UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

CULTIVO DO DINOFLAGELADO *Symbiodinium glynnii* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Deyvid Willame Silva Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez
Orientador

Recife,
Fevereiro / 2022

Espaço reservado à adição da ficha catalográfica.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

CULTIVO DO DINOFLAGELADO *Symbiodinium glynnii* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Deyvid Willame Silva Oliveira

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 18/02/2022 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez
Orientador
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.ª Dr.ª Jéssika Lima de Abreu
Membro Titular Externo
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira dos Santos
Membro Titular Interno
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho ao Universo,
que com sua energia em constante movimento
permitiu a formação destes nossos vastos oceanos,
berço de toda vida existente e lar de organismos fascinantes.

Agradecimentos

Inicialmente, à Universidade Federal Rural de Pernambuco por me oferecer uma formação de excelente qualidade e totalmente gratuita, que acolhe nossas pesquisas em sua infraestrutura, repleta de excelentes profissionais em todos seus setores. Dentro desta, agradeço especialmente ao Departamento de Pesca e Aquicultura, assim como seus professores, técnicos e terceirizados, pelo convívio e troca de experiências.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, por todo o acolhimento e atenção durante o curso desenvolvido, em especial a nossa secretaria Ana Macêdo e ao nosso atual coordenador Paulo Roberto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo importante incentivo financeiro, por meio da concessão da bolsa de mestrado. Bolsa esta essencial para auxiliar na permanência de tantos jovens – como eu – no árduo trabalho que é o desenvolvimento científico e tecnológico do nosso país.

Quero agradecer também aqueles que considero minha segunda família, meus amigos do Laboratório de Produção de Alimento Vivo – Depaq / UFRPE, como Elizabeth Santos, Yure Oliveira, Laenne Moraes, Rildo Andrade, Barbara Brandão, Clarissa Vilela, Géssica Cavalcanti, Bruno Borba e às professoras Drª. Jéssika Lima e Drª Danielli Matias. Estes são a minha família acadêmica, a qual atribuo grandes aprendizados, direcionamentos e conselhos. Assim como, a todos os estagiários que se fizeram presentes no desenvolvimento de atividades relacionadas a este trabalho.

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Alfredo Olivera Gálvez, que durante todo este caminho me ajudou a manter o foco e alcançar as metas – mesmo com a ocorrência de uma histórica pandemia -, assim como todo o tempo investido em meu desenvolvimento acadêmico.

Agradeço aos meus pais, Genival Oliveira e Maria de Fátima, por todo apoio incondicional integralmente investido em meu desenvolvimento educacional, desde os primórdios de minha existência. Também deixo registrado meu apreço pelo apoio de Ana Santos, sempre que me foi necessário.

Agradeço também ao Laboratório de Análise de Isótopos Estáveis e Esclerocronologia de Tubarões e Raias (Dimar/Depaq/UFRPE), Laboratório de Carcinicultura (Lacar/Depaq/UFRPE) e ao Laboratório de Nutrição Animal (LNA/DZ/ UFRPE) pela concessão de equipamentos e infraestrutura que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

