separados em condições de gradiente com o uso de solução A (acetato de amônia: metanol - 20:80 v/v) e B (acetona:metanol - 20:80 v/v), e a corrida seguiu com o gradiente: 0 min 40% A, 60% B; 10 min 20% A, 80% B; 20 min 20% A, 80% B; 22 min 0% A, 100% B; 32 min 0% A, 100% B; 40 min 40% A, 60% B; 55 min 40% A, 60% B.

A coluna foi calibrada com padrão de astaxantina livre (Sigma-Aldrich / A9335, 98% de pureza). Picos correspondentes ao espectro de absorção da astaxantina livre foram mensurados em 478 (±4) nm (BRITTON, 1995) e considerados como astaxantina não hidrolisada. O software utilizado para quantificação dos picos de astaxantina foi LC10, e a equação da linearidade obtida foi $y=7E+06x-186457$. Os valores da quantificação de astaxantina por HPLC são apresentados como o total de equivalentes de astaxantina por grama de massa seca celular.

2.5. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram avaliados com relação a sua homogeneidade e as análises realizadas através do programa estatístico SAS 8.0. (2001). Foi aplicada uma análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias das triplicatas comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento vegetativo

Durante a fase de crescimento vegetativo das culturas, não foi observada diferença significativa na máxima densidade celular de *H. pluvialis* entre os tratamentos (Tabela 1). As curvas de crescimento da microalga nos diversos tratamentos podem ser visualizadas na Figura 1A, e, durante os 15 dias de cultivos sem estresse as taxas de crescimento mensuradas para cada condição experimental foram: $\mu=0,17$ para o cultivo apenas da microalga (T1); $\mu=0,18$ para o cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano (T2); $\mu=0,18$ para o cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano (T3) e $\mu=0,19$ para o cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano (T4).

De mesmo modo, não houve variação na concentração de clorofila a das células da microalga durante o crescimento nas condições dos vários tratamentos (Figura 1C), e os valores finais da concentração deste pigmento não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). Portanto, o desempenho das células de microalga foi semelhante em todos os tratamentos, independente da condição de cultivo.

Tabela 1. Valores médios da máxima densidade celular, clorofila a e nitrato dissolvido (N-NO₃) obtidos no 15° dia de cultivo *consorciado* de *Haematococcus pluvialis* com *Azospirillum brasilense* V6, e produção de astaxantina pela microalga no último dia de estresse (25° dia de cultivo).

Tratamento	Máx. densidade (x10 ⁴ cél mL ⁻¹)	Clorofila a (μ g L ⁻¹)	N-NO ₃ dissolvido (mg L ⁻¹)	Astaxantina (mg eq. Astax / g céls)
T1	4,45 ± 1,00 ^A	2679,89 ± 245,54 ^A	4,83 ± 1,12 ^A	17,66 ± 1,23 ^A
T2	4,87 ± 0,25 ^A	2655,17 ± 488,82 ^A	2,44 ± 0,59 ^{BC}	-
T3	4,63 ± 0,21 ^A	2744,17 ± 248,03 ^A	3,37 ± 0,23 ^B	13,62 ± 0,76 ^B
T4	5,36 ± 0,14 ^A	3159,50 ± 393,01 ^A	1,88 ± 0,27 ^C	-
Teste F	1,66	2,92	15,45 [*]	47,32 [*]
CV	11,04	12,38	21,01	6,52

Médias seguidas do desvio padrão. T1 – cultivo apenas da microalga; T2 – cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano; T3 – cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano; T4 – cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste F. *Significativo a 5% de probabilidade (Tukey $p \geq 0,05$); NS não significativo.

