



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

Cultivo da cianobactéria Nostoc sp. em laboratório

Jéssica Raquel Pinto Pereira

2024



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

Cultivo da cianobactéria Nostoc sp. em laboratório

Jéssica Raquel Pinto Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Teresa Mouga

2024

Title: Cyanobacteria cultivation under laboratory conditions: Nostoc sp.

Copyright© Jéssica Raquel Pinto Pereira
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar
Instituto Politécnico de Leiria
2024

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar and the Instituto Politécnico de Leiria have the right, perpetual and without geographical limits, to archive and publish this dissertation/project work/internship report through printed copies reproduced in paper or digital form, or by any other means known or to be invented, and spread through scientific repositories and admit your copying and distribution educational or research purposes, non-commercial purposes, provided that credit is given to the author and Publisher.

Esta dissertação é fruto de um processo longo, difícil, mas consistente e persistente. Não seria possível sem o apoio incondicional e a confiança de diversas pessoas.

- À minha orientadora, Doutora Teresa Mouga pela fenomenal oportunidade de realizar esta investigação, pela orientação durante a mesma, por todas as ferramentas de aprendizagem, todo o tempo disponibilizado e, principalmente, pela paciência. Esta experiência deu-me asas a crescer pessoalmente e profissionalmente.

- À professora Susana Mendes, pela ajuda incondicional e apoio durante uma das partes mais difíceis deste trabalho, a estatística.

- À Marta Freitas, pelo tempo disponibilizado quando necessário.

- Aos meus amigos Rafael Pechorro, Marcia Abreu, por me ajudarem sempre que precisei no Cetemares, nem que fosse com companhia, pelas palavras de apoio de forma a reforçar que estávamos todos iguais e que era normal.

- Às minhas melhores amigas e colegas de casa, duas das pessoas que fazem Peniche valer a pena. Obrigada por me aturarem quando estávamos em casa e todo o meu trabalho parecia em vão, por terem as melhores palavras de apoio, pelos mimos de consolo, pelos passeios de carro para nos distrairmos, pelas viagens programadas para desanuviar. Devo-vos muito por ter conseguido acabar, Carolina Nunes, Catarina Bernardo. Beatriz Rosário, obrigada por seres quem és e estares sempre do meu lado, para o que der e vier, e seres um dos meus maiores apoios durante este caminho, obrigada por não questionares as minhas crises existenciais. Obrigada por serem os meu porto-seguro.

- Ao meu melhor amigo Guilherme Correia por não questionar as vezes que precisava de falar vezes sem conta do mesmo problema e ainda por ser uma das pessoas que me faz pensar em tudo, menos na dissertação quando era preciso, não é de sempre, mas é para sempre. Ao André Cruz, pelo apoio, pelos doces, pela ajuda a pensar, pela companhia e ainda pela paciência durante os meus monólogos.

- Aos meus afilhados, que fizeram não só esta dissertação acontecer, como também todo este percurso académico valer a pena, Filipa Cristão, Daniela Devesa, Rodrigo Maltez, André Costa, Diana Ximenes. Nunca esquecendo todo o resto da minha família académica, que felizmente, são muitos para enumerar.

- À minha família, mãe, pai, irmã, porque sem eles nada disto era possível, sem os seus sacrifícios, sem o apoio e sem a compreensão.

Resumo

As cianobactérias, tal como *Nostoc* spp., são um grupo de bactérias muito promissoras em diversas áreas, tal como a produção de biodiesel, a biorremediação, a produção de biofertilizantes e como fonte de metabolitos, sendo por isso importante perceber as condições de otimização da produção de biomassa. Este trabalho teve, assim, como objetivos a produção de biomassa a partir de inóculo de *Nostoc* sp. 136, avaliando a sua concentração inicial mais favorável, identificar o melhor de entre diferentes meios, estudar diversificadas concentrações de nutrientes e ainda conhecer o impacto de distintos comprimentos de onda sobre o cultivo. Através de cultivo em *batch* foram realizados quatro ensaios em diversas condições, mantendo sempre a irradiância, temperatura e arejamento similares, e foram analisadas as taxas de crescimento específico e relativo, a produtividade, a humidade e o peso seco. De entre as diferentes concentrações (1,002, 3,702 e 5,174 g.L⁻¹), a concentração mais baixa foi a que obteve os melhores resultados a nível do crescimento, porém também registou o valor mais baixo a nível do peso seco, mostrando diferentes fases do estado de crescimento. Quando comparados os meios utilizados (BG11 modificado, FloraNova e Nutribloom) observou-se que o meio mais eficiente seria o meio BG11 modificado, porém o Nutribloom mostrou-se bastante eficaz, sem mostrar diferenças estatisticamente significativas, podendo ser um futuro substituto, dependendo do objetivo de cultivo. De entre as concentrações de nutrientes estudadas (suplementação do meio BG11 modificado com 1,5x e 2x de azoto, ferro e magnésio), o ensaio controlo suplementado com 1,5x de azoto mostrou-se o mais eficaz. A suplementação 2x obteve sempre menor crescimento, mostrando que o excesso de nutrientes é prejudicial para o organismo. Ao serem utilizados os diferentes comprimento de onda (Branco [450 e 550-620nm], Azul [460-470], Vermelho [610-640], Branco/Azul [440-470], Branco/Vermelho [610-640]) foi observado que o Branco obteve os melhores resultados juntamente com a combinação Branco/Vermelho, tendo o Vermelho obtido valores de crescimento negativos mostrando-se a menos favorável. Seria interessante futuramente investigar de que forma estas condições de cultivo influenciam os metabolitos presentes na cianobactéria *Nostoc* sp. 136.

Palavras-chave: Cianobactéria, *Nostoc* sp., Cultivo em *batch*, Concentração inicial, BG11M, FloraNova, Nutribloom, Suplementação, Azoto, Ferro, Magnésio, Comprimento de onda

Abstract

Cyanobacteria, such as *Nostoc* spp., are a very promising group of bacteria in several areas, such as biodiesel production, bioremediation, biofertilizer production and as a source of metabolites, so it is important to understand the conditions for optimizing biomass production. The objectives of this work were therefore to produce biomass from *Nostoc* sp. 136 inoculums, assessing its most favorable initial concentration, identifying the best of different media, studying different nutrient concentrations, and also learning about the impact of different wavelengths on cultivation. Four trials were carried out using batch cultivation under different conditions, always maintaining similar irradiance, temperature and aeration, and the specific and relative growth rates, productivity, humidity, and dry weight were analyzed. Of the different concentrations (1,002, 3,702 and 5,174 g.L⁻¹), the lowest concentration was the one that obtained the best results in terms of growth, but also recorded the lowest value in terms of dry weight, showing different stages of growth. When comparing the media used (modified BG11, FloraNova and Nutribloom), it was observed that the most efficient medium was the modified BG11 medium, but Nutribloom proved to be very effective, without showing statistically significant differences, and could be a future substitute, depending on the cultivation objective. Of the nutrient concentrations studied (supplementation of the modified BG11 medium with 1,5x and 2x nitrogen, iron, and magnesium), the control test supplemented with 1,5x nitrogen proved to be the most effective. The 2x supplementation always resulted in lower growth, showing that excess nutrients are harmful to the organism. When the different wavelengths were used (White [450 and 550-620nm], Blue [460-470], Red [610-640], White/Blue [440-470], White/Red [610-640]), it was observed that White obtained the best results along with the White/Red combination, while Red obtained negative growth values, proving to be the least favorable. It would be interesting in the future to investigate how these cultivation conditions influence the metabolites present in the cyanobacterium *Nostoc* sp. 136.

Keywords: Cyanobacteria, *Nostoc* sp., Batch Culture, Initial concentration, BG11M, FloraNova, Nutribloom, Supplementation, Nitrogen, Iron, Magnesium, Wavelength

Índice

1. Introdução.....	16
1.1. Microalgas.....	16
1.2. Cianobactérias	18
1.3. Cultivo de Cianobactérias.....	21
1.3.1. Cultivo descontínuo ou em <i>Batch</i>	22
1.3.2. Sistema aberto com luz solar direta	23
1.3.3. Fotobiorreator	24
1.4. <i>Nostoc</i> spp.	27
1.4.1. Cultivo de <i>Nostoc</i> spp.....	29
1.4.2. Aplicações de <i>Nostoc</i> spp.....	30
1.5. Taxa de crescimento e produtividade	31
1.6. Parâmetros de cultivo.....	32
1.6.1. Temperatura	33
1.6.2. pH.....	33
1.6.3. Arejamento	34
1.6.4. Luminosidade	34
1.6.5. Nutrientes	35
1.6.6. Agentes contaminantes	36
2. Objetivos.....	37
3. Materiais e Métodos	38
3.1. Testes de crescimento	38
3.1.1. Monitorização dos cultivos.....	39
3.1.2. Produção de biomassa através da manipulação da concentração inicial	40
3.1.3. Produção de biomassa com diferentes meios de cultivo.....	41
3.1.4. Produção de biomassa através da manipulação da concentração de nutrientes (azoto, ferro e magnésio)	41
3.1.5. Avaliação da produção de <i>Nostoc</i> sp. 136 em função do comprimento de onda da luz	42
3.2. Análise estatística	43
4. Resultados.....	45
4.1. Manipulação da concentração inicial	45
4.2. Avaliação mediante diferentes meios	46
4.3. Manipulação da concentração de nutrientes	49
4.4. Avaliação mediante comprimentos de onda diferentes.....	51

5. Discussão	55
5.1. Manipulação da concentração inicial	55
5.2. Avaliação mediante diferentes meios	56
5.3. Manipulação da concentração de nutrientes	57
5.4. Avaliação mediante comprimentos de onda diferentes.....	59
6. Conclusão.....	61
7. Referências	62
8. Anexos	76

Índice de Figuras

Figura 1- Observação microscópica de <i>Nostoc</i> spp. com heterocistos (400x). (Foto de T. Mouga).	20
Figura 2-Observação microscópica de <i>Nostoc</i> spp. com acinetos (Foto de T. Mouga).	21
Figura 3- Modelo representativo dos diferentes tipos de sistemas de cultivo em escala industrial de microalgas. (A) – Raceway em sistema aberto com luz solar direta, (B) – Sistema fechado com luz solar direta e (C) – Sistema fechado com luz solar artificial) (Pathak et al., 2018).....	22
Figura 4- Curva de crescimento de uma cultura de microalgas, quando cultivadas em batch [(1) – fase lag, (2) – fase de aceleração, (3) – fase exponencial, (4) – fase de desaceleração, (5) – fase estacionária e (6) – fase de declínio].	23
Figura 5- Exemplo de raceway utilizado para o cultivo de <i>Nostoc calcicola</i> [A) – Inoculação inicial, B) – Após 5 dias de crescimento, C) – Amostra ampliada a 600x] (Celis-Plá et al., 2021).	24
Figura 6- Representação esquemática do reator <i>airlift</i> (Duan & Shi, 2014).....	26
Figura 7- Representação esquemática de como funciona um fotobiorreator com biofilme móvel [(a) – Reator aeróbio; (b) – Reator anaeróbio] (Rusten et al., 2006).	27
Figura 8- Curva de crescimento da <i>Nostoc</i> sp. 136 utilizada (Mouga et al., 2023).	28
Figura 9- Imagem ilustrativa do ciclo de vida da Ordem Nostocales, em função das condições ambientais (Álvarez et al., 2023).	29
Figura 10- Início do ensaio com <i>Nostoc</i> sp. 136 usando diferentes meios de cultivo. .	38
Figura 11- Fotografia representativa dos falcons utilizados na separação de amostras na centrífugadora.	39
Figura 12- Início do ensaio do cultivo de <i>Nostoc</i> sp. 136 submetido a diferentes concentrações dos nutrientes.	42
Figura 13- Início do ensaio com os diferentes combinações de luzes utilizadas no ensaio de crescimento de <i>Nostoc</i> sp. 136 (a- Azul, b- Vermelho, c- Azul/Branco, d- Vermelho/Branco).	43
Figura 14- Taxa de crescimento específica (dia^{-1}) mediante diferentes concentrações de biomassa inicial (g.L^{-1}) de <i>Nostoc</i> sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.	46
Figura 15- Balões volumétricos utilizados no ensaio de crescimento com os diferentes meios, no final do ensaio (A- BG11M, B- Nutribloom, C- FloraNova).	48
Figura 16- Taxa de crescimento específica (dia^{-1}) mediante diferentes meios de cultivo para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (F- FloraNova, B- BG11M, N- Nutribloom). Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.	48
Figura 17- Tubos de centrífuga utilizados durante a amostragem do ensaio de crescimento com os diferentes comprimentos de onda (V- Vermelho, B- Branco, A- Azul).	52
Figura 18- Taxa de crescimento específica (dia^{-1}) mediante diferentes comprimentos de onda utilizadas no crescimento para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (B- Branco, A- Azul, V- Vermelho, B/V- Branco e Vermelho, B/A- Branco e Azul); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.	54

Índice de tabelas

Tabela 1- Representação taxonómica de <i>Nostoc</i> spp. (Adaptado de Guiry & Guiry (2023)).....	27
Tabela 2- Concentrações iniciais (g.L^{-1}) do cultivo de <i>Nostoc</i> sp. 136 em BG11M.....	41
Tabela 3- Concentração utilizada dos diferentes meios utilizados no ensaio.	41
Tabela 4- Concentrações (g/L) utilizadas dos nutrientes estudados.	42
Tabela 5- Características dos comprimentos de onda utilizadas (Carreres-Prieto et al., 2020; Davidson, 2023)	43
Tabela 6- Valores correspondentes ao peso fresco e seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes concentrações de biomassa inicial (g.L^{-1}) de <i>Nostoc</i> sp. 136.....	45
Tabela 7- Valores correspondentes às diferentes concentrações iniciais e finais (g.L^{-1}) e a produtividade ($\text{g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) correspondente de <i>Nostoc</i> sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, ($n=3$); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.	45
Tabela 8- Taxa de crescimento relativo (%) mediante diferentes concentrações de biomassa inicial (g.L^{-1}) de <i>Nostoc</i> sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, ($n=3$); diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.	46
Tabela 9- Valores correspondentes ao peso fresco e seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes meios de cultivo para a <i>Nostoc</i> sp. 136.....	47
Tabela 10- Valores correspondentes às concentrações iniciais e finais (g.L^{-1}) e a respetiva produtividade ($\text{g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) mediante diferentes meios de cultivo para a <i>Nostoc</i> sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, ($n=3$); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.	47
Tabela 11- Taxa de crescimento relativo (%) mediante diferentes meios de cultivo para a <i>Nostoc</i> sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, ($n=3$); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.....	49
Tabela 12- Valores correspondentes ao peso fresco e seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente);	49
Tabela 13- Dados obtidos para as concentrações iniciais e finais (g.L^{-1}) e a respetiva produtividade ($\text{g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão) (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, ($n=3$); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.....	50
Tabela 14- Taxa de crescimento específica (g.L^{-1}) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão) (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L^{-1} de azoto, ferro e	

magnésio respetivamente); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.....	51
Tabela 15- Taxa de crescimento relativo (%) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão) (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L ⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L ⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L ⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.....	51
Tabela 16- Valores correspondentes ao peso fresco e seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes comprimentos de onda utilizadas no crescimento para a <i>Nostoc</i> sp. 136.....	52
Tabela 17- Concentrações iniciais e finais (g.L ⁻¹) e a respetiva produtividade (g.L ⁻¹ dia ⁻¹) obtida mediante diferentes comprimentos de onda utilizados no crescimento para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.....	53
Tabela 18- Taxa de crescimento relativa (%) mediante diferentes comprimentos de onda utilizados no crescimento para a <i>Nostoc</i> sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.....	54

1. Introdução

Alga é um termo sem posição taxonómica formal que é usualmente utilizado para indicar uma associação polifilética de organismos fotossintéticos simples, do ponto de vista morfológico e reprodutivo, ou seja, trata-se de uma classificação que inclui organismos que não compartilham uma origem comum, porém seguem linhas evolutivas múltiplas e independentes, de forma não coesa e artificial de organismos fotossintéticos. As algas ocorrem em diferentes formas, desde células isoladas e microscópicas, passando por aglomerados multicelulares, até às de forma mais complexa em talos e lâminas macroscópicas. As primeiras tomam a designação empírica de microalgas, as últimas de macroalgas (Barsanti & Gualtieri, 2023).

As algas podem ser aquáticas ou subaéreas, sendo que as aquáticas são encontradas em diversos habitats, desde nascentes de água doce até ao oceano, tendo tolerância variável a pH, temperatura, turbidez, concentração de oxigénio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) (Fal et al., 2023). As espécies aquáticas podem ser planctónicas (sendo organismos de vida livre, mas flutuando nas regiões eufóticas da coluna de água) ou bentónicas (aderentes ao fundo ou que vivem nos sedimentos, estando mais limitadas a zonas de baixa profundidade devido à propagação da luz) (Barsanti & Gualtieri, 2023). No século XIX, a cor era a primeira forma de classificar as algas, como verdes, castanhas, vermelhas, douradas e azuis (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022).

1.1. Microalgas

Como explicado anteriormente, as algas podem ser separadas entre macro e microalgas. As microalgas têm, ainda, a capacidade de se organizar em colónias e gerar filamentos. São um grupo heterogéneo, de tamanho pequeno quando comparado com as macroalgas, com organismos de tamanhos que variam entre 1µm e 1mm, como a *Chlorella* sp., que possui a capacidade de viver em água doce ou no solo, que exhibe células esféricas de um diâmetro variável entre 2µm e 10µm (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022).

Historicamente, a classificação em microalgas acontece com base nas suas propriedades fenotípicas, seja com base na morfologia, na anatomia ou na sua estrutura celular, sendo o método mais utilizado, definido com base na morfologia e nos diferentes modos de divisão celular (Metting, 1996).

O conhecimento sobre a filogenia das algas tem evoluído bastante graças a evidências moleculares que permitem uma melhor classificação a partir da sequenciação de genes do ácido ribonucleico (ARN) ribossómico, da análise de

aparelhos mitóticos e das estruturas mitocondriais, entre outros. Através de classificações fenotípicas e pela diferenciação genética tem vindo a aumentar o consenso na classificação taxonómica e filogenética (Metting, 1996).

O reconhecimento das microalgas é bastante relevante nos estudos de Biologia e Oceanografia, uma vez que a análise das espécies encontradas em determinados lugares, em certas alturas, ajuda a entender a forma como a energia é transferida da base da cadeia alimentar para os níveis tróficos superiores. Esta observação ajuda a compreender as alterações nos ecossistemas e nas populações, designadamente nos *stock* de peixes e do próprio ciclo de carbono num determinado ambiente (Correa et al., 2017).

As microalgas são um grupo amplo composto por organismos fotoautotróficos eucariotas e também por cianobactérias procarióticas (Correa et al., 2017; Reimann et al., 2020). Estão presentes em todos os ecossistemas aquáticos de todo o mundo e também em vários tipos de águas residuais. Através da fotossíntese, as microalgas fotoautotróficas convertem a luz e o CO₂ para a produção de compostos orgânicos, como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas e pigmentos, que posteriormente podem ser utilizados em vários bioprodutos para indústrias tanto químicas como farmacêuticas (Jiao et al., 2024; Shiong Khoo et al., 2023; Zhang et al., 2023).