As microalgas possuem grande importância ao funcionamento dos ecossistemas aquáticos, são organismos predominantemente unicelulares e possuem pigmentos fotossintetizantes. Por ser um grupo cosmopolita, está presente em diversos ecossistemas, onde nestes, presta diversos serviços ecossistêmicos, desde a manutenção da base da teia trófica até a ciclagem de nutrientes do meio. Permitem aplicações na aquicultura, desde a nutrição de organismos jovens das espécies de interesse comercial a biorremediação dos efluentes produzidos. Seu cultivo também permite a obtenção de importantes biomoléculas de uso nutricional, farmacológico e bioquímico, assim como de lipídios para a produção de biodiesel. Dentre os diferentes grupos de microalgas, os dinoflagelados se destacam por sua expressiva produção de biomoléculas, entretanto estes apresentam dificuldades de cultivo relacionadas a falta de informações detalhadas sobre suas informações de crescimento e de nutrição. Assim, a falta de informações sobre a influência das principais variáveis de cultivo (*i.e.*, luz, concentração de nutrientes, tensões de cisalhamento etc.), dificultam a produção de biomassa deste promissor grupo de microalgas. A presente dissertação tem como objetivo avaliar o desempenho de crescimento e a composição bioquímica, com ênfase no teor de proteínas, do dinoflagelado *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes proporções nitrogênio:fósforo. Foram utilizados quatro tratamentos ZN (0:1), MN (7:1), NN (14:1) e DN (28:1), obtidos por meio da modificação da $NaNO_3$ do meio f/2. Sendo realizados dois cultivos sucessivos em triplicata. Os cultivos foram conduzidos em erlenmeyers de 250mL, aos quais foram adicionados água do mar natural (30 UPS) e vitaminas do complexo B. Foram inoculadas células de *S. glynnii* a uma concentração inicial de 5 x 10^4 cél. mL^{-1}. As culturas foram mantidas em 22 ± 1 °C, sob aeração constante, irradiância de 300 μmol fótons m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo integral. O crescimento foi acompanhado por meio de hematocitômetro de Neubauer (72h), sendo calculadas as variáveis DCM, K, μ e TD. Um fotocolorímetro foi utilizado para obtenção de informações semanais de N e P. Um terceiro subcultivo foi executado para obtenção da produção e produtividade em biomassa seca, sendo submetido ao término a centrifugação, liofilização e pesagem. A biomassa seca foi submetida a determinação do conteúdo proteico e teor de lipídios brutos pelos métodos micro Kjeldahl e AOCS Am 5-04, respectivamente. ZN não apresentou incremento celular no segundo subcultivo. *S. glynnii* apresentou maior DCM quando cultivado em MN (87,17 ± 8,46 x 10^4 cél. mL^{-1}), sendo este estatisticamente diferente dos tratamentos DN e NN. Maior K foi verificado no tratamento DN (0,19 ± 0,02 div. dia^{-1}). Para μ não houveram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Menor TD no tratamento DN (5,26 ± 0,38 dias). Maior rendimento em biomassa seca encontrado no tratamento DN com 753,33 ± 14,14 mg L^{-1}, assim como produtividade diária (31,39 ± 0,59 mg L^{-1} dia^{-1}). As curvas de crescimento observadas apresentaram crescimento consistente, assim como o consumo N:P apresentou um consumo estável nos tratamentos MN, NN e DN. As melhores variáveis de crescimento foram obtidas quando utilizadas maiores concentrações de N na relação N:P (DN - 28:1), atrelada a maiores rendimentos em biomassa e proteínas (31,51 ± 0,15 %). São recomendados para o cultivo do *Symbiodinium glynnii* concentrações de N nas proporções N:P entre 14:1 (NN) e 28:1 (DN). Mais estudos são necessários para entender os mecanismos que regulam o metabolismo destes dinoflagelados.

Palavras-chave: Microalga. Crescimento. Nitrogênio.

Abstract

Microalgae are organisms that are predominantly unicellular and have photosynthesizing pigments. Being a cosmopolitan group, they are present in various ecosystems, where they provide various ecosystem services, from the maintenance of the base of the trophic web to the cycling of nutrients in the environment. They allow applications in aquaculture, from the nutrition of young organisms of commercial interest species to the bioremediation of effluents produced. Their cultivation also allows obtaining important biomolecules of nutritional, pharmacological and biochemical use, as well as lipids for the production of biodiesel. Among the different groups of microalgae, the dinoflagellates stand out for their expressive production of biomolecules. But they present cultivation difficulties related to the lack of detailed information about their growth and nutrition. Thus, the lack of information about the influence of the main cultivation variables (i.e., light, nutrient concentration, shear stress, etc.), hinders the biomass production of this promising group of microalgae. The present dissertation aims to test the growth performance and biochemical composition, with emphasis on protein content, of the dinoflagellate *Symbiodinium glynnii* grown at different nitrogen:phosphorus ratios. Four treatments: ZN (0:1), MN (7:1), NN (14:1) and DN (28:1) were used, obtained by modification of the $NaNO_3$ of the f/2 medium. Two successive cultures were performed in triplicate. The cultures were conducted in 250mL erlenmeyers, to which natural sea water (30 PSU) and B-complex vitamins were added. *S. glynnii* cells were inoculated at an initial concentration of 5×10^4 cells mL^{-1}. Cultures were maintained at 22 ± 1 °C, under constant aeration, irradiance of 300 μmol photons m^{-2} s^{-1} and integral photoperiod. Growth was monitored using a Neubauer haematocytometer (72h), and the variables DCM, K, μ and TD were calculated. A photocolorimeter was used to get weekly information of N and P. A third subculture was performed to get the production and productivity in dry biomass, being submitted at the end to centrifugation, lyophilization and weighing. The dry biomass was submitted to determination of the protein content and crude fat content by micro Kjeldahl and AOCS Am 5-04 methods, correspondingly. ZN did not present cellular increment in the second subcultivation. *S. glynnii* presented higher DCM when cultivated in MN ($87.17 \pm 8.46 \times 10^4$ cél. mL^{-1}), being this statistically different from treatments DN and NN. Greater K was verified in the DN treatment (0.19 ± 0.02 div. day^{-1}). For μ there were no significant differences among treatments ($p > 0.05$). Lower TD in DN treatment (5.26 ± 0.38 days). Higher dry biomass yield found in DN treatment with 753.33 ± 14.14 mg L^{-1}, as well as daily productivity (31.39 ± 0.59 mg L^{-1} day^{-1}). The observed growth curves showed consistent growth, as well as the N:P consumption showed stable consumption in MN, NN and DN treatments. The best growth variables were obtained when higher concentrations of N in N:P ratio were used (DN - 28:1), coupled with higher biomass and protein yields (31.51 ± 0.15 %). N concentrations in N:P ratios between 14:1 (NN) and 28:1 (DN) is recommended for *Symbiodinium glynnii* culture. Further studies are needed to understand the mechanisms regulating the metabolism of these dinoflagellates.