Contudo, a biomassa seca final foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) nas condições dos tratamentos T2 e T4 do que nos tratamentos T1 e T3, conforme visto na Figura 1B. Esse fato se deve a um aumento do tamanho das células da microalga nas condições dos cultivos T2 e T4, visto que a diferença na densidade celular final não foi representativa. Assim, as células de microalgas apresentaram maior biomassa seca final nos tratamentos em que houve a adição do aminoácido (T2=112,86 mg L⁻¹) e na condição da presença de *A. brasiliensis* V6 sem o triptofano (T4=118,33 mg L⁻¹). Sabe-se que a *H. pluvialis* apresenta ótimo desempenho em meios contendo fontes de aminoácido e nutrientes de fonte orgânica (KOBAYASHI et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1997), contudo esses mesmos autores relataram a dificuldade de manutenção da assepsia desses cultivos em escala comercial, considerando que vários sistemas produtivos são realizados em tanques abertos que favorecem muito a contaminação e proliferação microbiana (DEL CAMPO et al., 2007).

Entretanto, ao contrário do esperado, foi observado um desempenho melhor das microalgas na ausência do ácido indol-acético. A presença do triptofano no meio de cultivo não favoreceu o crescimento celular de *H. pluvialis*, visto que o rendimento final de biomassa seca foi semelhante entre os cultivos T1 e T3 (Figura 1B). Ainda, é interessante ressaltar que, na presença da *A. brasiliensis* V6 mas sem o triptofano no meio de cultura (T4), a biomassa seca final foi significativamente maior do que na ausência da bactéria e do AIA (T1), demonstrando que o aumento na biomassa celular definitivamente não apresenta uma relação positiva com a presença do ácido indol-acético secretado pela bactéria.

A concentração de AIA mensurada no T3 durante os 15 dias de cultivo sem estresse teve um acréscimo, e variou entre $0,51 \pm 0,02 \times 10^{-5} \text{M}$ e $2,07 \pm 0,32 \times 10^{-5} \text{M}$, conforme visualizado na Figura 2B. A concentração ótima de AIA indicada para a microalga *Chlorella vulgaris* foi em torno de 10^{-5}M , e de acordo com GONZALEZ & BASHAN (2000), a presença deste hormônio no meio de cultura promoveu um aumento significativo da multiplicação celular da espécie estudada. Contudo, essa resposta positiva não foi observada para *H. pluvialis* na condição experimental deste trabalho.