As microalgas são formas de vida aquáticas microscópicas importantes, visto que têm o papel de produtores primários numa cadeia alimentar aquática e são responsáveis pela produção de oxigénio em ecossistemas aquáticos (Chhandama et al., 2023; Jiao et al., 2024). Como índice biológico, as microalgas são utilizadas como um indicador da qualidade da água, dada a sua sensibilidade às alterações ambientais. Por consequência, a identificação das microalgas é uma questão pertinente na gestão dos recursos hídricos (Promdaen et al., 2014; Zhang et al., 2023).

O metabolismo celular das microalgas é altamente complexo e dinâmico, que pode sofrer alterações drásticas rapidamente. Esta característica é particularmente relevante em organismos que evoluíram em condições ambientais variáveis. O facto de o seu metabolismo sofrer mudanças metabólicas dinâmicas, torna estes organismos a base dos fenómenos ecológicos relevantes, como os florescimentos algais (ou *blooms*) ou a redução da quantidade de nutrientes, assim como em contextos de bio-processamento industrial, quando são induzidas diferentes vias metabólicas através do cultivo das microalgas sob diferentes condições (Patwari et al., 2023).

1.2. Cianobactérias

As Cianobactérias, também designadas anteriormente por “algas azuis-verdes”, são procariotas fotossintéticos com cerca de 3500 milhões de anos de existência no planeta Terra (Allaf & Peerhossaini, 2022; Schopf, 1953).

Compreendem, na sua composição, diversas estruturas celulares como ribossomas, grânulos de armazenamento (ex: carboxissomas hexagonais, grânulos de cianoficina, grânulos de polifosfato) e tilacóides, extensões membranares onde estão alojados os ficobilissomas. Estes microrganismos são procariotas fotossintéticos *gram*-negativos com diversas morfologias, desde unicelulares a coloniais, passando por filamentosos uni ou plurisseriados, ramificados ou não, exibindo formas de vida planctónicas ou bentónicas. O tamanho das suas células varia entre menos de 1 µm de diâmetro e 100µm. Nas cianobactérias filamentosas, após a divisão celular, as células permanecem unidas umas às outras e formam uma cadeia denominada “tricoma”, que pode ser envolvida por uma bainha mucosa, em alguns casos, denominado filamento (Allaf & Peerhossaini, 2022).

São organismos resistentes e podem ser encontrados em ambientes quentes ou frios, alcalinos ou ácidos, de água doce ou marinha e, ainda, em ambiente terrestre (Allaf & Peerhossaini, 2022).

O número de taxa de cianobactérias é, ainda, objeto de debate e estima-se que atinja as 8000 espécies. De acordo com caracteres morfológicos e análises moleculares, até à data, foram identificadas e categorizadas mais de 5000 espécies, que se incluem em múltiplas ordens (Allaf & Peerhossaini, 2022; Guiry & Guiry, 2023).

As cianobactérias foram os primeiros procariotas foto-autotróficos a desenvolver a fotossíntese oxigénica. Por serem fotossintéticos, estes organismos geram grandes quantidades de biomassa rapidamente, a partir da energia do sol e do CO₂, usando, ainda, nutrientes dissolvidos na água (Mostafa et al., 2012). Para tal, utilizam a clorofila a conjuntamente com pigmentos acessórios (ficobilinas), transferindo a energia captada para o Fotossistema II.

Os ficobilissomas são proteínas complexas hidrossolúveis presentes nas cianobactérias. Na sua composição estão presentes centenas de cromóforos, responsáveis pela absorção de luz nas regiões espectrais onde a absorção pela clorofila é fraca e pela transferência de energia de excitação para os centros de reação fotossintéticos (Protasova et al., 2021; Rhie & Beales, 1994). A sua função passa, também, pela indução do aumento da dissipação térmica do excesso de energia de

excitação absorvida, levando à diminuição consequente da energia que chega aos centros de reação (Wilson et al., 2022). As ficobilinas, sendo proteínas, são solúveis em água. Assim, devido à sua solubilidade, são extraídos usando a água como solvente.

Uma das ficobilinas mais importantes produzida por cianobactérias é a ficocianina, um pigmento de cor azul, que absorve fotões de comprimento de onda máximo entre 610 e 620nm e emite nos comprimentos de onda entre 440 e 485nm. É habitualmente o mais abundante. Este pigmento tem uma alta capacidade antimicrobiana contra outras bactérias *gram-positivas* e *gram-negativas* e, ainda, juntamente com a fibra de zeína, mostrou-se com uma elevada capacidade antioxidante e anticancerígena (Athiyappan et al., 2024; Golmakani et al., 2023; Yin et al., 2024).

Outra ficobilina presente nas cianobactérias é a ficoeritrina, um pigmento de cor rosa-avermelhado, com uma absorbância no comprimento de onda de 565 nm e uma emissão máxima nos 430 nm, com propriedades de fluorescência à luz. A ficoeritrina tem muito interesse devido a ser possível criar compostos multifuncionais, como por exemplo, a criação de nanocompósitos contra células do cancro da mama e dos ovários, juntamente com quitosano-prata (Bekasova, 2024; Sudhakar et al., 2023).

Uma terceira ficobilina é a alofococianina, um pigmento azul-turquesa que emite uma fluorescência a 660nm e uma absorção máxima entre 650 e 655nm. Surge habitualmente em menores concentrações do que os dois anteriores. Este pigmento tem a peculiaridade de conseguir proliferar sob a influência de temperaturas elevadas ou perante grandes amplitudes de pH. A alofococianina apresenta atividade antioxidante, anti tumoral, efeitos anti-inflamatórios e neuro protetores (Athiyappan et al., 2024; Cherdkiatikul & Suwanwong, 2014; Ge et al., 2006, Karpulevich et al., 2016).

As cianobactérias da ordem Nostocales têm a capacidade de produzir heterocistos quando a concentração de azoto orgânico presente no meio não é suficiente para cumprir as necessidades metabólicas (Allaf & Peerhossaini, 2022; Flores et al., 2019). Os heterocistos são células esféricas, ovais ou cilíndricas, especializadas na fixação de azoto molecular em azoto orgânico e encontram-se presentes no início, meio ou fim do filamento, intercalado com outras células vegetativas fotossintéticas. A capacidade de converter azoto molecular em amónia depende da presença da enzima nitrogenase, anaeróbia, que catalisa a reação, fornecendo o azoto às células vegetativas. Os heterocistos são desprovidos de pigmentos fotossintéticos, uma vez que não podem realizar a fotossíntese, exibem uma parede celular espessa e um ou dois nódulos polares, através dos quais comunicam com a(s) célula(s) adjacente(s) (Figura 1) (Borowitzka, 2018; Komárek, 2013; Komárek & Johansen, 2015).

Existe uma relação de simbiose entre os heterocistos e as células vegetativas, visto que os heterocistos fornecem às células vegetativas azoto para o crescimento celular e as células vegetativas realizam a fixação fotossintética de CO₂ e proporcionam aos heterocistos intermediários carbono orgânico (sacarose) (Hou et al., 2024; Volgusheva et al., 2019). Desta forma, a capacidade de fixar azoto através de células especializadas confere uma vantagem competitiva sobre outras espécies que não possuam a capacidade de gerar heterocistos (Mendes et al., 2022).



Figura 1- Observação microscópica de *Nostoc* spp. com heterocistos (400x). (Foto de T. Mouga).

Os acinetos (células de resistência) surgem nas mesmas espécies capazes de produzir heterocistos. São células de forma oval a elipsoidal de maior tamanho, de paredes espessas, com abundantes substâncias de reserva e metabolismo quase nulo, aparecendo quando cianobactérias são expostas a ambientes adversos (Figura 2). Estas células têm a capacidade de sobreviver durante muito tempo em condições hostis, como frio, a falta de nutrientes e dessecação, germinando após várias décadas de repouso quando as condições do meio o permitem (Allaf & Peerhossaini, 2022; Borowitzka, 2018; Juijuljerm et al., 2021; Komárek, 2013; Komárek & Johansen, 2015; Park et al., 2018). Os acinetos apresentam duas importâncias elevadas: uma é que a presença de acinetos demonstra alterações ambientais e pode evidenciar o próximo florescimento, e o outro é que, dado estas espécies serem produtoras de heterocistos, podem ser utilizados na agricultura como biofertilizante, associados aos heterocistos fornecendo azoto ao ambiente onde se encontram (Hori et al., 2003).



Figura 2-Observação microscópica de *Nostoc* spp. com acinetos (Foto de T. Mouga).

Uma das formas mais comuns de reprodução de cianobactérias é a reprodução vegetativa através da fissão binária. Neste tipo de reprodução uma célula mãe, forma duas células filhas vegetativas idênticas, duas células foram quatro células, e assim sucessivamente (Blackburn & Parker, 2005; Zuccolotto-Arellano & Cuervo-González, 2020). Outra forma de um organismo filamentoso se poder reproduzir é através da fragmentação, em que os filamentos quebram as suas ligações de modo a gerar filamentos mais pequenos que têm a capacidade de gerar novas organismos. Estes fragmentos designam-se hormogónios. Estes formam-se habitualmente em momentos de stress (Barsanti & Gualtieri, 2023).

Sendo uma espécie filamentosa, a reprodução do género *Nostoc*, pode ocorrer de diversas formas como: (1) a fragmentação de filamentos (hormogónio), gerando o aparecimento de novas colónias; (2) a germinação após a dispersão de acinetos; e (3) a separação de grandes colónias, dando origem a colónias pequenas aderentes, que geram colónias distintas (Allaf & Peerhossaini, 2022; Blackburn & Parker, 2005; Borowitzka, 2018).

1.3. Cultivo de Cianobactérias

As cianobactérias cada vez mais têm sido estudadas em processos de biorremediação de água residual para diversos fins (Mostafa et al., 2012). São, ainda, organismos de alto interesse dada a sua capacidade de fixar azoto, importante na reutilização das águas, sendo altamente adaptáveis a diferentes condições, assim como a diferentes solos onde possam estar inseridas (Sadvakasova et al., 2022).

Devido a haver uma grande variedade de estirpes e às suas propriedades (Huang et al., 2022), tem havido um esforço elevado para selecionar, testar a capacidade e

aptidão das cianobactérias para serem cultivadas a nível industrial (Becker, 1994). Este esforço é evidente sobretudo nas espécies do género *Arthrospira* spp., sendo a microalga mais cultivada a nível industrial.

Porém, para a maioria das estirpes, existe, ainda, falta de informação sobre a otimização do cultivo, de modo a aumentar a viabilidade económica (Huang et al., 2022).

O cultivo de microalgas, incluindo das cianobactérias, pode ser efetuado de diferentes formas, podendo ser adotados diferentes métodos consoante o objetivo. Este pode ser efetuado em sistema aberto com luz solar direta, sendo o mais comum em *raceway*, ou em sistema fechado, sendo o mais comum o fotobiorreator, vertical ou horizontal, com luz solar direta ou com luz solar artificial (Figura 3) (Pathak et al., 2018).

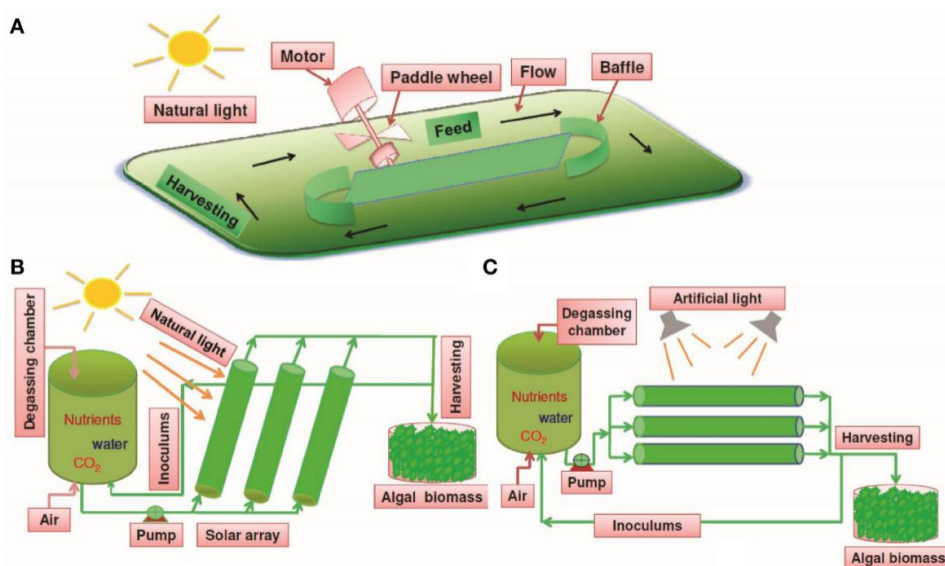


Figura 3- Modelo representativo dos diferentes tipos de sistemas de cultivo em escala industrial de microalgas. (A) – *Raceway* em sistema aberto com luz solar direta, (B) – Sistema fechado com luz solar direta e (C) – Sistema fechado com luz solar artificial) (Pathak et al., 2018).

1.3.1. Cultivo descontínuo ou em *Batch*

O método de produção pioneiro na aquacultura para microalgas e mais comum é o cultivo descontínuo ou em *batch* (Preising & Andersen, 2005). Este procedimento inclui a adição de nutrientes apenas no início do cultivo e uma única colheita de biomassa no final do cultivo. O cultivo em *batch* apresenta diversas vantagens como o baixo custo, a facilidade com que as colónias são manipuladas e os volumes de meios necessários são baixos (Wood et al., 2005).

Neste método de cultivo, o crescimento das microalgas, incluindo as cianobactérias, decorre em diferentes fases (Alterthum, 2020) (Figura 4): Primeiramente, existe uma fase inicial (fase *lag*) de adaptação em que o crescimento é mínimo, porém esta fase

pode ter diferentes tempos dependendo da forma como a cultura-mãe foi aclimatizada e ainda depende do inóculo (maior densidade ou maior volume inicial de inóculo leva a uma fase *lag* menor) (MacIntyre & Cullen, 2005; Preising & Andersen, 2005). Seguidamente, acontece a fase exponencial, que se baseia num crescimento elevado devido à concentração dos nutrientes ser maior do que a necessária e a luz ser abundante, pelo que a microalga se divide muito rapidamente. Esta fase ocorre até ao esgotamento de um nutriente importante ou à limitação da luz solar. Inicia-se, então, a fase estacionária que ocorre quando a velocidade de crescimento dos organismos diminui e atinge uma fase em que o número de novas células no cultivo é igual ao número de células que morrem. Esta diminuição de crescimento deve-se à acumulação de metabolitos tóxicos, ao esgotamento de nutrientes ou oxigénio. Por último, dá-se início à fase de declínio em que o número de células novas é progressivamente inferior ao número de células mortas (Alterthum, 2020; Preising & Andersen, 2005).

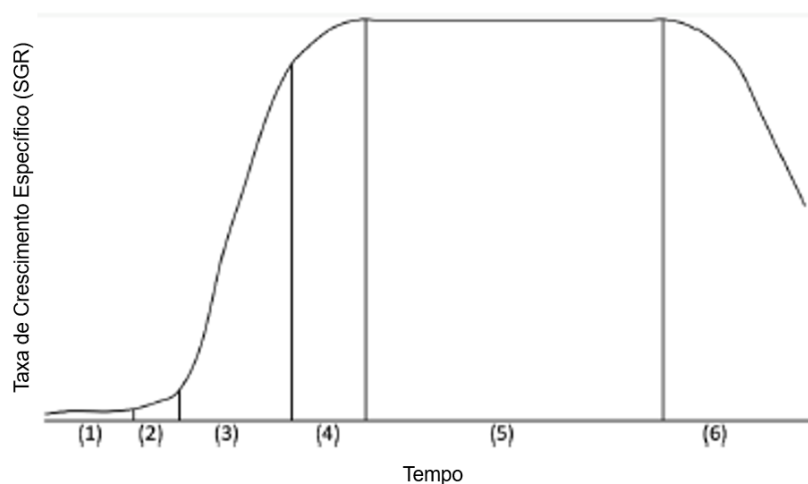


Figura 4- Curva de crescimento de uma cultura de microalgas, quando cultivadas em *batch* [(1) – fase *lag*, (2) – fase de aceleração, (3) – fase exponencial, (4) – fase de desaceleração, (5) – fase estacionária e (6) – fase de declínio].

Num cultivo descontínuo ocorre uma série de colheitas periódicas de uma porção necessária para obter crescimento contínuo na cultura, em momentos cruciais do crescimento da colónia, como a fase estacionária em que o crescimento da colónia é mais lento e quando já atingiu a densidade desejada (Preising & Andersen, 2005).

1.3.2. Sistema aberto com luz solar direta

O cultivo em sistema aberto com luz solar diretamente, feito habitualmente em *raceways* (Figura 5), permite o cultivo de microalgas, incluindo as cianobactérias, de forma bastante económica (Figura 5A). Este tipo de cultivo está limitado a uma quantidade pequena de espécies de microalgas (Borowitzka, 2005).

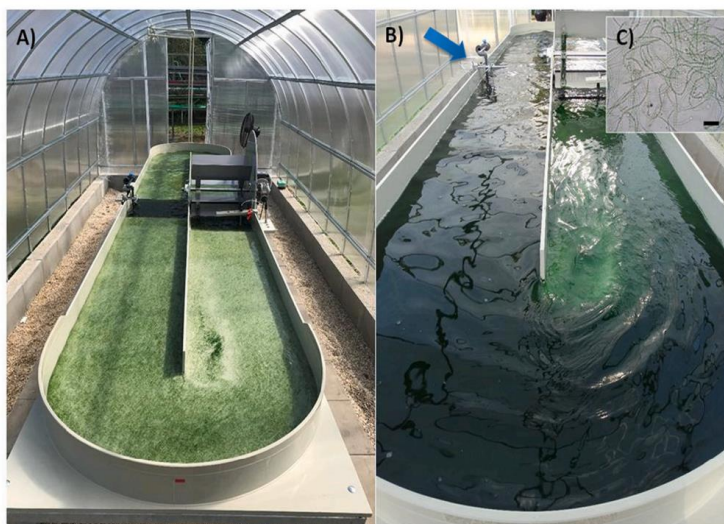


Figura 5- Exemplo de *raceway* utilizado para o cultivo de *Nostoc calcicola* [A) – Inoculação inicial, B) – Após 5 dias de crescimento, C) – Amostra ampliada a 600x] (Celis-Plá et al., 2021).

Neste tipo de sistema são concebidos diferentes tipos de tanques em que variam em tamanho, forma, materiais utilizados na construção e nos dispositivos de mistura, tendo em conta a espécie de microalga a ser cultivada (Barsanti & Gualtieri, 2023).

Para a produção, por exemplo, de *Dunaliella salina* são utilizados, na Austrália, tanques extensos, pouco profundos, sem revestimento e sem dispositivos de mistura sendo inadequado para a maioria das espécies. Por outro lado, em tanques mais profundos, pouco extensos e com dispositivos de arejamento, são cultivadas microalgas como a *Nannochloropsis* sp., sendo este tipo de tanque utilizado geralmente em produções de pequena escala em aquaculturas. Já no Japão e em Taiwan, na produção de *Chlorella* sp., são utilizados tanques circulares (Borowitzka, 2005).

Porém, este é o método que possui maior risco de contaminações. Estas somente conseguem ser evitadas com o cultivo de organismos que requerem condições únicas de crescimento, o que acaba por limitar as aplicações deste sistema. Outro problema apresentado por Pathak et al. (2018) é o facto de este sistema estar sob influência de grandes flutuações das condições ambientais (luz, temperatura, evaporação e chuva), que levam a que a produtividade do sistema sofra grandes flutuações, e mesmo, que a sobrevivência do cultivo seja posta em causa. A grande vantagem deste sistema é o facto de conseguir produzir grandes quantidades de biomassa a baixo custo (Borowitzka, 2005; Pathak et al., 2018).

1.3.3. Fotobiorreator

Fotobiorreator (PBR) é um sistema fechado que não permite as trocas gasosas entre a cultura e a atmosfera, evitando assim as contaminações. Como é fechado, este

promove um cultivo mais seguro, quando comparado com o sistema aberto, possui uma maior capacidade de controlar os parâmetros de cultivo (pH, concentração de O₂ e CO₂ e a temperatura), consegue evitar a evaporação, reduzindo também a utilização da água e, ainda, permite que o cultivo atinja uma maior produtividade (Barsanti & Gualtieri, 2023). É o método mais utilizado pelos países produtores de microalgas na Europa (Araújo et al., 2021). Estes sistemas são mais dispendiosos a nível de construção e de funcionamento do que os sistemas abertos, visto que necessitam de arrefecimento, controlo rigoroso da acumulação de oxigénio e da bioincrustação (Barsanti & Gualtieri, 2023).

1.3.3.1. Fotobiorreator em *airlift*

Um dos tipos de PBR tubulares verticais mais conhecidos é o fotobiorreator *airlift* (ALPBR), visto que consegue proporcionar uma mistura eficaz, devido ao tubo de sucção, à elevada captação de luz e pela elevada transferência volumétrica de gás (Alhaboubi, 2021; Pham et al., 2017). Os ALPBR com uma agitação pneumática, têm sido abundantemente utilizados na indústria química, petroquímica e de bioprocessos (fermentação e tratamento de águas residuais). Mostram-se bastante eficazes no cultivo de microalgas e cianobactérias (Luo & Al-Dahhan, 2008). Um ALPBR é caracterizado por um tanque dividido em duas zonas que se encontram interligadas, em que a direção do fluxo é constante. Na zona ascendente (ou *raiser*) é injetada a mistura de gases que se liberta na parte superior e em que o seu movimento é induzido pela diferença entre a gravidade e a dispersão gás-líquido, fazendo com que a zona descendente (ou *downcomer*) fique desgaseificada (Figura 6). Para melhorar o funcionamento, o tubo pode conter um volume maior de forma que a formação de espuma seja diminuída e evite assim a recirculação do gás através da zona descendente. Dado o seu funcionamento simples, torna-se vantajoso o seu uso, visto que fornece um elevado coeficiente de transferência e oferece um elevado suplemento de CO₂, enquanto efetua a remoção do O₂ dissolvido, na suspensão das cianobactérias. Outra grande vantagem é o facto de haver baixo risco de rutura celular, pelo facto de a cultura não se encontrar em contacto com qualquer elemento mecânico (Duan & Shi, 2014; Kilonzo et al., 2010; Massart et al., 2014; Pham et al., 2017).

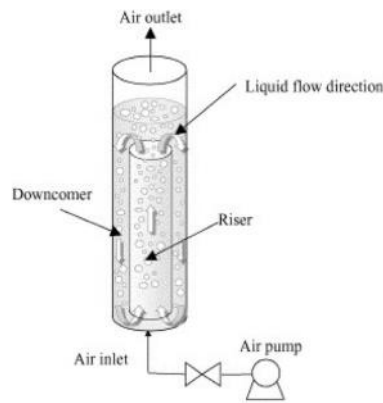


Figura 6- Representação esquemática do reator *airlift* (Duan & Shi, 2014).

O ALPBR mostra vantagens como a facilidade de construção sem partes móveis, o baixo consumo de energia, proporcionando elevada transferência de calor e massa, e oferecendo uma boa suspensão de sólidos e uma maior produtividade, quando comparados os resultados com tanques com agitação. Finalmente, fornecem uma maior capacidade da utilização da energia luminosa para a fotossíntese (Alhaboubi, 2021; Duan & Shi, 2014; Luo & Al-Dahhan, 2008; Pham et al., 2017).

1.3.3.2. Fotobiorreator com biofilme móvel

O fotobiorreator com biofilme móvel (*moving bed photobioreactor*, MBPBR) é um tipo de reator radial duradouro, podendo ser utilizado em processos aeróbios, anaeróbios ou anóxicos. Este tipo de PBR é utilizado essencialmente em tratamentos de águas residuais. Porém, dependendo do objetivo da cultura, também podem ser utilizados para a produção de cianobactérias. No crescimento desta cultura são utilizadas biobolas, na maioria dos casos, feitas de polietileno de alta densidade (Walther et al., 2022). Contrariamente à maioria dos PBR com biofilme, os MBPBR utilizam todo o volume do tanque para o crescimento da biomassa, tendo, assim, uma perda de carga baixa. Neste tipo de reator a biomassa cresce nas biobolas, movimentando-se, assim, livremente pelo volume de água (Rusten et al., 2006).

Quando este é utilizado em processos aeróbios, o movimento é causado pela agitação criada pela difusão do ar (Figura 7). Dentro de cada MBPBR, existe um sistema de disposição de crivos, dispostos vertical ou horizontalmente. A sua forma mais comum é cilíndrica, para reter as biobolas, e ainda um sistema de arejamento especial através de bolhas grandes (Rusten et al., 2006).

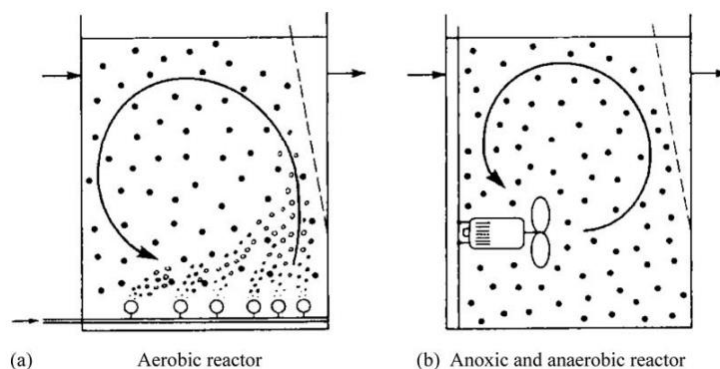


Figura 7- Representação esquemática de como funciona um fotobiorreator com biofilme móvel (a) – Reator aeróbio; (b) – Reator anaeróbio] (Rusten et al., 2006).

1.4. *Nostoc* spp.

Nesta dissertação foi utilizada a cianobactéria *Nostoc* sp. que pertence à Divisão Cyanobacteria, Classe Cyanophyceae e Ordem Nostocales (Tabela 1). Neste género estão incluídas 108 espécies (Guiry & Guiry, 2023).

Tabela 1- Representação taxonómica de *Nostoc* sp. (Adaptado de Guiry & Guiry (2023)).

Domínio	Prokaryota
Reino	Eubacteria
Sub-reino	Negibacteria
Filo	Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Subclasse	Nostocophycidae
Ordem	Nostocales
Família	Nostocaceae
Género	<i>Nostoc</i>

Nostoc corresponde a um género de cianobactérias filamentosas fixadoras de azoto, que formam colónias de filamentos macro ou microscópicas, podendo ser encontradas livres ou em associações simbióticas em ambientes terrestres ou aquáticos (Allaf & Peerhossaini, 2022; Borowitzka, 2018).

As colónias deste género de cianobactéria formam tapetes gelatinosos, com uma bainha mucilagínosa que protege a mesma. Esta apresenta filamentos irregulares emaranhados. Na fase inicial, esta apresenta-se em maior quantidade na superfície da colónia, acabando depois por se distribuir uniformemente pela mucilagem colonial, podendo obter uma elevada densidade. Esta cianobactéria tem um crescimento lento

(Figura 8) e o seu ciclo de vida pode ser variado, diversificando-se de espécie para espécie (Borowitzka, 2018; Komárek, 2013; Komárek & Johansen, 2015).

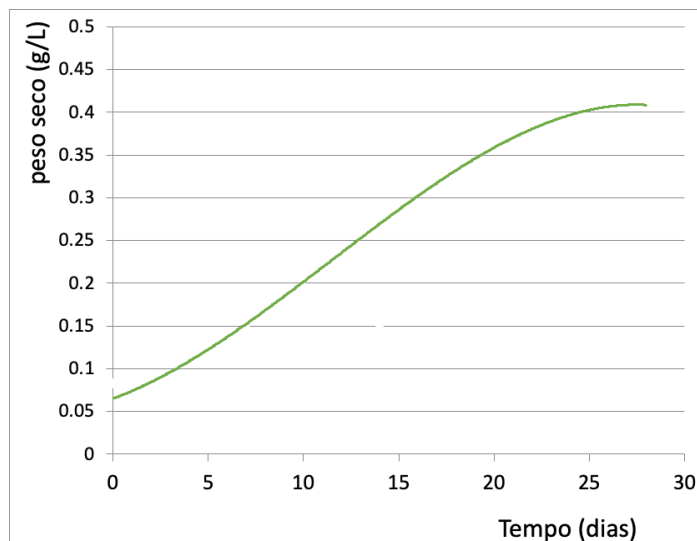


Figura 8- Curva de crescimento da *Nostoc* sp. 136 utilizada (Mouga et al., 2023).

Os tricomas apresentam-se rodeados por bainhas mucilaginosas firmes e largas. As células vegetativas e as terminais são esféricas ou ovais. Os tricomas são simples e encontram-se emaranhados, formando grandes colônias de filamentos e mucilagem (Borowitzka, 2018; Komárek, 2013; Komárek & Johansen, 2015).

Durante a sua vida, os indivíduos da Ordem Nostocales passam por diversas fases (Figura 9). Em condições ambientais favoráveis, os indivíduos diferenciam tricomas longos, formados por células vegetativas. Uma característica distinta desta Ordem é a sua capacidade de fixar azoto inorgânico, como referido. Isto é, em casos de privação de azoto no meio, estas cianobactérias têm a capacidade de fixar azoto atmosférico, através da diferenciação de heterocistos. Estas cianobactérias são habitualmente encontradas em filamentos compostos por células especializadas na realização de fotossíntese e nas atividades metabólicas essenciais. Realizando fissão binária ou fragmentação, dividem-se a partir do filamento inicial. À medida que estas se dividem, os indivíduos têm a capacidade de formar colônias tridimensionais, em que maioritariamente das vezes, são encapsuladas por uma matriz gelatinosa de proteção. A formação de hormogónios confere mobilidade e dispersão ao organismo, porém dependente da espécie. Esta movimentação dentro da matriz gelatinosa, permite a dispersão para novos ambientes. O frio e privação de fósforo também induzem a síntese abundante de bainha mucilaginosa e heterocistos, em intervalos regulares. Se as condições do meio ambiente se tornarem desfavoráveis, os indivíduos da Ordem Nostocales, têm a capacidade de formar células de resistência (acinetos). Estes, mesmo

após longos períodos sob condições adversas, têm a capacidade de gerar uma nova colônia (Álvarez et al., 2023; Blackburn & Parker, 2005; Borowitzka, 2018; Hou et al., 2024; Komárek, 2013; Komárek & Johansen, 2015).

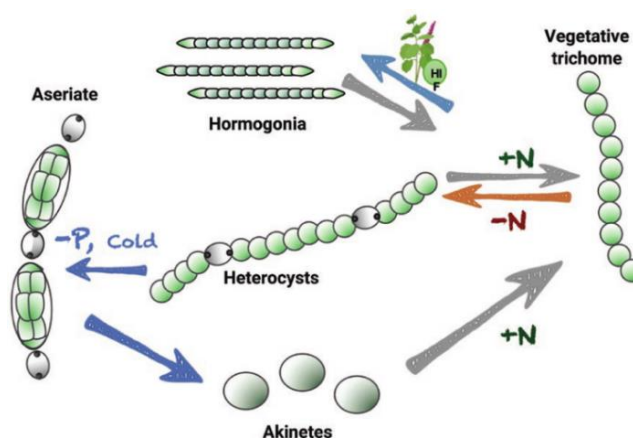


Figura 9- Imagem ilustrativa do ciclo de vida da Ordem Nostocales, em função das condições ambientais (Álvarez et al., 2023).

Dada a sua grande capacidade adaptativa, o género *Nostoc* é capaz de desenvolver grandes colónias com uma alta variedade de formas, tamanhos, texturas, cores (verde-escuro, preto, verde-amarelado, castanho-avermelhado, entre outras) e mesmo odor. Os tricomas destas colónias estão envolvidos numa espessa camada de exopolissacáridos, que contêm também proteínas de proteção. Esta camada proteica, juntamente com pigmentos extracelulares, desempenha um papel importante na proteção celular contra a alta irradiância e contra a radiação UV (Borowitzka, 2018).

O *Nostoc* pode ser encontrado em lagoas, lagos, riachos e rios, em solos húmidos (edáfica) ou sobre a rocha (epilítica), sendo principalmente bentónicas. Pode, ainda, ser epífita de macroalgas (Komárek, 2013; Komárek & Johansen, 2015).

1.4.1. Cultivo de *Nostoc* spp.

Dadas as suas aplicações, seja na reabilitação dos solos, na bioenergia, no biodiesel (Kujawska et al., 2021; Fal et al., 2023; Mostafa et al., 2012), como em papel de biofertilizantes ou até mesmo na alimentação, o *stock* natural tem servido como fonte destas cianobactérias (Li & Gao, 2004). No entanto, o aumento da sua procura gerou um declínio significativo das populações naturais, portanto, a fim de satisfazer a demanda no mercado, cada vez mais estão a ser realizadas tentativas de produção deste género em cultura (Mostafa et al., 2012). Para a produção de culturas do género *Nostoc*, não existe um método mais adequado, visto que diferentes estirpes deste género têm necessidades diferentes em termos de substrato, agitação e o tipo de cultivo irá depender do objetivo final.

Celis-Plá et al. (2021) afirma que, sendo um táxon filamentososo, o género *Nostoc* é especialmente sensível à agitação, pelo que o seu cultivo industrial se torna mais desafiante. Para este, os métodos mais eficazes seriam os *raceways* e os ALPBR, sendo o primeiro mais limitado durante a produção devido à propagação da luz na coluna de água. Foi realizado um estudo por Celis-Plá et al. (2021) com *Nostoc calcicola*, em que foi comprovado que a utilização de *raceways* teria uma elevada produtividade em termos de quantidade de biomassa e, ainda, na produção de metabolitos alvo, visto que esta cianobactéria tem uma grande capacidade de foto aclimatização. O estudo feito por Walther et al. (2022), comprovou, ainda, que o crescimento em MBPBR oferece muitas vantagens (por exemplo, resistência a fatores externos). Porém, este método não é adequado para a recolha de biomassa, podendo ser utilizado, por exemplo, para ajudar em processos de nitrificação (Rusten et al., 2006).

Em contrapartida, Ortiz-Moreno et al. (2020) afirma que o cultivo de espécies pertencentes ao género *Nostoc*, como a *N. muscorum*, em sistemas abertos com luz solar direta (*raceways*) ou PBRs não são os mais acertados visto que geram uma baixa taxa de crescimento. Esta espécie, quando sujeita a muita agitação, não consegue formar uma bainha mucilagínosa adequada, facilitando a infeção por bactérias e fungos oportunistas, que geram biofilmes. O *Nostoc* desloca-se para zonas do tanque sem meio de cultura, morrendo por falta de nutrientes. Para esta espécie, Ortiz-Moreno et al. (2020) afirma que, para uma elevada produção de biomassa e taxa de crescimento, otimizando as trocas de calor e a absorção de nutrientes, seria necessário um cultivo com substrato sólido.

1.4.2. Aplicações de *Nostoc* spp.

O biodiesel é um combustível alternativo aos combustíveis fósseis, não é tóxico para o meio ambiente e é biodegradável, e é obtido através de fontes renováveis (óleos alimentares como de palma, soja, girassol, entre outros). Contudo, o biodiesel proveniente de culturas oleaginosas mostrou não ser sustentável em termos de produção (Chisti, 2008). Uma alternativa a estes óleos são os lípidos produzidos por microalgas, visto que, através da energia solar, do CO₂ e dos nutrientes presentes no meio, conseguem gerar rapidamente biomassa. Esta biomassa compreende metabolitos primários importantes (açúcares, proteínas e lípidos). Os óleos produzidos podem ser utilizados na produção de biodiesel. *Nostoc* sp. foi identificada como uma cianobactéria capaz de substituir as fontes de biodiesel não sustentáveis, dado à sua constituição e produção ser muito superior às fontes utilizadas (Allaf & Peerhossaini, 2022; Mostafa et al., 2012).

As cianobactérias foram, também, analisadas como uma solução de biorremediação para diversos contaminantes, como metais pesados, pesticidas, fenóis, xenobióticos, entre outros. A *Nostoc* sp. mostrou-se uma possível solução devido a conseguir utilizar o glifosato como fonte de fósforo e, conseqüentemente, ajudando na remoção deste de solos contaminados (El-Bestawy et al., 2007; Pathak et al., 2018).

Os biofertilizantes baseiam-se em estirpes únicas ou múltiplas (micróbios, algas, bactérias ou fungos) que geram um melhor crescimento das plantas por colonizarem a rizosfera e o interior da planta e haver a capacidade de fornecer uma maior quantidade de nutrientes (Allouzi et al., 2022). Dado o aumento da produção agrícola, houve também uma necessidade de desenvolver recursos ricos em azoto de forma alternativa e sustentável. As cianobactérias mostraram-se como um constituinte importante de biofertilizantes naturalmente disponíveis, visto que estas têm capacidades de associações simbióticas com diversos organismos e, também, devido a serem capazes de solubilizar e mobilizar os fosfatos orgânicos insolúveis, melhorando assim a disponibilidade de fósforo para a cultura. Após diversos estudos, diversas espécies do género *Nostoc* mostraram-se capazes de apresentar uma elevada atividade redutora de acetileno e a sua alta capacidade de fixar azoto. No Chile, algumas espécies como *Nostoc commune*, *N. ellipsosporum* e *N. linckia* já são utilizadas para ser atingida uma maior produtividade nos campos de arroz (Pathak et al., 2018; Pereira et al., 2009; Prasanna et al., 2013).

As cianobactérias cada vez mais são identificadas como uma fonte não convencional de proteínas, lípidos saudáveis, minerais, antioxidantes e vitaminas. Dado o seu número elevado de componentes saudáveis, vários países como o Peru, México, Filipinas e Chile, já utilizam diversas cianobactérias, especialmente o género *Nostoc*, como suplemento alimentar. Por exemplo, a espécie *Nostoc punctiforme* foi analisada como uma fonte viável de vitamina B, pentoteno e ácido nicotínico (Abed et al., 2009; Pathak et al., 2018).

As culturas de *Nostoc* sp. são iniciadas com filamentos livres em cultura líquida, onde, em condições ótimas, acabam por formar microcolónias que depois evoluem para grandes colónias. Porém, até à data, a sua produção industrial não é, ainda, viável, visto que os custos de produção são demasiado elevados, quando comparados com as baixas taxas de crescimento alcançadas (Borowitzka, 2018).