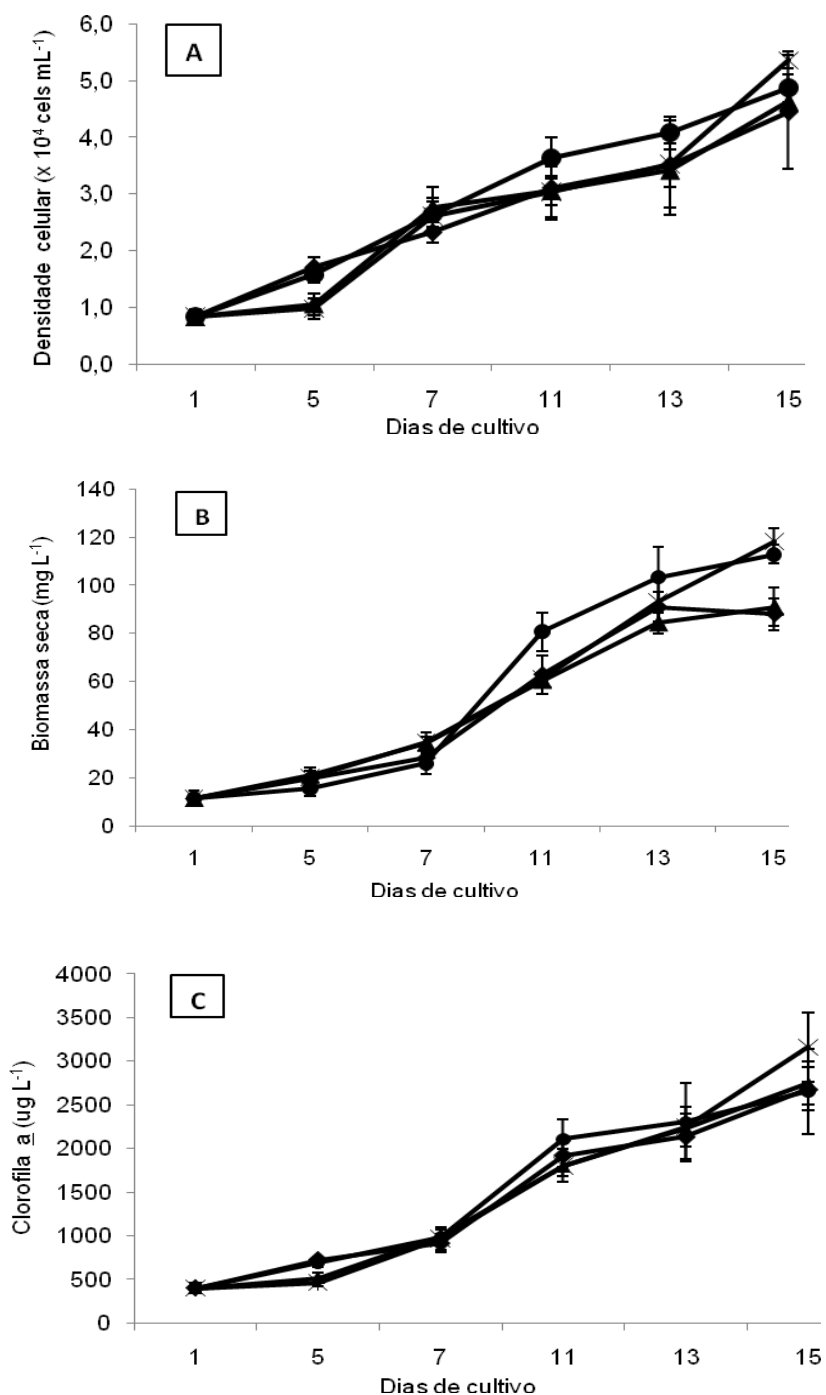


Figura 1. Valores médios de densidade celular (A), biomassa seca (B) e clorofila a (C) obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis* consorciado com *Azospirillum brasilense* V6. T1 – cultivo apenas da microalga (◆); T2 – cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano (●); T3 – cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano (▲); T4 – cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano (x).

No controle negativo contendo o aminoácido precursor (T6) foi verificada a presença de AIA, enquanto naquele sem a presença de triptofano (T5) não ocorreu a produção do hormônio. Igualmente, não foi detectada a presença de AIA nos tratamentos T1, T2 e T4 (Figura 2B). Essa situação mostrou que a microalga *H. pluvialis* não é produtora de fitohormônios, quando cultivada na presença do aminoácido precursor de compostos indólicos. Além disso, houve uma redução na quantidade de AIA mensurado na cultura consorciada suplementada com triptofano, quando comparada com o tratamento T6, o qual consistia apenas de *A. brasiliensis* V6 suplementada com o aminoácido (Figura 2B).

Com esses resultados, pode-se sugerir que o aminoácido presente no meio é consumido pela microalga, mas não contribui para o crescimento celular, causando um efeito contrário do esperado. Outra possível explicação para o ocorrido é a inibição da produção do hormônio pelas bactérias na presença da microalga, já que a variação na quantidade de UFC mL⁻¹ mensurada nos tratamentos T3, T4 e T6 durante o cultivo foi muito pequena.

Os valores médios da quantificação celular de *A. brasiliensis* V6 para os tratamentos T3, T4 e T6 no 10º dia de cultivo foram 3,42x10³ UFC mL⁻¹; 3,37x10³ UFC mL⁻¹; 3,34x10³ UFC mL⁻¹, e no 15º dia de cultivo foram 3,28x10³ UFC mL⁻¹; 3,41x10³ UFC mL⁻¹ e 3,30x10³ UFC mL⁻¹.