1.5. Taxa de crescimento e produtividade

A produção de biomassa algal, utilizando culturas em regimes intensivos de elevados rendimentos e elevada qualidade, está diretamente relacionada com a taxa de

crescimento específica (SGR), que avalia a concentração do cultivo ao longo do tempo. O controlo e o melhor conhecimento da SGR ajudam na reprodutibilidade dos processos de cultivo e é fundamental durante a otimização das biossíntheses existentes para a produção da biomassa. Como a SGR não é medida diretamente, é sempre necessário ter em atenção a dinâmica do cultivo (Urnieszus et al., 2023). Segundo um estudo realizado por Yu et al. (2009) com a *Nostoc flagelliforme* foi obtida uma taxa de crescimento específica do cultivo de $0,12 \text{ dia}^{-1}$. A fórmula de cálculo da SGR encontra-se na secção relativa ao material e métodos.

A taxa de crescimento relativo (RGR) é igualmente um indicador da aptidão das espécies mediante os ecossistemas em que estão inseridas. Esta taxa apresenta uma elevada variabilidade de valores visto que se encontra intimamente relacionada com a fisiologia e a morfologia (Lin et al., 2022). A RGR é vista como uma expressão de “energia de crescimento”. Esta taxa é uma medida de eficiência que evidencia a capacidade que a célula tem para produzir novo material orgânico (Pommerening et al., 2023). Para Li & Gao (2004), o valor obtido na *Nostoc sphaeroides* foi entre $17,5$ e $35\%.\text{dia}^{-1}$, durante o cultivo por 10 dias a 25°C . A fórmula de cálculo da RGR encontra-se na secção relativa ao material e métodos.

A produtividade das culturas de cianobactérias diz respeito à eficiência da realização de processos biológicos, resultando na produção de biomassa ou de metabolitos importantes, num determinado período. Dependendo dos objetivos específicos da cultura, a sua produtividade pode ser medida de diversas formas (quantidade de biomassa ou metabolitos, taxa de crescimento, eficiência fotossintética, entre outros). Como os nutrientes, a luz e o CO_2 são alguns recursos limitantes, a disponibilidade destes durante o crescimento da cultura, pode ser interpretada como um fator determinante no crescimento e na produtividade da cultura (Franco-Morgado et al., 2023; Gao et al., 2022; Khanra et al., 2022; Subashchandrabose et al., 2013; Zavřel et al., 2021). A fórmula de cálculo da produtividade encontra-se na secção relativa ao material e métodos.

1.6. Parâmetros de cultivo

O cultivo de cianobactérias é influenciado pelos fatores abióticos (luz [qualidade e/ou quantidade], a temperatura, os nutrientes, a água, o O_2 , o CO_2 , o pH, a salinidade e a quantidade de químicos tóxicos) e bióticos (presença de microrganismos patogénicos, como bactérias, fungos e vírus, outras microalgas e a posterior competição) e por outros fatores operativos, como o arejamento, diluições, frequência de colheita, entre outros (Pathak et al., 2018). No entanto, os parâmetros considerados mais importante que

regulam o crescimento de microalgas e que vão ser alvo de uma breve descrição são a temperatura, o pH, o arejamento, a luminosidade, a quantidade de nutrientes e os contaminantes biológicos (Barsanti & Gualtieri, 2023).

1.6.1. Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores responsáveis pela produtividade, estando, assim, relacionada com a taxa de crescimento específica, uma vez que afeta os seus processos metabólicos e a sua composição bioquímica (Huesemann et al., 2016; Montagnes & Franklin, 2001). Este parâmetro tem influência também na distribuição das comunidades de microalgas (Kholssi et al., 2023, 2024).

Habitualmente, as culturas de microalgas são mantidas a temperaturas entre os 16 e os 27°C, tendo sempre em atenção a composição do meio da cultura, a espécie, a estirpe cultivada e, em especial, o local de onde esta foi recolhida. Na sua maioria, as microalgas são mantidas num intervalo médio entre os 18 e os 20°C. Quando são utilizadas incubadoras ou salas com controlo de temperatura, é mantida uma temperatura constante, podendo oscilar $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para a maioria das estirpes, temperaturas inferiores a 16°C geram uma taxa de crescimento mais baixa, enquanto temperaturas acima de 35°C são letais para um elevado número de espécies (Barsanti & Gualtieri, 2023).

A alteração significativa da temperatura pode levar à desregulação da fotossíntese, visto que afeta a viabilidade do Fotossistema II e a fluidez da membrana dos tilacoides, o que altera, por sua vez, a produção de biomassa (Kholssi et al., 2023, 2024). As flutuações de temperatura afetam as reações metabólicas e as atividades enzimáticas nas microalgas. As mudanças bruscas de temperatura podem causar stress nos organismos, levando à inibição ou ao aumento da produção de compostos orgânicos importantes, como as ficobiliproteínas ou os exopolissacáridos (Paliwal et al., 2017).

1.6.2. pH

A manutenção de um nível de pH correto é crucial para o crescimento e a produtividade das microalgas. As alterações temporárias do pH afetam a distribuição do carbono orgânico, interferindo com a disponibilidade de nutrientes. Dadas as diferentes necessidades de cada espécie, a gama de pH pode variar entre 7 e 9,5 (Nguyen et al., 2022), sendo que, segundo Barsanti & Gualtieri (2023) a gama ótima para a maioria das espécies é de 8,2 a 8,7. Existem, porém, exceções de espécies que vivem em ambientes mais ácidos/básicos, como por exemplo a cianobactéria *Arthrospira platensis* em que o pH alcalino favorece a produção da biomassa e mantém a homeostase celular (Muthu et al., 2020).

A incapacidade de manter um pH aceitável durante o crescimento da cultura pode levar ao seu colapso devido à perturbação de diversos processos celulares (Barsanti & Gualtieri, 2023).

1.6.3. Arejamento

A contínua agitação na cultura favorece o crescimento celular e uma maior densidade, visto que faz com que a cultura esteja periodicamente exposta à luz e aos nutrientes presentes no meio, ajudando também na prevenção da sedimentação e facilitando as trocas gasosas entre o meio de cultura e o ar (Barsanti & Gualtieri, 2023; Itoh et al., 2022).

1.6.4. Luminosidade

As reações fotossintéticas nos organismos fotoautotróficos dependem da luz como fonte primária de energia (Zarei et al., 2023). Assim, é necessário ter em conta diversos parâmetros como: a irradiância, a qualidade espectral e o fotoperíodo. Estes parâmetros devem ser tidos em conta mediante os requisitos da cultura (Barsanti & Gualtieri, 2023).

A irradiância (energia irradiada em uma área específica) influencia a biomassa e a composição das microalgas. Em especial na acumulação de lípidos, incluindo carotenoides e alteração no perfil de ácidos gordos e de polissacáridos extracelulares. Baixos níveis de irradiância aumentam a síntese proteica (Delattre et al., 2016). Porém, níveis excessivamente elevados de irradiância induzem a foto-inibição em que o aumento da intensidade da luz se torna prejudicial e pode levar à morte da cultura (Behrens, 2005).

A irradiância da luz mais utilizada para as cianobactérias varia entre os 100 e os 200 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, sendo que esta pode ser natural ou fornecida por lâmpadas fluorescentes no espectro de luz azul ou vermelho (espectro mais ativo no espectro de luz da fotossíntese), mais recentemente substituídas por lâmpadas LED (Barsanti & Gualtieri, 2023).

Para além da irradiância, o fotoperíodo tem influência no crescimento. Dependendo da espécie em questão, é necessário ter em atenção a necessidade de cada uma, ou seja, se estas se desenvolvem sob iluminação constante ou não e qual o seu fotoperíodo com ciclos claro/escuro (LD) mais favorável (máximo 16:8 LD, sendo os mais utilizados 14:10 ou 12:12 LD) (Barsanti & Gualtieri, 2023).

O espectro visível de luz imite fotões com diferentes comprimentos de onda, devido à dispersão da luz. Os comprimentos de onda não absorvidos pela matéria são refletidos, e, portanto, traduzem-se em cores distintas. Assim, a clorofila é verde porque absorve luz sobretudo nos comprimentos de onda azul e vermelho, refletindo o verde.

A utilização de luz de diferentes comprimentos de onda permite promover a produção de metabolitos específicos. A luz azul demonstrou promover a acumulação de fosfolípidos e de ácido docosahexaenóico (DHA) em *Isochrysis galbana* (Lima et al., 2021), um teor mais elevado de luteína em *Chlamydomonas* sp. (Leong & Chang, 2023) e também um maior aumento de produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* (Katsuda et al., 2008). A luz vermelha demonstrou aumentar a produção de C-ficocianina em *Synechococcus* sp. e a sua taxa de crescimento específica (Abdur Razzak et al., 2023), um aumento da propagação da microalga *Chlorella vulgaris* (Chhandama et al., 2023), e a divisão celular foi também aumentada sob o efeito da luz vermelha em diversas algas (Esakkimuthu et al., 2024). Assim, a utilização de comprimentos de onda distintos parece ser eficiente na produção de metabolitos diversos e no aumento da produtividade de microalgas, porém os estudos são ainda bastante limitados.

1.6.5. Nutrientes

Os nutrientes têm uma influência direta na composição celular das microalgas e na produtividade dos cultivos. A manipulação dos nutrientes no meio consegue redirecionar as funções celulares para a síntese de certos metabolitos (Barsanti & Gualtieri, 2023; Procházková et al., 2014).

Os nutrientes podem ser classificados como: como macronutrientes, que são necessárias em concentrações elevadas e são fundamentais para a síntese das biomoléculas (Barsanti & Gualtieri, 2023; Procházková et al., 2014); e como micronutrientes, que por sua vez são necessários em concentrações muito mais baixas. Por vezes, os micronutrientes não necessitam ser adicionados ao meio por estarem presentes na água ou nas impurezas de produtos químicos (Barsanti & Gualtieri, 2023; Procházková et al., 2014). Dependendo da estirpe deve ser selecionado o meio mais adequado. Para as cianobactérias, o meio utilizado é o BG11 modificado, em que os macronutrientes são o fosfato e o nitrato e os micronutrientes são, por exemplo, o cobalto e o cobre. A classificação de micro ou macronutrientes é efetuada mediante a necessidade das microalgas, sendo que o que pode ser um micronutriente para uma espécie, pode ser um macronutriente para outra (Procházková et al., 2014). Quando, no meio de cultura, os nutrientes se encontram em quantidades superiores ou inferiores das necessárias, o seu metabolismo, a fotossíntese, o crescimento e a composição bioquímica são afetados (Alavianghavanini et al., 2024).

O azoto é um macronutriente crucial, com grande impacto no crescimento e na composição bioquímica das microalgas. É um componente essencial das proteínas,

incluindo, portanto, as enzimas e as ficobilinas, bem como do material genético e de compostos orgânicos azotados, necessários à manutenção do crescimento das microalgas (Lu et al., 2019; Yaakob et al., 2021; Zhao et al., 2023).

O ferro é um nutriente igualmente importante, que influencia a fixação de azoto, dada que a nitrogenase contém ferro como cofator, e também na organização cromossômica (Barsanti & Gualtieri, 2023a; Sadvakasova et al., 2022).

O magnésio é um nutriente de elevada importância, dado que este é central na constituição da molécula de clorofila. Este afeta, também, a atividade fotossintética visto que é responsável pela ativação de inúmeras enzimas como a adenosina trifosfato (ATP)-ases e a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), necessária na fixação de carbono (Jaghdani et al., 2021).

1.6.6. Agentes contaminantes

Durante o processo de cultura, podem ser encontrados diversos organismos contaminantes como outras microalgas (Abdur Razzak et al., 2023), fungos (Abdur Razzak et al., 2023; Hosseini et al., 2024), vírus (Lawrence, 2005) e bactérias (Abdur Razzak et al., 2023; Hosseini et al., 2024), que irão colocar a cultura em risco, nomeadamente através competição por nutrientes. A utilização de procedimentos assépticos são importantes e devem ser efetuado com rigor, para evitar a contaminação durante o manuseamento das culturas de organismos vivos (Kawachi & Noel, 2005).

2. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi efetuar o cultivo de *Nostoc* sp. 136, bem como aumentar o rendimento do cultivo a nível laboratorial através da produção com diferentes parâmetros de cultivo para a manutenção das culturas. Esta rotina ajudou a construir um banco de dados, incluindo os melhores parâmetros de cultivo.

Os objetivos específicos do trabalho foram os seguintes:

- (1) Produção de biomassa a partir de inóculo;
- (2) Avaliação da concentração inicial ótima de cultivo;
- (3) Avaliação de diferentes meios de cultivo;
- (4) Manipulação da concentração de nutrientes no melhor meio de cultivo;
- (5) Cultivo sob diferentes comprimentos de onda.

3. Materiais e Métodos

3.1. Testes de crescimento

A cianobactéria *Nostoc* sp.136 foi obtida através da empresa Alga₂O, Coimbra, Portugal. O *scale-up* foi desenvolvido a partir de um inóculo de 20mL. Os cultivos foram desenvolvidos na sala de cultivo de microalgas, sob temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, e as culturas sujeitas a um fotoperíodo de 16:8 (claro/escuro), com luz LED branca fria e irradiância de $8,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida com um Medidor de iluminância (Konica Minolta, T-10).

Previamente à utilização, todo o material de vidro/metal foi antecipadamente lavado com ácido clorídrico (HCl) a 10%, de forma a eliminar quaisquer contaminantes, durante 30 minutos. Posteriormente foi enxaguado com água destilada tipo 3 duas vezes, e por fim uma vez com água destilada tipo 2, para eliminar quaisquer vestígios da solução de limpeza. Após a limpeza, todo o material de vidro/metal foi autoclavado a 120°C durante 15 minutos (Uniclave 88, AJC).

O meio de cultura utilizado para o crescimento das culturas foi o meio BG11 modificado (BG11M). Este é um meio enriquecido em nutrientes, mas sem vitaminas (Rippka et al., 1979), muito comum nos cultivos de cianobactérias. Todos os ensaios de controlo foram mantidos com o meio BG11M, a uma concentração de 1000mL/L, com as características apresentadas no Anexo 1.

A preparação do BG11M seguiu as indicações de Rippka et al. (1979).

A cultura de *Nostoc* sp. 136 foi mantida em balões volumétricos de 250mL, em modo *batch* com arejamento constante, filtrado com um filtro Midisart 2000 (Sartorius, Stedim Biotech GmbH, Goettingen, German) de $0,2 \mu\text{m}$ (Figura 10).



Figura 10- Início do ensaio com *Nostoc* sp. 136 usando diferentes meios de cultivo.

Todos os ensaios foram efetuados em triplicado, durante 15 dias, em que era realizado um intervalo de 15 dias entre cada ensaio, sempre em balões volumétricos de 250mL, sendo cada inóculo preparado em meio assético, usando um bico de Bunsen.

3.1.1. Monitorização dos cultivos

Para cada ensaio, foi pesada a biomassa, no tempo 0 e no tempo 15, de forma a poder ser efetuada a avaliação do crescimento e o cálculo da taxa de crescimento, apresentadas seguidamente. No tempo 0 ocorreu a separação de um volume de 4 mililitros em *falcons*, com a posterior centrifugação a 3000rpm (Eppendorf, Centrifuga 5810 R) durante 3 minutos (Figura 11). Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi pesado numa balança analítica (Sartorius, TE124S) para que fosse possível uma inoculação de biomassa. A toda a biomassa foram adicionados 200mL de meio. Na avaliação do tempo 15 foi realizado um processo semelhante ao tempo 0, em que a diferença se baseou na pesagem, dado que neste tempo o objetivo era quantificar a biomassa obtida após os 15 dias de ensaio.



Figura 11- Fotografia representativa dos *falcons* utilizados na separação de amostras na centrifugadora.

Com os resultados das pesagens inicial e final, foi calculada a Taxa de Crescimento Específico (SGR) e a Taxa de Crescimento Relativo (RGR) de acordo com as fórmulas 1 e 2.

Para cada cultura foi calculada a Taxa de Crescimento Específica (SGR, dia⁻¹) de acordo com (Yu et al., 2009):

$$SGR = \frac{\ln c_2 - \ln c_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

em que c_1 é a concentração da amostra em t_1 e c_2 é a concentração da amostra no tempo t_2 .

A Taxa de Crescimento Relativa (RGR, %·dia⁻¹), para cada cultura, foi calculada de acordo com a fórmula (Patarra et al., 2017):

$$RGR = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t} \times 100 \quad (2)$$

em que x_1 e x_2 representam o peso inicial e final húmido em gramas, respetivamente, e o t significa tempo em dias.

A produtividade (g·L⁻¹·dia⁻¹) é calculada, para cada cultura, através da fórmula (El Shafay et al., 2021):

$$Produtividade = \frac{(c_f - c_i)}{t} \quad (3)$$

em que c_f e c_i representam a concentração final e inicial, respetivamente, e o t significa o tempo em dias.

Para ser efetuado o cálculo do peso seco, 35mL de cada amostra foi centrifugada, por 3 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante e o *pellet* foram separados, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi colocado numa folha de alumínio, previamente identificada e pesada, para ser seco numa estufa (IF110, Memmert) durante 24 horas à temperatura de 60°C, quando atinge um peso estável. A amostra foi arrefecida no exsiccador e pesada.

A humidade é calculada em percentagem a partir da equação (4), de acordo com os métodos AOAC (Latimer, 2016) em que dw e ww representam o peso seco e peso húmido, respetivamente:

$$Humidade = \frac{dw - ww}{dw} \times 100 \quad (4)$$

O peso seco é calculado de acordo com a equação (5), em percentagem:

$$Peso\ seco = \frac{dw}{ww} \times 100 \quad (5)$$

3.1.2. Produção de biomassa através da manipulação da concentração inicial

Todas as condições foram mantidas constantes, conforme descritas em cima. O objetivo do ensaio inicial foi avaliar qual seria a concentração inicial do inóculo mais vantajosa para os ensaios, pelo que foram testadas diferentes concentrações de cianobactéria inicial. Para este ensaio foram utilizados 3 triplicados, cultivados em balões volumétricos de 250mL, sendo a variável independente a concentração de inóculo inicial (Tabela 2).

Tabela 2- Concentrações iniciais (g.L⁻¹) do cultivo de *Nostoc* 136 em BG11M.

Meio	Concentração inóculo
BG11M	1,002
BG11M	3,702
BG11M	5,174

3.1.3. Produção de biomassa com diferentes meios de cultivo

No segundo ensaio foram testados os meios comerciais Nutribloom e FloraNova, devido à sua constituição e ao sucesso que demonstraram com diferentes estirpes de microalgas, macroalgas e/ou plantas (Urbicult, 2024; Phytobloom, 2024). Para estes, embora a sua composição química fosse diversa (Anexo 1, 2 e 3), a quantidade de nitratos foi ajustada para a proporção ótima de 16N:4P:1K (azoto:fosforo:potássio) (Zhao et al., 2023). Assim, para fazer os 200mL, no Nutribloom foram utilizados 250μL do concentração com 199,75mL de água destilada tipo 2, e para a utilização do FloraNova foram utilizados 50μL do concentrado juntamente com 199,95mL de água destilada tipo 2. O controlo, como referido, foi o meio BG11M. As diferentes concentrações utilizadas estão sumariadas na Tabela 3.

Tabela 3- Concentração utilizada dos diferentes meios utilizados no ensaio.

Meio	Concentração do meio
BG11M	1000mL/L
FloraNova	250μL/L
Nutribloom	1,25mL/L

3.1.4. Produção de biomassa através da manipulação da concentração de nutrientes (azoto, ferro e magnésio)

No ensaio anterior averiguou-se que o meio que promove um crescimento mais acentuado de *Nostoc* sp. 136 é o BG11M. Assim, em todos os ensaios subsequentes foi utilizado este meio.

O meio BG11M foi manipulado, sendo-lhe adicionado um macronutriente (azoto) ou um de dois micronutrientes (ferro ou magnésio). O azoto, devido à sua influência na síntese de biomoléculas como as proteínas e, portanto, as ficobilinas; o ferro, visto que intervém na fixação de azoto, dado que faz parte da composição química da enzima nitrogenase; e ainda o magnésio, por fazer parte da composição química da clorofila e da enzima Rubisco, intervindo também na produção de ATP.

Este ensaio teve, assim, como objetivo analisar a influência dos nutrientes azoto, ferro e magnésio na taxa de crescimento. Foram, portanto, alteradas as quantidades destes nutrientes no meio, conforme consta da Tabela 4.

Tabela 4- Concentrações (g.L⁻¹) utilizadas dos nutrientes estudados.

	Controlo	1,5x	2x
Azoto	1,5000	2,2500	3,0000
Ferro	0,0030	0,0045	0,0060
Magnésio	0,0750	0,1125	0,2625



Figura 12- Início do ensaio do cultivo de *Nostoc* sp. 136 submetido a diferentes concentrações dos nutrientes.

3.1.5. Avaliação da produção de *Nostoc* sp. em função do comprimento de onda da luz

Relativamente às luzes utilizadas, foram escolhidas as luzes azul e vermelha. A luz azul mostrou-se, em estudos anteriores, em outras estirpes de cianobactérias, bastante favorável na síntese de DHA, astaxantina e na ficocianina (Katsuda et al., 2008; Lima et al., 2021). A luz vermelha mostrou-se benéfica na produção de ficoeritrina e numa maior taxa de crescimento, juntamente com a aceleração do mesmo (Abdur Razzak et al., 2023; Esakkimuthu et al., 2024).

Neste ensaio foram testadas 5 combinações de cores nas culturas, com o objetivo de entender qual/quais o(s) comprimentos de onda iriam induzir uma maior produção de biomassa, e, conseqüentemente, maior taxa de crescimento.

O controlo deste ensaio foi o meio BG11M com a luz branca fria (LED T8 Glass 24W, Luxtek) e irradiância de 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entre os ensaios foi mantida a irradiância,

alterando apenas a combinação de comprimentos de onda. Para o efeito foram usadas luzes LED RGB, programáveis (Figura 13), organizadas em 3 fiadas horizontais, distando 2 cm entre si, à altura do balão de cultivo (Wishkerman & Wishkerman, 2017).

Desta maneira, foram realizados ensaios com as combinações de cores apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Características dos comprimentos de onda utilizadas (Carreres-Prieto et al., 2020; Davidson, 2023) .

	Comprimento de onda (nm)	Irradiância ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Luz branca fria	Pico a 450 e 550-620	8
Azul LED	Pico a 460 (440 – 470)	8
Vermelha LED	Pico a 625 (610 – 640)	8
Azul e Branca LED	440-470	8
Vermelha e Branca LED	610-640	8

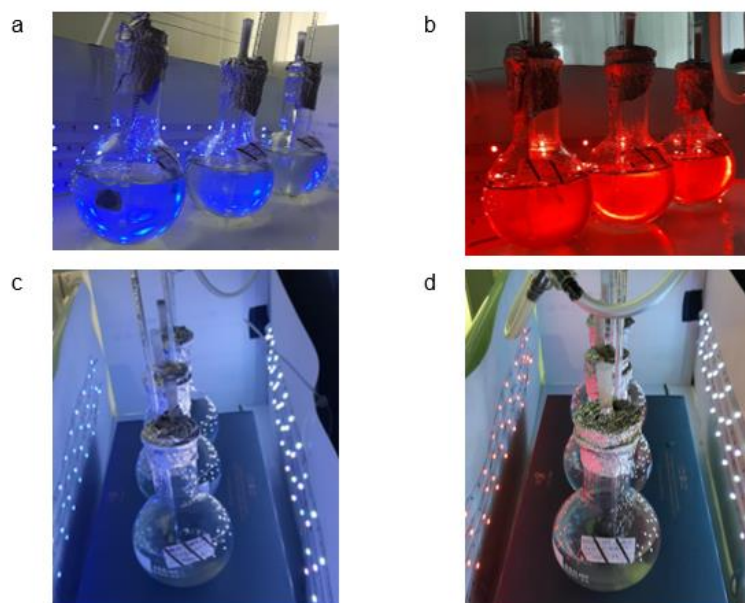


Figura 13- Início do ensaio com os diferentes combinações de luzes utilizadas no ensaio de crescimento de *Nostoc* sp. 136 (a- Azul, b- Vermelho, c- Azul/Branco, d- Vermelho/Branco).

3.2. Análise estatística

Os dados apresentados são expressos em valores de média \pm desvio-padrão, tendo sido realizados triplicados. A análise estatística foi efetuada mediante um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). De forma a testar a normalidade e a homogeneidade foram utilizados, respetivamente, os testes de Kolmogorov-Smirnov e o Shapiro-Wilk. Nos casos em que os dados atenderam aos pressupostos, foi utilizado o teste ANOVA one-

way e o teste Tukey HSD. Caso não sejam cumpridos os pressupostos, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Estas análises foram efetuadas através do software estatístico IBM SPSS, versão 27.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA).

4. Resultados

4.1. Manipulação da concentração inicial

Os valores de humidade obtidos foram bastante semelhantes entre as concentrações utilizadas (1,0, 3,7 e 5,17 g.L⁻¹), porém o maior valor obtido corresponde à maior concentração, 5,174 g.L⁻¹, com um valor de 98,715 %. Foi obtida uma proporcionalidade inversa entre a proporção peso húmido/peso seco e a humidade, e, desta forma, o maior valor de proporção foi obtido no ensaio com a menor humidade, sendo este com a concentração de 3,702 g.L⁻¹ e tendo um valor de 2,793 % (Tabela 6).

Tabela 6- Valores correspondentes ao peso fresco, após serem congeladas as amostras, e o respetivo peso seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes concentrações de biomassa inicial (g.L⁻¹) de *Nostoc* sp. 136.

Concentração inicial (g.L ⁻¹)	Peso fresco (g.L ⁻¹ , ww)	Peso seco (mg.L ⁻¹ , dw)	dw/ww (%)	Humidade (%)
1,002 ± 0,030	2,323	48,500	2,088	97,912
3,702 ± 0,058	5,120	143,000	2,793	97,207
5,174 ± 0,060	7,119	91,500	1,285	98,715

A produtividade verificada ao final dos 15 dias, obteve um valor mais alto para a concentração de 3,70 g.L⁻¹, 2,195 ± 0,847 g.L⁻¹.dia⁻¹ (Tabela 7), não se observando diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 7- Valores correspondentes às diferentes concentrações iniciais e finais (g.L⁻¹) e a produtividade (g.L⁻¹ dia⁻¹) correspondente de *Nostoc* sp. 136. Dados apresentados em média ± desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Concentração inicial (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
1,002 ± 0,030	1,880 ± 0,584 ^a
3,702 ± 0,058	2,195 ± 0,847 ^a
5,174 ± 0,060	2,014 ± 0,292 ^a

Ao determinar as taxas de crescimento ao fim de 15 dias, após serem efetuadas as manipulações da concentração inicial da biomassa, foi possível observar que o crescimento diminuiu consoante o aumento da biomassa.

Tanto para a SGR como a RGR, foram obtidas, para a concentração de biomassa de 1,002 g.L⁻¹, valores de 0,222 ± 0,018 dia⁻¹ e 22,194 ± 1,772 %.dia⁻¹, respetivamente (Figura 14, Tabela 8). Quando comparados os restantes valores, não foram encontradas

diferenças estatisticamente significativas na SGR entre a concentração mais baixa e as restantes, já na RGR foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre todas as concentrações, registando um p -value $< 0,05$.

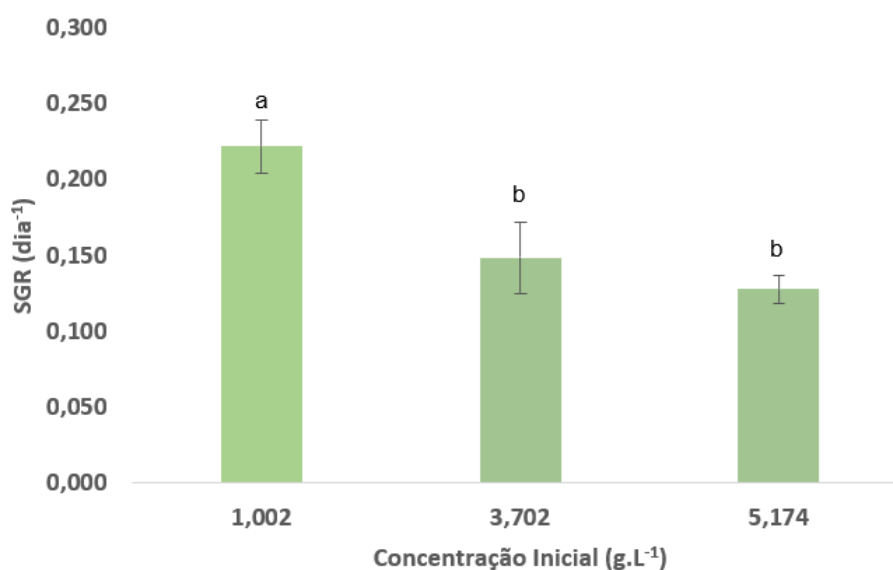


Figura 14- Taxa de crescimento específica (dia⁻¹) mediante diferentes concentrações de biomassa inicial (g.L⁻¹) de *Nostoc* sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 8- Taxa de crescimento relativo (%.dia⁻¹) mediante diferentes concentrações de biomassa inicial (g.L⁻¹) de *Nostoc* sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Concentração inicial (g.L ⁻¹)	RGR (%.dia ⁻¹)
1,002	22,194 \pm 1,772 ^a
3,702	14,869 \pm 2,367 ^b
5,174	12,767 \pm 0,900 ^c

4.2. Avaliação mediante diferentes meios

Relativamente à humidade, foi observado que o meio que apresentou maior valor foi o meio FloraNova, com um valor de 99,531 %, enquanto a maior proporção entre o peso seco/peso fresco, isto é, a proporção de matéria seca, foi obtida para o meio BG11M com um valor de 2,793 % (Tabela 9).

Tabela 9- Valores correspondentes ao peso fresco, após serem congeladas as amostras, e o respetivo peso seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes meios de cultivo para a *Nostoc* sp. 136.

Meio	Peso fresco (g.L⁻¹, ww)	Peso seco (mg.L⁻¹, dw)	dw/ww (%)	Humidade (%)
FloraNova	10,127	47,500	0,469	99,531
BG11M	5,120	143,000	2,793	97,207
Nutribloom	21,330	219,000	1,027	98,973

Após o ensaio, foram calculadas as concentrações iniciais e finais. Foi calculada a produtividade para cada meio utilizado. Aquele que apresentou um maior valor foi o BG11M com $2,195 \pm 0,847$ g.L⁻¹.dia⁻¹. Foram obtidas diferenças estatisticamente significativas quando comparada a produtividade obtida com a utilização do meio FloraNova e os restantes (Tabela 10).

Tabela 10- Valores correspondentes às concentrações iniciais e finais (g.L⁻¹) e a respetiva produtividade (g.L⁻¹ dia⁻¹) mediante diferentes meios de cultivo para a *Nostoc* sp. 136. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Meio	Produtividade (g.L⁻¹ dia⁻¹)
FloraNova	$0,058 \pm 0,101^a$
BG11M	$2,195 \pm 0,847^b$
Nutribloom	$0,879 \pm 0,147^b$

No final do ensaio, as taxas de crescimento foram calculadas mostrando que, de entre os meios analisados, o que proporcionou um crescimento maior foi o BG11M (Figura 15).

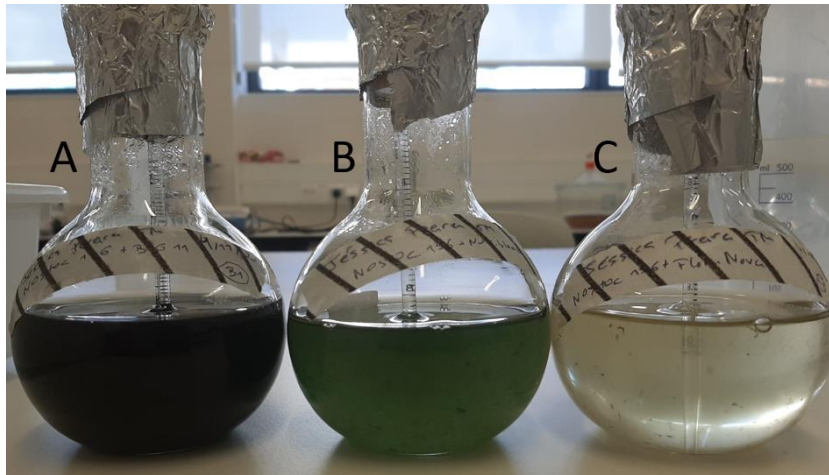


Figura 15- Balões volumétricos utilizados no ensaio de crescimento com os diferentes meios, no final do ensaio (A- BG11M, B- Nutribloom, C- FloraNova).

Os melhores valores apresentados para o crescimento da *Nostoc* sp. 136 foram $0,149 \pm 0,024 \text{ dia}^{-1}$ e $14,869 \pm 2,367 \text{ \%}.\text{dia}^{-1}$, sendo estes a SGR e a RGR, respectivamente (Figura 16, Tabela 11). A um nível de significância, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparada tanto a SGR como a RGR de FloraNova com as restantes.

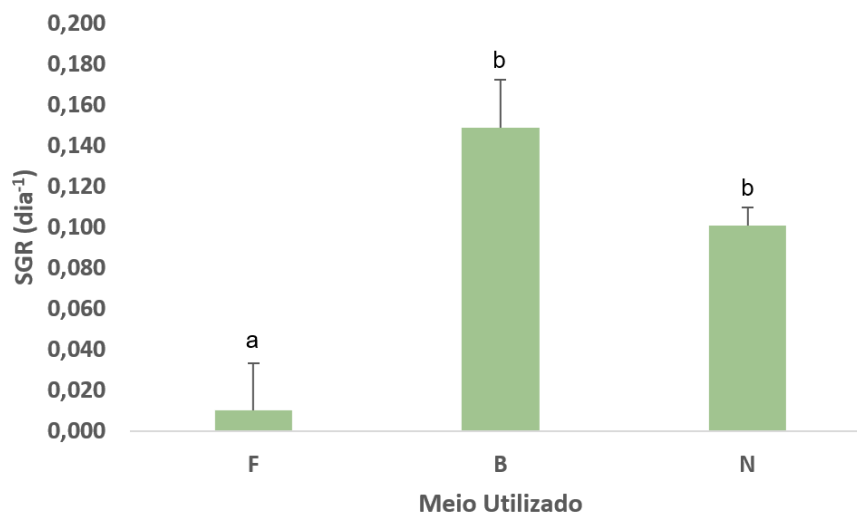


Figura 16- Taxa de crescimento específica (dia^{-1}) mediante diferentes meios de cultivo para a *Nostoc* sp. 136 (F- FloraNova, B- BG11M, N- Nutribloom). Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 11- Taxa de crescimento relativo (%.dia⁻¹) mediante diferentes meios de cultivo para a *Nostoc* sp. 136. Dados apresentados em média ± desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Meio utilizado	RGR (%.dia ⁻¹)
FloraNova	1,038 ± 2,298 ^a
BG11M	14,869 ± 2,367 ^b
Nutribloom	10,104 ± 0,861 ^b

4.3. Manipulação da concentração de nutrientes

Quando comparados os valores obtidos relativamente à humidade mediante os diferentes nutrientes, os valores variaram entre 96 e 98 %. O maior valor obtido foi obtido na suplementação de magnésio a 1,5x, registando-se uma humidade de 98,428 %. Por outro lado, o maior valor obtido para a proporção entre o peso fresco/peso seco foi obtido no azoto 1,5x com um valor de 3,499 % (Tabela 12).

Tabela 12- Valores correspondentes ao peso fresco, após serem congeladas as amostras, e o respetivo peso seco e a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a *Nostoc* sp. 136 (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente);

Nutrientes	Peso fresco (g.L ⁻¹ , ww)	Peso seco (mg.L ⁻¹ , dw)	dw/ww (%)	Humidade (%)
Controlo	2,323	48,500	2,088	97,912
Azoto 1,5x	2,487	87,000	3,499	96,501
Azoto 2x	4,784	141,500	2,958	97,042
Ferro 1,5x	5,918	126,000	2,129	97,871
Ferro 2x	3,746	185,000	2,897	97,103
Magnésio 1,5x	5,185	81,500	1,572	98,428
Magnésio 2x	3,695	107,000	2,896	97,104

No final do ensaio, foi calculada a produtividade para cada nutriente e concentração utilizada. O valor mais elevado obtido foi 0,452 ± 0,111 g.L⁻¹ dia⁻¹ para o azoto 1,5x (Tabela 13), não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 13- Dados obtidos para as concentrações iniciais e finais (g.L⁻¹) e a respetiva produtividade (g.L⁻¹ dia⁻¹) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a *Nostoc* sp. 136 (valor médio ± desvio-padrão) (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L⁻¹ de azoto, ferro e magnésio respetivamente); Dados apresentados em média ± desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Nutriente	Produtividade (g.L⁻¹ dia⁻¹)
Controlo	0,376 ± 0,117 ^a
Azoto 1,5x	0,452 ± 0,111 ^a
Azoto 2x	0,318 ± 0,017 ^a
Ferro 1,5x	0,226 ± 0,136 ^a
Ferro 2x	0,279 ± 0,120 ^a
Magnésio 1,5x	0,418 ± 0,078 ^a
Magnésio 2x	0,277 ± 0,065 ^a

No ensaio de crescimento de *Nostoc* sp. 136 em que houve manipulação dos nutrientes do meio BG11M, os valores das taxas de crescimento não foram significativamente diferentes entre cada concentração de nutriente estudada, com exceção das concentrações 1,5x e 2x de magnésio, para as quais a SGR e na RGR mostraram valores significativamente mais baixos, como está representado nas Tabelas 14 e 15.

Analisados os nutrientes, tanto para o magnésio como para o ferro, o melhor resultado foi apresentado no controlo com uma SGR e uma RGR de 0,222 ± 0,018 dia⁻¹ e 22,194 ± 1,772 %.dia⁻¹, respetivamente. Porém, para a suplementação de azoto 1,5X, obteve-se um crescimento máximo para ambos os indicadores, com valores de 0,232 ± 0,017 dia⁻¹ e 23,234 ± 1,750 %.dia⁻¹ (Tabela 14 e 15).