Já o consumo do nitrato foi diferenciado entre os cultivos, e os resultados mostrados na Tabela 1 confirmam uma diferença significativa na quantidade presente nos cultivos no 15º dia de cultivo. Entretanto, pode-se afirmar que não houve contribuição desta fonte de nitrogênio por parte das bactérias, pois ao contrário, observa-se que a menor quantidade de (N-NO₃) foi mensurada no T4.

Quantificação da astaxantina nas células submetidas ao estresse

A eficiência do estresse celular induzido através do aumento da iluminação aliado ao aumento da relação C/N já foi discutida e comprovada por diversos autores (KANG et al., 2007; KOBAYASHI et al., 1997). A quantificação da astaxantina demonstrou que os valores finais deste pigmento na biomassa foram significativamente

diferentes. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 1 mostraram que o cultivo consorciado de *H. pluvialis* com a *A. brasiliensis* V6, na presença do hormônio AIA, resultou em uma menor concentração de astaxantina na biomassa.

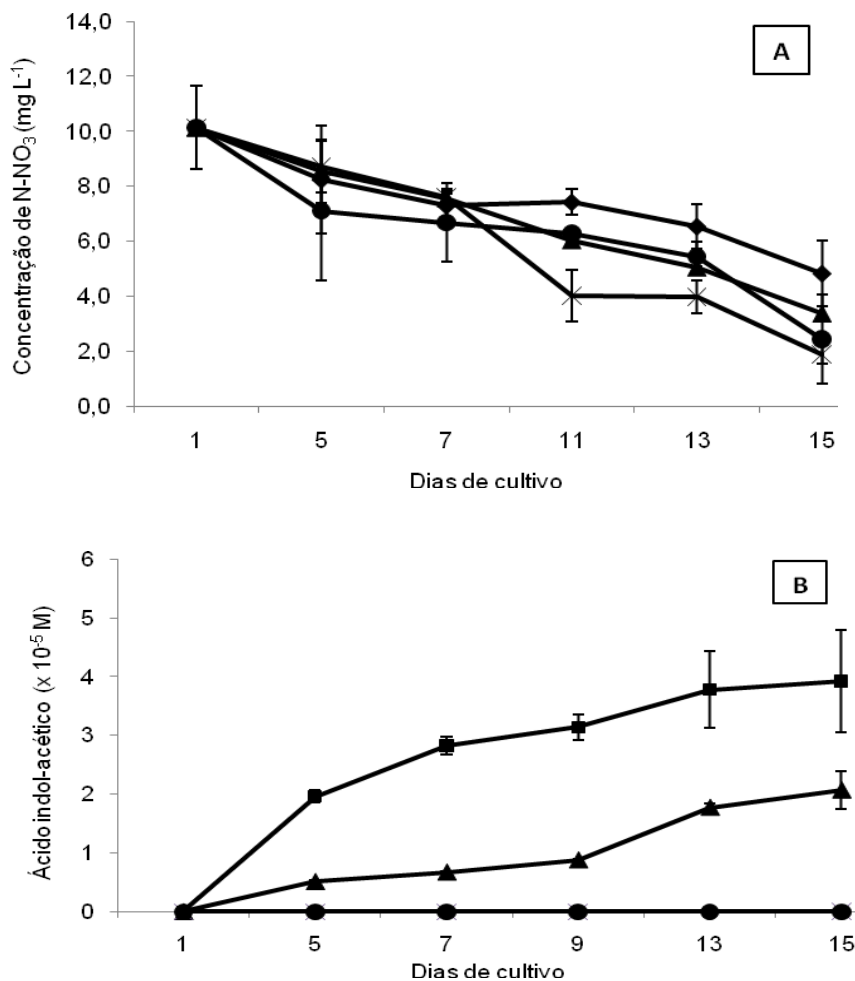


Figura 2. Valores médios das concentrações de nitrato (N-NO₃) (A) e ácido indol-acético (B) no meio de cultura, obtidos nos cultivos de *Haematococcus pluvialis* consorciado com *Azospirillum brasilense* V6. T1 – cultivo apenas da microalga (◆); T2 – cultivo da microalga em meio suplementado com triptofano (●); T3 – cultivo da microalga e da bactéria em meio suplementado com triptofano (▲); T4 – cultivo da microalga e da bactéria em meio sem suplementação com triptofano (x); T6 – cultivo da bactéria em meio suplementado com triptofano (■).