Tabela 14- Taxa de crescimento específica (dia^{-1}) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para *Nostoc* sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão) (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Nutriente	controlo	1,5x	2x
Azoto		0,232 \pm 0,017 ^a	0,211 \pm 0,014 ^{a,c}
Ferro	0,222 \pm 0,018 ^{a,c}	0,180 \pm 0,039 ^{a,b,c}	0,198 \pm 0,031 ^{a,b,c}
Magnésio		0,150 \pm 0,012 ^{a,b,c}	0,125 \pm 0,015 ^{b,c}

Tabela 15- Taxa de crescimento relativo ($\%.\text{dia}^{-1}$) mediante diferentes concentrações de azoto, ferro e magnésio para a *Nostoc* sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão) (1x – controlo com concentração normal de 1,5, 0,003 e 0,075 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 1,5x – concentração de 2,25, 0,005 e 0,113 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente; 2x – concentração de 3, 0,006 e 0,263 g.L^{-1} de azoto, ferro e magnésio respetivamente); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Nutriente	controlo	1,5x	2x
Azoto		23,239 \pm 1,750 ^a	21,112 \pm 1,395 ^{a,c}
Ferro	22,194 \pm 1,772 ^{a,c}	18,050 \pm 3,879 ^{a,b,c}	19,782 \pm 3,080 ^{a,b,c}
Magnésio		14,975 \pm 1,180 ^{a,b,c}	12,454 \pm 1,472 ^{b,c}

4.4. Avaliação mediante comprimentos de onda diferentes

Durante a avaliação do valor de humidade obtida de entre cada comprimento de onda, os valores foram os menos constantes variando entre 93 e 99 %. O maior valor de 99,44 % foi obtido no ensaio com o comprimento de onda vermelho, que corresponde às menores taxas de crescimento. Já na proporção peso húmido/peso seco foi obtido o maior valor para o ensaio com o comprimento de onda azul com um valor 6,4682 % (Tabela 16).

Tabela 16- Valores correspondentes ao peso fresco, após serem congeladas as amostras, e o respetivo peso seco, a sua proporção (%) e a humidade (%) mediante diferentes comprimentos de onda utilizadas no crescimento para a *Nostoc* sp. 136.

Comprimento de onda	Peso fresco (g.L ⁻¹ , ww)	Peso seco (mg.L ⁻¹ , dw)	dw/ww (%)	Humidade (%)
Branco	5,646	204,00	3,613	96,387
Azul	3,997	258,50	6,468	93,532
Vermelho	2,078	11,50	0,554	99,447
Branco/Vermelho	9,630	125,50	1,303	98,697
Branco/Azul	3,461	56,50	1,633	98,367

A avaliação do crescimento da cianobactéria mediante os diferentes comprimentos de onda permitiu verificar um valor semelhante entre a utilização da luz branca e da combinação entre a luz branca e vermelha. Porém, em todos os outros ensaios verificou-se um decréscimo do crescimento de *Nostoc*, quer quando foi utilizado somente a luz vermelha (Figura 17), quer a luz azul, quer a combinação azul/branca. Em ambas as taxas (SGR e RGR) foram obtidas diferenças estatisticamente significativas somente entre o controlo (Branco), o comprimento de onda Vermelho e a junção entre o Branco e o Vermelho.

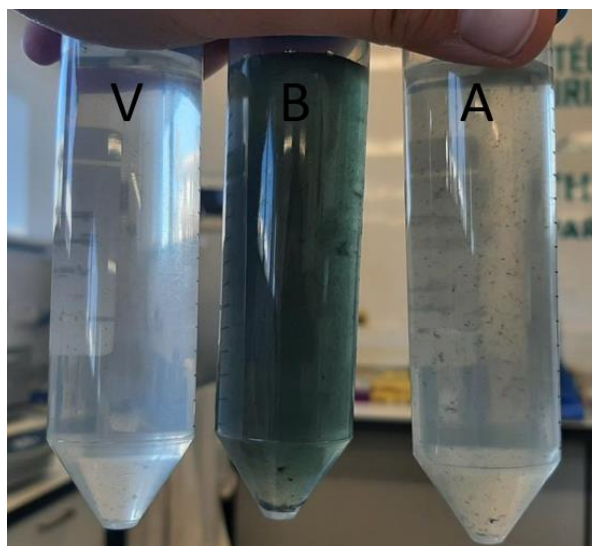


Figura 17- Tubos de centrifuga utilizados durante a amostragem do ensaio de crescimento com os diferentes comprimentos de onda (V- Vermelho, B- Branco, A- Azul).

No final do ensaio foram calculadas as concentrações iniciais e finais e conseqüentemente a produtividade. O melhor valor adquirido pertence à combinação de cores vermelho/branco, $0,378 \pm 0,112$ g.L⁻¹ dia⁻¹, sendo bastante similar ao valor

apresentado pelo controlo (luz branca), $0,353 \pm 0,018 \text{ g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 17). A nível de diferenças estatisticamente significativas foi visto que houve diferenças estatísticas da cor vermelha com todas as cores utilizadas, com exceção da cor azul, da cor branca com as restantes cores utilizadas, menos com a junção de cores branco/vermelho, e da junção de cores branco/azul com as restantes cores utilizadas, menos com a cor azul.

Tabela 17- Concentrações iniciais e finais (g.L^{-1}) e a respetiva produtividade ($\text{g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) obtida mediante diferentes comprimentos de onda utilizados no crescimento para a *Nostoc* sp. 136 (valor médio \pm desvio-padrão); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Comprimento de onda	Produtividade ($\text{g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)
Branco	$0,353 \pm 0,018^a$
Azul	$0,145 \pm 0,090^{b,c,d}$
Vermelho	$-0,019 \pm 0,003^c$
Branco/Vermelho	$0,378 \pm 0,112^{a,b}$
Branco/Azul	$0,069 \pm 0,014^d$

O valor máximo de SGR foi atingido no ensaio em que se usou apenas luz branca, seguido do ensaio onde se juntou a luz branca e a luz vermelha, com $0,142 \pm 0,003 \text{ dia}^{-1}$ e $0,142 \pm 0,020 \text{ dia}^{-1}$, respetivamente. Já para o RGR foi obtido um valor máximo de $14,237 \pm 1,961 \text{ \%.dia}^{-1}$, durante a utilização da combinação das luzes branca e vermelha (Figura 18, Tabela 18), mas muito próximo do valor de RGR obtido para a luz branca. Todos os outros valores são significativamente menores quando comparados os diferentes comprimentos de onda e o controlo registando-se, mesmo, crescimento negativo no ensaio onde se usou apenas luz vermelha.

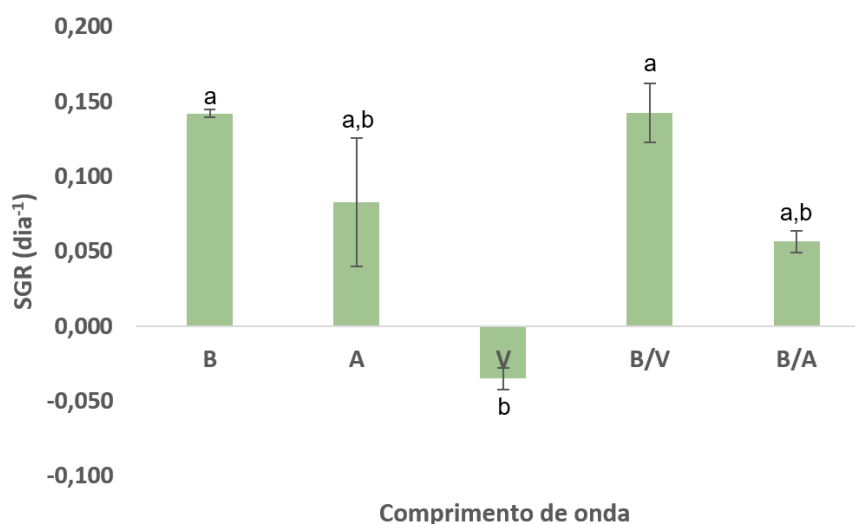


Figura 18- Taxa de crescimento específica (dia⁻¹) mediante diferentes comprimentos de onda utilizadas no crescimento para a *Nostoc* sp. 136 (B- Branco, A- Azul, V- Vermelho, B/V- Branco e Vermelho, B/A- Branco e Azul); Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 18- Taxa de crescimento relativa (%.dia⁻¹) mediante diferentes comprimentos de onda utilizados no crescimento para a *Nostoc* 136; Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, (n=3); Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.

Comprimento de onda	RGR (%.dia ⁻¹)
Branco	14,205 \pm 0,266 ^a
Azul	8,277 \pm 4,284 ^{a,b}
Vermelho	-3,477 \pm 0,730 ^b
Branco/Vermelho	14,237 \pm 1,961 ^a
Branco/Azul	5,661 \pm 0,701 ^{a,b}

5. Discussão

5.1. Manipulação da concentração inicial

Neste estudo, mediante a manipulação da concentração inicial foi possível observar que embora as três concentrações tenham obtido resultados positivos ao longo dos 15 dias, a concentração mais eficaz foi a 1,002 g.L⁻¹. Foram apresentadas diferenças estatisticamente significativas quando comparada a concentração mais baixa com as restantes, mostrando uma clara influência no crescimento.

De acordo com estudos anteriores relativos ao crescimento das microalgas sabe-se que a primeira fase apresentada no crescimento das cianobactérias é a fase *lag* que pode ter diferentes tempos, dependendo da forma como a cultura-mãe seja aclimatizada e depende também da concentração inicial do cultivo (maior concentração ou maior volume geram um fase *lag* menor) (MacIntyre & Cullen, 2005; Preising & Andersen, 2005).

Num ensaio executado com *Arthrospira platensis* por Khanh et al. (2017) foi observado o mesmo padrão apresentado pela *Nostoc* sp. 136, em que a densidade mais baixa apresentou uma maior RGR quando comparado com as densidades mais elevadas (concentração de 1,002 g.L⁻¹ RGR de 22,194 ± 1,772 %.dia⁻¹, concentração de 5,174 g.L⁻¹ RGR de 12,767 ± 0,900 %.dia⁻¹). Uma justificação apresentada foi devido à maior concentração, existe uma maior cobertura de luz entre as células, o que gera uma limitação na fotossíntese quando a densidade da cultura é elevada, levando assim a que a RGR seja menor do que quando comparada com a baixa densidade.

Corroborando os dados obtidos neste estudo, igualmente o estudo realizado com *Nostoc linckia* por Sen (1990) mostrou bons resultados quando a cultura é iniciada com uma baixa concentração.

A quantidade de peso seco obtido mediante as concentrações iniciais de 1,002, 3,702 e 5,174 g.L⁻¹, foi de 48,5, 143,0 e 91,5 mg.L⁻¹, respetivamente. A concentração 3,702 g.L⁻¹ mostrou, quando comparados os resultados com a curva de crescimento previamente obtida (Figura 8), que se encontrava numa fase mais avançada do crescimento, possivelmente no início da fase exponencial. Por isso, a concentração inicial utilizada nos restantes ensaios foi a concentração 3,702 g.L⁻¹, visto que uma maior concentração gera uma menor fase *lag* (MacIntyre & Cullen, 2005; Preising & Andersen, 2005) o que irá providenciar à cultura um crescimento mais rápido, sendo atingida a fase exponencial e também a fase estacionária mais rapidamente, tal como foi observado neste estudo.

5.2. Avaliação mediante diferentes meios

Mediante os três meios utilizados no presente estudo, ocorreu uma clara diferença de crescimento. O BG11M apresentou-se como o melhor meio para o cultivo de *Nostoc* sp. 136 visto que apresentou os melhores resultados nos parâmetros estudados, mostrando uma grande diferença estatisticamente significativa com o FloraNova, em que os resultados foram muito baixos e inconstantes. Porém, quando comparado com o Nutribloom, não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas, mostrando um possível substituto para o BG11M.

Num ensaio realizado com *Nostoc linckia* por Touloupakis et al. (2023) utilizando o BG11M foram obtidos resultados similares ao do presente estudo, como uma maior biomassa, uma maior produtividade e um maior peso seco. Embora não tenha sido testado nem observado no presente estudo, Touloupakis et al. (2023) verificou que, quando cultivada com BG11M, a *N. linckia* obteve maior conteúdo de clorofila, proteína e ficobilinas.

De acordo também com os resultados obtidos neste estudo, um ensaio realizado com *Nostoc commune* por Diao & Yang (2014) observou que esta espécie é cultivada com sucesso utilizando BG11M, visto que, com o passar do tempo, esta aumentou a sua concentração, o seu peso fresco e seco.

Arthrospira platensis é uma cianobactéria filamentosa de elevado valor económico, devido à sua alta qualidade nutricional. Condições como a temperatura, o pH, o oxigénio dissolvido e a fonte de azoto desempenham um papel importante no crescimento (Delrue et al., 2017; Zsalszabil et al., 2023). Segundo um estudo realizado por Carneiro et al. (2018) com *Arthrospira platensis* e usando o meio FloraNova obteve uma SGR de $0,132 \pm 0,402 \text{ dia}^{-1}$ ao final de 10 dias, mostrando-se capaz de substituir o típico meio utilizado no crescimento. Desta forma, tratando-se de cianobactérias, seria de esperar que este meio tivesse sucesso com a *Nostoc* sp. 136. Porém, foi obtido uma SGR de $0,010 \pm 0,020 \text{ dia}^{-1}$, sendo o pior resultado obtido. O meio mais utilizado para a *Arthrospira platensis* é o meio Zarrouk modificado, no qual os macronutrientes são o nitrato de potássio (KNO_3) e o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (Rajasekaran et al., 2015), enquanto para a *Nostoc* sp. 136 o meio mais utilizado é o BG11M com os macronutrientes fosfato e nitrato.

O meio Nutribloom mostrou-se bastante eficaz até agora para microalgas como a *Tisochrysis lutea* (Nishshanka et al., 2022) e a *Nannochloropsis* sp. (Carneiro et al., 2022; Phytobloom, 2024). Foram alcançados valores como $1,00 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ de peso seco para a *Nannochloropsis* sp. (Carneiro et al., 2022) o que se mostrou superior ao

valor obtido para a *Nostoc* sp. 136 nestes estudo (219 mg.L^{-1} de peso seco). Enquanto para a *Tisochrysis lutea* foi obtido um valor inferior ao obtido neste estudo com a *Nostoc* sp. 136 ($0,879 \pm 0,147 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) de $0,42 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Esta diferenças de valores obtidos podem ser justificadas com as diferentes necessidades a nível do cultivo quando comparadas as microalgas e as cianobactérias.

Segundo a composição proveniente do fabricante de Nutribloom (Phytobloom, 2024) (Anexo 2) os principais componentes são o fosfato monopotássico, o cloreto de ferro e o EDTA. Enquanto no BG11M os principais componentes são o nitrato de sódio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e o ácido fosforoso (Rippka et al., 1979) (Anexo 1). Esta diferença de componentes pode ser uma justificação para a diferença entre os valores obtidos perante o crescimento. Porém, foi observado que este se mostrou bastante promissor, visto que os resultados obtidos no presente estudo foram elevados e não mostraram diferenças estatisticamente significativas com o BG11M.

5.3. Manipulação da concentração de nutrientes

Os três nutrientes estudados apresentaram padrões diferentes com o aumento da sua concentração. A suplementação com magnésio obteve uma constante diminuição do crescimento de *Nostoc* e por consequência menores taxas de crescimento. Para o azoto e para o ferro, embora as taxas de crescimento tenham sido menores quando comparadas com o controlo, não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações, ou seja, as concentrações utilizadas não tiveram uma alta influência no crescimento.

Segundo Lu et al. (2019), o aumento da carga exagerada de nutrientes como o azoto, leva à eutrofização, o que gera um aumento excessivo de biomassa algal (*blooms*). O azoto foi identificado como uma das principais fontes do aumento da atividade dos metabolismos responsáveis pela florescência de cianobactérias. O aumento da biomassa das cianobactérias é consequente das interações sinérgicas entre os nutrientes disponíveis e a sua capacidade fisiológica de os utilizar em condições favoráveis.

Num ensaio realizado por El-fayoumy et al. (2023) com *Nostoc linkia* foi observado que as concentrações de azoto que favorecem o crescimento foram $1,5$ e 3 g.L^{-1} , concentrações acima destas inibiram o crescimento. Concentrações elevadas podem ter inibido o crescimento visto que quando adicionado azoto em excesso ocorre a inibição da síntese da enzima nitrogenase, responsável pela fixação do azoto atmosférico. Este estudo está de acordo com os nossos resultados, visto que na concentração de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ foi obtido o maior valor de crescimento. Porém neste estudo

houve um decréscimo de biomassa nos 2 g.L⁻¹ o que não vai de encontro ao ensaio efetuado por El-fayoumy et al. (2023).

Conforme Sadvakasova et al. (2022) observou, que existe uma relação entre a concentração de ferro e o rendimento quântico fotoquímico do Fotossistema II, visto que ocorre uma correlação positiva entre o aumento da concentração e o rendimento. Um estudo efetuado por Howe et al. (2020) com *Nostoc* PCC 7120 mostrou que a limitação de ferro induz um crescimento celular mais lento, apesar das células se manterem igualmente viáveis e não mostrarem qualquer paragem no crescimento. No presente estudo é importante salientar que as espécies reativas de oxigénio (ROS) presentes nas microalgas possuem características diversas e por consequente diferentes níveis de toxicidade e alvos. De entre eles, temos o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) que, embora seja o menos reativo, tem a capacidade de ser reduzido a radical hidroxilo via a reação de Fenton, acabando por libertar ferro ferroso que pode gerar lesões celulares extensas. Quando ocorrem situações de desequilíbrio entre o nível de oxidantes e a produção de antioxidantes, os organismos são expostos a elevados níveis de stress oxidativo, podendo levar à morte celular. As cianobactérias necessitam de gerir não só o stress oxidativo proveniente da redução de oxigénio tal como os seres heterotróficos, como também o stress oxidativo gerado durante o transporte fotossintético de eletrões (Latifi et al., 2009). É, assim, necessário entender que a homeostase de ferro é muito importante de forma a evitar o stress oxidativo e a possível morte celular. Sendo também necessário perceber que uma elevada quantidade de ferro presente no meio de cultura irá afetar a mesma de forma negativa, como foi verificado no ensaio, visto que, embora não tenham sido obtidas diferenças estatisticamente significativas, observou-se um menor crescimento com o aumento da concentração de ferro.

Segundo um estudo feito por Surilayani et al. (2011), com o aumento da concentração de magnésio na cultura, foi obtido um valor três vezes maior na formação de heterocistos. Esta diferença na concentração mostrou que o magnésio tem um forte impacto no teor proteico e no peso seco de *Nostoc* sp. (0,02-0,14g). No presente estudo foi observado que com o aumento da concentração de magnésio foi obtido resultados diferentes, visto que a taxa de crescimento foi inferior ao controlo e a produtividade 1,5x foi superior, mas a 2x foi inferior, sempre sem significado estatístico. Pokharel et al. (2018) utilizou *Nostoc punctiforme* num ensaio em que foi verificado que quando ocorre o crescimento celular não ocorrem trocas de magnésio entre as células e o meio. Visto que este é um micronutriente para a *Nostoc* sp. podemos ver que o aumento da sua concentração não tem benefícios, visto que não ocorreu um aumento da sua biomassa.

5.4. Avaliação mediante comprimentos de onda diferentes

Os diferentes comprimentos de onda utilizados apresentaram padrões de crescimento diferentes quando comparados entre eles. Durante os 15 dias de estudo foi possível observar um crescimento significativo na luz branca e na junção da luz branca e vermelha. Por outro lado, observou-se que quando utilizada somente a luz vermelha para a *Nostoc* sp. 136 não foi obtido um crescimento positivo, havendo até um decréscimo da quantidade de biomassa.

Em contrapartida aos resultados obtidos neste estudo, Han et al. (2014) efetuou um ensaio com *Nostoc flageliforme* em que foram testados diferentes comprimentos de onda. Neste ensaio, o comprimento de onda que obteve uma melhor taxa de crescimento média foi a luz vermelha a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando comparado com os restantes. Han et al. (2014) concluiu que tanto a luz vermelha como a azul foram as que apresentaram um crescimento mais rápido, e, por isso, eram as mais adequadas para o crescimento celular. A diferença apresentada entre o estudo efetuado e o de Han et al. (2014) foi a irradiância da luz administrada no cultivo (no presente estudo foi de $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o que pode ter influenciado o crescimento.

No entanto, Suphan et al. (2023) realizou um ensaio com *Nostoc* sp. em que foi verificado um bom desenvolvimento e crescimento quando cultivadas sob baixa irradiância de luz, como $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

De acordo com o estudo realizado por Devi & Parthiban (2020) com *Nostoc ellipsosporum* foi observado um perfil de crescimento diferente sob a influência de distintos comprimentos de onda. Foi verificado um crescimento notável nas cores branco e vermelho inicialmente, porém, o crescimento sob a luz azul mostrou-se superior quando comparado com as restantes, utilizando irradiância entre os 46 e $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ao final de 7 dias, sob a luz vermelha, a cultura apresentou uma tendência decrescente no crescimento, tal como a apresentada no presente estudo. Assim, foi observado por Devi & Parthiban (2020) que a melhor taxa de crescimento pertencia à luz azul, sendo seguida pela luz branca e por fim a vermelha.

Outras microalgas, ainda, mostraram padrões de crescimento diferentes, dependendo dos pigmentos fotossintéticos presentes. Patelou et al. (2020) efetuou um estudo com *Nannochloropsis gaditana* em que foi observado um crescimento similar entre a luz vermelha e azul, utilizando uma irradiância de $20 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Uma possível justificação apresentada foi, devido à sobreposição parcial no espectro, as qualidades entre as luzes podem ser similares. Porém, foi com a luz vermelha que foi obtida a maior densidade da cultura. Por outro lado, num ensaio realizado por Baidya et al. (2021) com

Chlorella ellipsoidea foi observado que, em termos de comprimento de onda, o que obteve melhores resultados a nível de aumento da densidade celular foi a cor azul e o que apresentou resultados mais baixo foi o vermelho.

6. Conclusão

Em suma, pode ser concluído que a cianobactéria *Nostoc* sp. 136 é capaz de ser produzida mediante diferentes condições de cultivo. Para a decisão das melhores formas de cultivo é preciso ter em atenção qual o objetivo da produção.

O meio FloraNova, a luz vermelha não se mostraram eficientes o suficiente para terem um uso futuro a nível industrial. Porém, o aumento dos nutrientes (azoto, ferro e magnésio), embora não tenha obtido diferenças estatisticamente significativas, em certos parâmetros mostrou-se eficaz no aumento da eficiência na produção de biomassa. Este estudo determinou que o meio Nutribloom, provavelmente ajustando alguns macro e micronutrientes, será perfeitamente adequado para o crescimento de *Nostoc* sp. 136.

De igual forma a junção da luz branca com vermelha mostrou-se eficaz na produção de *Nostoc*. Será necessário ajustar a irradiância para obter melhores resultados.

Com esta cianobactéria futuramente pode ainda ser verificado de que forma estas alterações irão afetar a nível dos constituintes, por exemplo, quantidade de pigmentos, de clorofila e exopolissacáridos, e ainda avaliar se estas alterações, eficazes a uma escala laboratorial, se tornam eficazes quando a mesma é aumentada.

7. Referências

- Abdur Razzak, S., Bahar, K., Islam, K. M. O., Haniffa, A. K., Faruque, M. O., Hossain, S. M. Z., & Hossain, M. M. (2023). Microalgae cultivation in photobioreactors: Sustainable solutions for a greener future. *Green Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.GCE.2023.10.004>
- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2008.03918.X>
- Alavianghavanini, A., Shayesteh, H., Bahri, P. A., Vadiveloo, A., & Moheimani, N. R. (2024). Microalgae cultivation for treating agricultural effluent and producing value-added products. *Science of The Total Environment*, 912, 169369. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.169369>
- Alhaboubi, N. (2021). CO₂ sequestration using a novel Belt Conveyor Reactor with rotating sieve trays compared with Airlift Bubble Column as photobioreactors. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUES.2021.12.007>
- Allaf, M. M., & Peerhossaini, H. (2022). Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. *Microorganisms*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10040696>
- Allouzi, M. M. A., Allouzi, S. M. A., Keng, Z. X., Supramaniam, C. V., Singh, A., & Chong, S. (2022). Liquid biofertilizers as a sustainable solution for agriculture. *Heliyon*, 8(12), e12609. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2022.E12609>
- Alterthum, F. (2020). *Biotechnologia Industrial Vol. 1* (F. Alterthum, Ed.; 2nd ed., Vol. 1). Blucher.
- Álvarez, C., Jimenez-Ríos, L., Iniesta-Pallares, M., Jurado-Flores, A., Molina-Heredia, F. P., Ng, C. K. Y., & Mariscal, V. (2023). Symbiosis between cyanobacteria and plants: from molecular studies to agronomic applications. *Journal of Experimental Botany*, 74(19), 6145–6157. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAD261>
- Araújo, R., Calderón, F. V., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Tasende, M. G., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Monagail, M. Mac, Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., Hossein Hoseinifar, S., Chew, K. W., & Ullmann, J. (2021). Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Athiyappan, K. D., Routray, W., & Paramasivan, B. (2024). Phycocyanin from *Spirulina*: A comprehensive review on cultivation, extraction, purification, and its application in food and allied industries. *Food and Humanity*, 2, 100235. <https://doi.org/10.1016/J.FOOHUM.2024.100235>
- Baidya, A., Akter, T., Islam, M. R., Shah, A. K. M. A., Hossain, M. A., Salam, M. A., & Paul, S. I. (2021). Effect of different wavelengths of LED light on the growth,

- chlorophyll, β -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. *Heliyon*, 7(12), e08525. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E08525>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2023). Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. In L. Barsanti & P. Gualtieri (Eds.), *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* (2nd ed.). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Behrens, P. (2005). Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae. In R. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 189–203). Elsevier. Academic press. Cambridge, Massachusetts, EUA.
- Bekasova, O. (2024). Properties and potential applications of bioconjugates of R-phycoerythrin with Ag⁰ or CdS nanoparticle synthesized in its tunnel cavity: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 255, 128181. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.128181>
- Blackburn, S., & Parker, N. (2005). Microalgal Life Cycles: Encystment and Excystment. In R. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 399–417). Academic press. Cambridge, Massachusetts, EUA.
- Borowitzka, M. (2005). Culturing Microalgae in Outdoor Ponds. In P. Behrens (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 205–217). Elsevier.
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 23–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Carayo, C. C., Culango, K. C., Estrera, D., Largo, D. B., & Dy, D. T. (2005). Correlation of Inorganic Nutrients to the Standing Crop of “Green Tide” Algae During the Peak Growth Season in Eastern Mactan Island, Central Philippines. In *Philipp. Scient* (Vol. 42).
- Carneiro, J., Gomes, S., Freitas, M., Afonso, C., & Mouga, T. (2018). Growth of *Arthrospira platensis* under laboratory and outdoor conditions: assessment of the effects of light and different nutrient media. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/CONF.FMARS.2018.06.00115>
- Carneiro, M., Maia, I. B., Cunha, P., Guerra, I., Magina, T., Santos, T., Schulze, P. S. C., Pereira, H., Malcata, F. X., Navalho, J., Silva, J., Otero, A., & Varela, J. (2022). Effects of LED lighting on *Nannochloropsis oceanica* grown in outdoor raceway ponds. *Algal Research*, 64, 102685. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102685>
- Carreres-Prieto, D., García, J. T., Cerdán-Cartagena, F., & Suardiaz-Muro, J. (2020). Performing Calibration of Transmittance by Single RGB-LED within the Visible Spectrum. *Sensors 2020*, Vol. 20, Page 3492, 20(12), 3492. <https://doi.org/10.3390/S20123492>
- Celis-Plá, P. S. M., Rearte, T. A., Neori, A., Masojídek, J., Bonomi-Barufi, J., Álvarez-Gómez, F., Ranglová, K., Carmo da Silva, J., Abdala, R., Gómez, C., Caporgno, M., Torzillo, G., Silva Benavides, A. M., Ralph, P. J., Fávero Massocato, T., Atzmüller, R., Vega, J., Chávez, P., & Figueroa, F. L. (2021). A new approach for cultivating the cyanobacterium *Nostoc calcicola* (MACC-612) to produce biomass and bioactive compounds using a thin-layer raceway pond. *Algal Research*, 59, 102421. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102421>

- Cherdkiatikul, T., & Suwanwong, Y. (2014). Production of the α and β Subunits of *Spirulina* Allophycocyanin and C-Phycocyanin in *Escherichia coli*: A Comparative Study of Their Antioxidant Activities. *SLAS Discovery*, 19(6), 959–965. <https://doi.org/10.1177/1087057113520565>
- Chhandama, M., Ruatpuia, J., Ao, S., Chetia, A., Satyan, K., & Rokhum, S. (2023). Microalgae as a sustainable feedstock for biodiesel and other production industries: Prospects and challenges. *Energy Nexus*, 12, 100255. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2023.100255>
- Chhandama, M. V. L., Ruatpuia, J. V. L., Ao, S., Chetia, A. C., Satyan, K. B., & Rokhum, S. L. (2023). Microalgae as a sustainable feedstock for biodiesel and other production industries: Prospects and challenges. *Energy Nexus*, 12, 100255. <https://doi.org/10.1016/J.NEXUS.2023.100255>
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126–131. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2007.12.002>
- Correa, I., Drews, P., Botelho, S., De Souza, M. S., & Tavano, V. M. (2017). Deep learning for microalgae classification. *Proceedings - 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications, ICMLA 2017, 2017-December*, 20–25. <https://doi.org/10.1109/ICMLA.2017.0-183>
- Davidson, M. W. (2023). *Fundamentals of Light-Emitting Diodes (LEDs)*. ZEISS Microscopy Online Campus | Light-Emitting Diodes.
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.08.001>
- Delrue, F., Alaux, E., Moudjaoui, L., Gaignard, C., Fleury, G., Perilhou, A., Richaud, P., Petitjean, M., & Sassi, J. F. (2017). Optimization of *Arthrospira platensis* (Spirulina) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. *Fermentation 2017, Vol. 3, Page 59*, 3(4), 59. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION3040059>
- Devi, T. E., & Parthiban, R. (2020). Hydrothermal liquefaction of *Nostoc ellipsosporum* biomass grown in municipal wastewater under optimized conditions for bio-oil production. *Bioresource Technology*, 316, 123943. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123943>
- Diao, Y., & Yang, Z. (2014). Evaluation of morphological variation and biomass growth of *Nostoc commune* under laboratory conditions. *Journal of Environmental Biology*, 35(3), 485-9. PMID: 24813003
- Duan, Y., & Shi, F. (2014). Bioreactor design for algal growth as a sustainable energy source. *Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology*, 27–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59566-9.00002-8>
- El Shafay, S. M., Gaber, A., Alsanie, W. F., & Elshobary, M. E. (2021). Influence of Nutrient Manipulation on Growth and Biochemical Constituent in *Anabaena variabilis* and *Nostoc muscorum* to Enhance Biodiesel Production. *Sustainability 2021, Vol. 13, Page 9081*, 13(16), 9081. <https://doi.org/10.3390/SU13169081>

- El-Bestawy, E. A., El-Salam, A. Z. A., & Mansy, A. E. R. H. (2007). Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(3), 180–192. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2006.12.005>
- El-fayoumy, E. A., Shanab, S. M., Hassan, O. M. A., & Shalaby, E. A. (2023). Enhancement of active ingredients and biological activities of *Nostoc linckia* biomass cultivated under modified BG-110 medium composition. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(7), 6049–6066. <https://doi.org/10.1007/S13399-021-01509-7/TABLES/7>
- Esakkimuthu, S., Siddiqui, S. A., Cherif, M., & Saadaoui, I. (2024). Exploring strategies to enhance microalgae nutritional quality for functional poultry-sourced food products. *Bioresource Technology Reports*, 25, 101746. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2023.101746>
- Fal, S., Smouni, A., & Arroussi, H. El. (2023). Integrated microalgae-based biorefinery for wastewater treatment, industrial CO₂ sequestration and microalgal biomass valorization: A circular bioeconomy approach. *Environmental Advances*, 12, 100365. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2023.100365>
- Ferreira de Oliveira, A. P., & Bragotto, A. P. A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, 6, 100157. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2022.100157>
- Flores, E., Picossi, S., Valladares, A., & Herrero, A. (2019). Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(7), 673–684. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2018.04.006>
- Franco-Morgado, M., Amador-Espejo, G. G., Pérez-Cortés, M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2023). Microalgae and cyanobacteria polysaccharides: Important link for nutrient recycling and revalorization of agro-industrial wastewater. *Applied Food Research*, 3(1), 100296. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2023.100296>
- Gao, X., Liu, X., Jing, X., & Lindblad, P. (2022). Anchoring the ethylene-forming enzyme to photosystem-related proteins to improve ethylene production in engineered *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101178. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2022.101178>
- Ge, B., Qin, S., Han, L., Lin, F., & Ren, Y. (2006). Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(3), 175–180. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2006.02.008>
- Golmakani, M. T., Kiani, F., Hajjari, M. M., Sharif, N., Fazaeli, M., & Hosseini, S. M. H. (2023). Electrospun zein incorporating phycocyanin and *Spirulina* extract: Fabrication, characterization, and potential application. *LWT*, 188, 115408. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115408>

- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2023). *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication. Consultado em 6 mar. 2023. Disponível em https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=42976
- Han, P. P., Sun, Y., Jia, S. R., Zhong, C., & Tan, Z. L. (2014). Effects of light wavelengths on extracellular and capsular polysaccharide production by *Nostoc flagelliforme*. *Carbohydrate Polymers*, *105*(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.01.061>
- Hori, K., Okamoto, J., Tanji, Y., & Unno, H. (2003). Formation, sedimentation and germination properties of *Anabaena* akinetes. *Biochemical Engineering Journal*, *14*(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00136-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00136-5)
- Hosseini, H., Saadaoui, I., Cherif, M., Amir Siddiqui, S., & Sayadi, S. (2024). Exploring the dynamics of algae-associated microbiome during the scale-up process of *Tetraselmis* sp. microalgae: A metagenomics approach. *Bioresource Technology*, *393*, 129991. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2023.129991>
- Hou, C., Zhao, J., Huang, B., Zhou, X., & Zhang, Y. (2024). Microalgae-based technologies for carbon neutralization and pollutant remediation: A comprehensive and systematic review. *Resources, Conservation and Recycling*, *202*, 107323. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2023.107323>
- Howe, C., Becker, D., Steinweg, C., Posten, C., & Stensjö, K. (2020). Iron limitation – A perspective on a growth-restricted cultivation strategy for a H₂ production system using the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120 ΔhupW. *Bioresource Technology Reports*, *11*, 100508. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2020.100508>
- Huang, C., Luo, Y., Zeng, G., Zhang, P., Peng, R., Jiang, X., & Jiang, M. (2022). Effect of adding microalgae to whiteleg shrimp culture on water quality, shrimp development and yield. *Aquaculture Reports*, *22*, 100916. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2021.100916>
- Huesemann, M., Crowe, B., Waller, P., Chavis, A., Hobbs, S., Edmundson, S., & Wigmosta, M. (2016). A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. *Algal Research*, *13*, 195–206. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.11.008>
- Itoh, K., Taguchi, S., Yoshida, N., Yamamoto, T., & Maeda, K. (2022). Enhanced triacylglycerol accumulation in open cultivation of microalgae using an air self-sufficient aerator. *Bioresource Technology Reports*, *17*, 100916. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100916>
- Jaghdani, S. J., Jahns, P., & Tränkner, M. (2021). The impact of magnesium deficiency on photosynthesis and photoprotection in *Spinacia oleracea*. *Plant Stress*, *2*, 100040. <https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2021.100040>
- Jiao, H., Tsigkou, K., Elsamahy, T., Pispas, K., Sun, J., Manthos, G., Schagerl, M., Sventzouri, E., Al-Tohamy, R., Kornaros, M., & Ali, S. S. (2024). Recent advances in sustainable hydrogen production from microalgae: Mechanisms, challenges, and future perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *270*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115908>

- Juijuljerm, R., Vanijajiva, O., & Chittapun, S. (2021). The potential of using akinetes as seed starters for *Cladophora glomerata* cultivation: Germination and growth of akinetes under different light intensities and humic concentrations. *Algal Research*, 60, 102478. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102478>
- Karpulevich, A. A., Maksimov, E. G., Sluchanko, N. N., Vasiliev, A. N., & Paschenko, V. Z. (2016). Highly efficient energy transfer from quantum dot to allophycocyanin in hybrid structures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 160, 96–101. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.03.048>
- Katsuda, T., Shiraishi, H., Ishizu, N., Ranjbar, R., & Katoh, S. (2008). Effect of light intensity and frequency of flashing light from blue light emitting diodes on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(3), 216–220. <https://doi.org/10.1263/JBB.105.216>
- Kawachi, M., & Noel, M.-H. (2005). Sterilization and Sterile Technique. In R. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 65–81). Academic press. Cambridge, Massachusetts, EUA.
- Khanh, N. Van, Diem, N. T., Nhan, L. T. T., Cu, P. Van, Van, T. Q. K., & Hoan, N. T. (2017). The Effects of Nutritional Media and Initial Cell Density on the Growth and Development of *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 7(10). <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2017.10.008S>
- Khanra, A., Vasistha, S., Rai, M. P., Cheah, W. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Chuah, L. F., & Show, P. L. (2022). Green bioprocessing and applications of microalgae-derived biopolymers as a renewable feedstock: Circular bioeconomy approach. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102872. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2022.102872>
- Kholssi, R., Lougraimzi, H., & Moreno-Garrido, I. (2023). Influence of salinity and temperature on the growth, productivity, photosynthetic activity and intracellular ROS of two marine microalgae and cyanobacteria. *Marine Environmental Research*, 186, 105932. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2023.105932>
- Kholssi, R., Stefanova, S., González-Ortegón, E., Araújo, C. V. M., & Moreno-Garrido, I. (2024). Population and functional changes in a multispecies co-culture of marine microalgae and cyanobacteria under a combination of different salinity and temperature levels. *Marine Environmental Research*, 193, 106279. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2023.106279>
- Kilonzo, P. M., Margaritis, A., & Bergougnou, M. A. (2010). Hydrodynamic characteristics in an inverse internal-loop airlift-driven fibrous-bed bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 65(2), 692–707. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2009.09.023>
- Komárek, J. (2013). *Cyanoprokaryota-3. Teil/Part 3: Heterocyst us Genera: Vol. 19/3* (B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, & M. Schagerl, Eds.). Springer Nature, Berlin, Germany, 1-1130.
- Komárek, J., & Johansen, J. R. (2015). Filamentous Cyanobacteria. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*, 135–235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9>