Os valores apresentados de concentração de astaxantina estão dentro da faixa obtida por outros autores (OLAIZOLA, 2000; DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004), mas o cultivo consorciado da microalga com a bactéria não contribuiu para o crescimento celular e nem favoreceu a síntese de astaxantina.

4. CONCLUSÕES

O cultivo da microalga *H. pluvialis* consorciado com a bactéria *A. brasilense* V6, na presença de triptofano, precursor da síntese do hormônio ácido indol-acético, não promoveu um aumento do crescimento celular microalgal e nem da quantidade de astaxantina na biomassa.

Respostas positivas foram observadas em cultivos consorciados ausentes de triptofano no meio de cultura onde a densidade celular da microalga foi igual a obtida na cultura axênica. Quando as células foram expostas a fatores indutores da síntese de astaxantina na microalga, a presença da bactéria e do precursor do hormônio não favoreceu a síntese de astaxantina contida na biomassa.

5.REFERÊNCIAS

- BECKER, W. Microalgae for aquaculture – The nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, 2004. p.380 - 391.
- BRITTON, G. UV/Visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Ed) **Carotenoids. Volume 1 B: Spectroscopy**. Birkhauser Verlag, Basel, 1995. 57 p.
- CZERPAK, R.; KROTKE, A.; MICAL, A. Comparison of stimulatory effect of auxins and cytokinins on protein, saccharides and chlorophylls content in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. **Polskie Archiwum Hydrobiologii**, v.46, p.71–82, 1999.
- de-BASHAN, L.E; MORENO M.; HERNANDEZ JP; BASHAN J. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**., v.36, p. 2941–2948, 2002.
- de-BASHAN, L.E.; ANTOUN, H.; BASHAN, Y. Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.197–203, 2005.
- de-BASHAN, L.E.; ANTOUN, H.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v.44, p.938–947, 2008.
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R.; LEGARRETA, I.G; JERONIMO, F.M.; CAMPOCOSIO, A.T. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresources Technology**, v. 92, p.209–214, 2004.

GONZALEZ, L. E.; BASHAN, Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1527–31, 2000.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. **Plant Physiology**, Washington, v.26, n.3, p.192-197, 1951.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidae. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

HAGEN C.; BRAUNE W.; GREULICH. F. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris*. Protection from photodynamic damage. **J. Photochem. Photobiol.**, v.20, p.153-160, 1993.

KANG, C. D. ; LEE, J. S.; PARK, T. H.; SIM, S. J. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p.987–994, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.867-873, 1993.

KOBAYASHI; M., KAKIZONO, N.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI, V. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.48, p.351–356, 1997.

LORENZ, R.T. **HPLC and spectrophotometric analysis of carotenoids from Haematococcus algae powder**. Cyanotech Corporation, n.15, 2001. 10p.

LORENZEN, C.J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.** v.12, p.343-346, 1967.

MACKERETH, F.J.H.; HERON, J.; TALLING, J.F. **Water analysis: Some revised methods for limnologist**. Freshwater Biological Association. Scientific Association. Kendall: Titus Wilson & Son Ltd., 1978. 117p.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v.96, p.373-378, 2005.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.487-506, 2000.

STEIN, J. R. (ed.) 1973. **Handbook of Phycology methods. Culture, Methods and Growth Measurements**. Cambridge University Press, London, UK, 448p.