- Kujawska, N., Talbierz, S., Dębowski, M., Kazimierowicz, J. & Zieliński, M. Optimizing Docosaehaenoic Acid (DHA) Production by *Schizochytrium* sp. Grown on Waste Glycerol. *Energies* 2021, 14, 1685. <https://doi.org/10.3390/en14061685>
- Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C. C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 258–278. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2008.00134.X>
- Latimer, G. W. , Jr. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (G. W., Jr. Latimer, Ed.; 20th ed., Vol. 2). Association of Official Analytical Chemists.
- Lawrence, J. (2005). Viral Contamination of Algal Cultures. In R. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 365–388). Academic press. Cambridge, Massachusetts, EUA.
- Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2023). Lutein biosynthesis from microalgae — Recent advances and circular economy. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103097. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2023.103097>
- Li, Y., & Gao, K. (2004). Photosynthetic physiology and growth as a function of colony size in the cyanobacterium *Nostoc sphaeroides*. *European Journal of Phycology*, 39(1), 9–15. <https://doi.org/10.1080/0967026032000157147>
- Lima, S., Schulze, P. S. C., Schüler, L. M., Rautenberger, R., Morales-Sánchez, D., Santos, T. F., Pereira, H., Varela, J. C. S., Scargiali, F., Wijffels, R. H., & Kiron, V. (2021). Flashing light emitting diodes (LEDs) induce proteins, polyunsaturated fatty acids and pigments in three microalgae. *Journal of Biotechnology*, 325, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.019>
- Lin, Z., Fan, D., Ma, S., Miao, W., & Wang, X. (2022). Relative growth rate for trees at the growth stage is coordinated with leaf bulk modulus of elasticity and osmotic potential in a subtropical forest of China. *Ecological Indicators*, 141, 109135. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2022.109135>
- Lu, J., Zhu, B., Struewing, I., Xu, N., & Duan, S. (2019). Nitrogen–phosphorus-associated metabolic activities during the development of a cyanobacterial bloom revealed by metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38481-2>
- Luo, H. P., & Al-Dahhan, M. H. (2008). Local characteristics of hydrodynamics in draft tube airlift bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 63(11), 3057–3068. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2008.03.015>
- MacIntyre, H., & Cullen, J. (2005). Using Cultures to Investigate the Physiological Ecology of Microalgae. In R. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 287–326). Academic press. Cambridge, Massachusetts, EUA.
- Massart, A., Mirisola, A., Lupant, D., Thomas, D., & Hantson, A. L. (2014). Experimental characterization and numerical simulation of the hydrodynamics in an airlift photobioreactor for microalgae cultures. *Algal Research*, 6(PB), 210–217. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2014.07.003>

- Mendes, C. F., dos Santos Severiano, J., Moura, G. C. de, dos Santos Silva, R. D., Monteiro, F. M., & Barbosa, J. E. de L. (2022). The reduction in water volume favors filamentous cyanobacteria and heterocyst production in semiarid tropical reservoirs without the influence of the N:P ratio. *Science of The Total Environment*, 816, 151584. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151584>
- Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17(5–6), 477–489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779/METRICS>
- Montagnes, D. J. S., & Franklin, D. J. (2001). Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnology and Oceanography*, 46(8), 2008–2018. <https://doi.org/10.4319/LO.2001.46.8.2008>
- Mostafa, S. S. M., Shalaby, E. A., & Mahmoud, G. I. (2012). Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(1), 56–65. <https://doi.org/10.15835/NSB417298>
- Mouga, T., Simões, F., Moreira, V., Ramos, R., Ferreira, C. A., Martins, A., Freitas, M. V., & Afonso, C. (2023). Producing Cyanobacteria to use as biostimulants. In P. S. Duque de Brito (Ed.), *Proceedings of the 2nd International Conference on Water Energy Food and Sustainability (ICoWEFS 2022)* (pp. 26–35). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-031-26849-6_4
- Muthu, B., Kamalanathan, A., Janarthanan, S., & Kalaiyarasu, T. (2020). Effect of pH on *Arthrospira platensis* Production. *Alochana Chakra Journal*, 2297–2305. https://www.researchgate.net/publication/341312500_EFFECT_OF_pH_ON_ART_HROSPIRA_PLATENSIS_PRODUCTION
- Nguyen, D. K., Nguyen, Q., Dang, T. T., Nguyen, Q., & Nguyen, L. (2022). A low-cost system for monitoring pH, dissolved oxygen and algal density in continuous culture of microalgae Specifications table. *HardwareX*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00353>
- Nishshanka, G. K. S. H., Anthonio, R. A. D. P., Nimarshana, P. H. V., Ariyadasa, T. U., & Chang, J. S. (2022). Marine microalgae as sustainable feedstock for multi-product biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108593. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108593>
- Ortiz-Moreno, Solarte-Murillo, M. L. , Sandoval-Parra, L. V. & Karen X. (2020). Analysis of Nostoc muscorum biomass production in a hydroponic system ORINOQUIA. *Orinoquia*, 24(1), 23–31. <https://doi.org/10.22579/20112629.599>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244(Pt 2), 1216–1226. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.05.058>
- Park, C. H., Park, M. H., Kim, K. H., Park, J. H., Kwon, D. R., Kim, N. Y., Lim, B. J., & Hwang, S. J. (2018). Akinete germination chamber: An experimental device for

- cyanobacterial akinete germination and plankton emergence. *Harmful Algae*, 72, 74–81. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2018.01.004>
- Patarra, R. F., Carreiro, A. S., Lloveras, A. A., Abreu, M. H., Buschmann, A. H., & Neto, A. I. (2017). Effects of light, temperature and stocking density on *Halopteris scoparia* growth. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 405–411. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0933-1>
- Patelou, M., Infante, C., Dardelle, F., Randewig, D., Kouri, E. D., Udvardi, M. K., Tsiplakou, E., Mantecón, L., & Fletmetakis, E. (2020). Transcriptomic and metabolomic adaptation of *Nannochloropsis gaditana* grown under different light regimes. *Algal Research*, 45, 101735. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101735>
- Pathak, J., Rajneesh, Maurya, P. K., Singh, S. P., Häder, D.-P., & Sinha, R. P. (2018). Cyanobacterial Farming for Environment Friendly Sustainable Agriculture Practices: Innovations and Perspectives. *Frontiers in Environmental Science*, 6(7). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00007>
- Patwari, P., Pruckner, F., & Fabris, M. (2023). Research review paper Biosensors in microalgae: A roadmap for new opportunities in synthetic biology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 68, 108221. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108221>
- Pereira, I., Ortega, R., Barrientos, L., Moya, M., Reyes, G., & Kramm, V. (2009). Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 135–144. <https://doi.org/10.1007/S10811-008-9342-4>
- Pham, H. M., Kwak, H. S., Hong, M. E., Lee, J., Chang, W. S., & Sim, S. J. (2017). Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 239, 211–218. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.05.030>
- Phytobloom. (2024). *Nutribloom*. Consultado em 26 fev. 2024. Disponível em <https://phytobloom.com/nutribloom/>
- Pokharel, R., Gerrits, R., Schuessler, J. A., Frings, P. J., Sobotka, R., Gorbushina, A. A., & Von Blanckenburg, F. (2018). Magnesium Stable Isotope Fractionation on a Cellular Level Explored by Cyanobacteria and Black Fungi with Implications for Higher Plants. *Environmental Science & Technology*, 52(21), 12216–12224. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B02238>
- Pommerening, A., Trincado, G., Salas-Eljatib, C., & Burkhart, H. (2023). Understanding and modelling the dynamics of data point clouds of relative growth rate and plant size. *Forest Ecology and Management*, 529, 120652. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2022.120652>
- Prasanna, R., Sharma, E., Sharma, P., Kumar, A., Kumar, R., Gupta, V., Pal, R. K., Shivay, Y. S., & Nain, L. (2013). Soil fertility and establishment potential of inoculated cyanobacteria in rice crop grown under non-flooded conditions. *Paddy*

and Water Environment, 11(1–4), 175–183. <https://doi.org/10.1007/S10333-011-0302-2>

- Preising, H., & Andersen, R. (2005). Historical Review of Algal Culturing Techniques. In R. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 1–12). Academic press. Cambridge, Massachusetts, EUA.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. In *Journal of Applied Phycology* 26 (3), 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>
- Promdaen, S., Wattuya, P., & Sanevas, N. (2014). Automated Microalgae Image Classification. *Procedia Computer Science*, 29, 1981–1992. <https://doi.org/10.1016/J.PROCS.2014.05.182>
- Protasova, E. A., Antal, T. K., Zlenko, D. V, Elanskaya, I. V, Lukashev, E. P., Friedrich, T., Mironov, K. S., Sluchanko, N. N., Ge, B., Qin, S., & Maksimov, E. G. (2021). State of the phycobilisome determines effective absorption cross-section of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1862(12). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148494>
- Rajasekaran, C., Ajeesh, C. P. M., Balaji, S., Shalini, M., Siva, R., Das, R., Fulzele, D. P., & Kalaivani, T. (2015). Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different *Spirulina* Strains. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 13(1), 67–75. <https://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/1416>
- Reimann, R., Zeng, B., Jakopec, M., Burdukiewicz, M., Petrick, I., Schierack, P., & Rödiger, S. (2020). Classification of dead and living microalgae *Chlorella vulgaris* by bioimage informatics and machine learning. *Algal Research*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101908>
- Rhie, G.-E., & Beales, S. I. (1994). Regulation of Heme Oxygenase Activity in *Cyanidium caldarium* by Light, Glucose, and Phycobilin Precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9620–9626.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., & Stanier, R. (1979, March 1). *BG-11 Medium (modified by J.Acreman)*. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. <https://uwaterloo.ca/canadian-physiological-culture-centre/cultures/culture-media/bg-11>
- Rusten, B., Eikebrokk, B., Ulgenes, Y., & Lygren, E. (2006). Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 322–331. <https://doi.org/10.1016/J.AQUAENG.2005.04.002>
- Sadvakasova, A. K., Kossalbayev, B. D., Token, A. I., Bauenova, M. O., Wang, J., Zayadan, B. K., Balouch, H., Alwasel, S., Leong, Y. K., Chang, J. S., & Allakhverdiev, S. I. (2022). Influence of Mo and Fe on Photosynthetic and Nitrogenase Activities of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria under Nitrogen Starvation. *Cells* 2022, 11(5), 904. <https://doi.org/10.3390/CELLS11050904>
- Sand-Jensen, K. (2014). Ecophysiology of gelatinous *Nostoc* colonies: unprecedented slow growth and survival in resource-poor and harsh environments. *Annals of Botany*, 114(1), 17–33. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu085>

- Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Optoelectronics-Devices Technol*, 260(5108), 640–646. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.640>
- Sen, N. (1990). Comparison of Growth of Micro-Algae *Nostoc linckia* & *Chlorella* sp. in Dilute Culture. *Current Research in Photosynthesis*, 3721–3724. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0511-5_840
- Shiong Khoo, K., Ahmad, I., Chew, K. W., Iwamoto, K., Bhatnagar, A., & Loke Show, P. (2023). Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 96, 101071. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2023.101071>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2013). Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*, 51, 59–72. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2012.10.007>
- Sudhakar, M. P., Dharani, G., & Paramasivam, A. (2023). Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potential of R-phycoerythrin extracted from *Gracilaria corticata* seaweed. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 6, 100352. <https://doi.org/10.1016/J.CRGSC.2022.100352>
- Suphan, S., Limrujiwat, K., Kula, K., Maneeruttanarungroj, C., Raksajit, W., & Khetkorn, W. (2023). Characterization and exploration of biological properties of phycobiliproteins purified from Thai karstic cave cyanobacterium *Nostoc* sp. SW02. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 52, 102826. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2023.102826>
- Surilayani, D., Chaiyanate, N., & Suriyaphan, O. (2011). The Effect of Magnesium Concentration on Protein and Chlorophyll a Content of *Nostoc* spp. Reared in Two Cultured Media. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*, 1(1). <https://doi.org/10.33512/JPK.V111.844>
- Touloupakis, E., Zittelli, G. C., Benavides, A. M. S., & Torzillo, G. (2023). Growth and photosynthetic performance of *Nostoc linckia* (formerly *N. calcicola*) cells grown in BG11 and BG110 media. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 22(4), 795–807. <https://doi.org/10.1007/S43630-022-00353-6/FIGURES/8>
- Urbicult. (2024). *FloraNova Grow | Nutrientes Minerais*. Consultado em 26 fev. 2024. Disponível em <https://www.urbicult.pt/nutrientes-minerais/261-novamax-grow-ex-floranova-05l-1l-e-5l.html>
- Urniezius, R., Masaitis, D., Levisauskas, D., Survyla, A., Babilius, P., & Godoladze, D. (2023). Adaptive control of the *E. coli*-specific growth rate in fed-batch cultivation based on oxygen uptake rate. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 5785–5795. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2023.11.033>
- Volgusheva, A., Kosourov, S., Lynch, F., & Allahverdiyeva, Y. (2019). Immobilized heterocysts as microbial factories for sustainable nitrogen fixation. *Journal of Biotechnology*, 306, 100016. <https://doi.org/10.1016/J.BTECX.2020.100016>

- Walther, J., Erdmann, N., Stoffel, M., Wastian, K., Schwarz, A., Strieth, D., Muffler, K., & Ulber, R. (2022). Passively immobilized cyanobacteria *Nostoc* species BB 92.2 in a moving bed photobioreactor (MBPBR): Design, cultivation, and characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(6), 1467–1482. <https://doi.org/10.1002/BIT.28072>
- Wilson, A., Muzzopappa, F., & Kirilovsky, D. (2022). Elucidation of the essential amino acids involved in the binding of the cyanobacterial Orange Carotenoid Protein to the phycobilisome. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1863(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148504>
- Wishkerman, A., & Wishkerman, E. (2017). Application note: A novel low-cost open-source LED system for microalgae cultivation. *Computers and Electronics in Agriculture*, 132, 56–62. <https://doi.org/10.1016/J.COMPAG.2016.11.015>
- Wood, A. M., Everroad, R. C., & Wingard, L. M. (2005). Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. In Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 269–285). Academic press, USA.
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., & Ambati, R. R. (2021). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 393, 10(2), 393. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020393>
- Yin, Z., Zou, J., Wang, M., Huang, R., Qian, Y., Zeng, M., & Li, F. (2024). A new strategy for maintaining the thermal stability of phycocyanin under acidic conditions: pH-induced whey protein isolate-phycocyanin coprecipitation forms composite with chitosan. *Food Hydrocolloids*, 148, 109468. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2023.109468>
- Yu, H., Jia, S., & Dai, Y. (2009). Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 127–133. <https://doi.org/10.1007/S10811-008-9341-5>
- Zarei, Z., Malekshahi, P., Morowvat, M. H., & Trzcinski, A. P. (2023). A review of bioreactor configurations for hydrogen production by cyanobacteria and microalgae. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2023.09.108>
- Zavřel, T., Schoffman, H., Lukeš, M., Fedorko, J., Keren, N., & Červený, J. (2021). Monitoring fitness and productivity in cyanobacteria batch cultures. *Algal Research*, 56, 102328. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102328>
- Zhang, Z., Xu, M., Fan, Y., Zhang, L., & Wang, H. (2023). Using microalgae to reduce the use of conventional fertilizers in hydroponics and soil-based cultivation. *Science of The Total Environment*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169424>
- Zhao, Y., Wang, Z., Chen, M., Huang, X., & Luo, Z. (2023). Effects of nitrogen to phosphorus ratios on algal growth and arsenate metabolism by *Microcystis aeruginosa* with dissolved organic phosphorus and nitrate as nutrients. *Algal Research*, 69, 102922. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102922>

- Zhu, C. J., & Lee, Y. K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 9). Kluwer Academic Publishers.
- Zsalsabil, N. A. N., Risjani, Y., Firdaus, M., & Karimah, K. (2023). Growth of *Arthrospira platensis* with Different Nitrogen Sources. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 9(3), 1523–1529. <https://doi.org/10.29303/JPPIPA.V9I3.2754>
- Zuccolotto-Arellano, J., & Cuervo-González, R. (2020). Binary fission in *Trichoplax* is orthogonal to the subsequent division plane. *Mechanisms of Development*, 162, 103608. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2020.103608>

8. Anexos

BG11 Modificado			
1. Preparação dos stocks			
Nº de stock	Solução	Massa (g) (Para 0,2L)	Massa (g) (Para 0,5L)
1 (Não Autoclavar)	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,3	3,25
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,72	1,8
2	K ₂ .HPO ₄ .3H ₂ O	0,80	2
	EDTA (K ₂ ,Mg)	0,02	0,05
3	Ácido cítrico	0,12	0,3
	Ammonium Ferric Citrate Green	0,12	0,3
4	H ₃ .PO ₃	0,572	1,430
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,362	0,905
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,044	0,110
	Na ₂ .MoO ₄ .2H ₂ O	0,078	0,195
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,004	0,010
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,01	0,025

Os stocks são preparados com água Mili Q.

Autoclavar os stocks 2, 3 e 4 durante 20 minutos a 121°C.

2. Preparação do meio BG11 modificado	
Nº do stock	Volume (mL) por 1L
	Adicionar 1,5g de NaNO ₃
1	10
2	10
3	10
4	10
	Adicionar 1,19g de HEPES

Ajustar o pH para 7,3 com a adição de NaOH 1M.

Autoclavar durante 20 minutos a 121°C.

Anexo 1- Composição do meio BG11 Modificado, de acordo com o fabricante.

Nutribloom Plus	
NaNO₃	2M
KH₂PO₄	100mM
ZnCl₂	1mM
ZnSO₄	1mM
MnCl₂*2H₂O	1mM
Na₂MoO₄*2H₂O	0,1mM

CoCl₂*6H₂O	0,1mM
CuSO₄*5H₂O	0,1mM
EDTA	26,4mM
MgSO₄*7H₂O	2mM
FeCl₃*6H₂O	20mM
Tiamina	35mg/L
Biotina	5mg/L
B₁₂	3mg/L
Colocar 1-2mL por litro na culturas de microalga.	

Anexo 2- Composição do meio Nutribloom, de acordo com o fabricante.

FloraNova Grow	
Total nitrogen (N)	7,0%
0,9% Ammoniacal Nitrogen	
6,1% Nitrate Nitrogen	
Availabe Phosphate (P₂O₅)	4,0%
Soluble Potash (H₂O)	10,0%
Calcium (Ca)	4,0%
Magnesium (Mg)	1,5%
1,5% Wtaer Soluble Magnesium (Mg)	
Sulfur (S)	2,0%
2,0% Combined Sulfur (S)	
Boron (B)	0,01%
Chlorine (Cl)	0,01%
Cobalt (Co)	0,002%
Copper (Cu)	0,01%
0,01% Chelated Copper (Cu)	
Iron (Fe)	0,1%
0,1% Chelated Iron (Fe)	
Manganese (Mn)	0,03%
0,03% Chelated Maganese (Mn)	
Molybdenum (Mo)	0,003%
Zinc (Zn)	0,02%
0,02% Chelated Zinc (Zn)	
Colocar 0,625-3,75 mL por litro, dependendo da aplicação	

Anexo 3- Composição do meio FloraNova, de acordo com o fabricante.