Keywords: Microalgae. Growth. Nitrogen.

Lista de figuras

Figura 1 - Curvas de crescimento logístico de *Symbiodinium glynnii* nas proporções 0:1 (ZN), 7:1 (MN), 14:1 (NN) e 28:1 (DN), referente ao primeiro (C1) e segundo (C2) subcultivos. 25
Figura 2 – Curvas de consumo de nitrogênio e fósforo pelo *Symbiodinium glynnii* nas proporções 7:1 (MN), 14:1 (NN) e 28:1 (DN), referente ao segundo subcultivo. 25
Figura 3 - Correlação entre as velocidades de crescimento (K) encontradas para *Symbiodinium glynnii* cultivado nas proporções 7:1 (MN), 14:1 (NN) e 28:1 (DN) 25

Lista de tabelas

Tabela 1 - Variáveis de crescimento de *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes proporções nitrogênio:fósforo. 24
Tabela 2 - Composição bioquímica de *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes proporções nitrogênio:fósforo. 24

Sumário

1. Introdução 11

1.1. Microalgas: diversidade, composição e produtos 11

1.2. Dinoflagelados 14

1.3. Hipótese 17

1.4. Objetivos do trabalho 17

2. Influência de diferentes relações N:P no crescimento, teor proteico e lipídico do dinoflagelado *Symbiodinium glynnii*. 18

2.1. Introdução 18

2.2. Material e métodos 20

2.3. Resultados 23

2.4. Discussão 26

2.5. Conclusões 29

2.6. Referências 30

3. Considerações finais 38

4. Referências 39

1. Introdução

1.1. Microalgas: diversidade, composição e produtos

Microalgas são importantes organismos unicelulares nos ambientes aquáticos. São conhecidas por seus serviços ecossistêmicos relacionados a manutenção da base da teia trófica e a ciclagem do carbono atmosférico (ELTANAHY; TORKY, 2021; VERMA; SRIVASTAVA, 2018). Com origens que remetem os primórdios do desenvolvimento terrestre (período pré-cambriano), foram importantes atores do processo de terraformação, uma vez que atuaram consistentemente nas transformações atmosféricas e oceânicas, que suportaram o desenvolvimento *a posteriori* de formas mais complexas de vida (*e.g.* mamíferos) (GREENE et al., 2017; MERLO et al., 2021; SERVAIS et al., 2016). Para além de seu passado, este grupo de organismos fotossintetizantes e unicelulares (LOURENÇO, 2006, p. 27), formam a base da teia trófica nos ambientes aquáticos, sejam estes marinhos ou dulcícolas, perfazendo papéis ecológicos ímpares como a ciclagem das diversas formas de nitrogênio (CHAI et al., 2021). Apresentam uma expressiva diversidade de formas, habitats e modos de vida (DEEGAN; GARRITT, 1997), sendo um grupo polifilético e cosmopolita (FERNANDES; CORDEIRO, 2021). Manifestam uma alta eficiência energética para produção de complexas proteínas e ácidos graxos poli-insaturados, os quais são transferidos e impactam positivamente a teia trófica aquática (AHMAD; MEHMOOD; MALIK, 2020; AMORIM et al., 2021; FERREIRA et al., 2021). Sua expressiva síntese de biomoléculas a partir de nutrientes presentes nos corpos de água e atmosfera terrestre as tornam importantes contribuintes à manutenção das condições climáticas do planeta, uma vez que capturam cerca de 40% de carbono atmosférico (FALKOWSKI, 1994).

Porém, não apenas por seus serviços ecossistêmicos as microalgas são conhecidas. Devido a capacidade de produzir proteínas e ácidos graxos complexos, assim como outros compostos como pigmentos fotossintéticos e toxinas, são exploradas para produção de insumos industriais (TANG et al., 2020). Insumos de microalgas podem ser encontrados nas cadeias produtivas das indústrias de *aquafeed*, energia, nutrição, farmácia e biotecnologia (CARRASCO-REINADO et al., 2021; CHEN et al., 2021; DE CARVALHO SILVELLO et al., 2022; KIM et al., 2022; SUN et al., 2019). Dentre os principais produtos oriundos de microalgas existentes no mercado encontramos os concentrações de microalgas, insumos para rações, pré e probióticos aquícolas, suplementos alimentares para humanos, fármacos, biocombustíveis, cosméticos,

polímeros funcionais e rastreadores celulares (KIM; CHANG; KIM, 2021; PARK; LEE, 2022). Além dos produtos extraídos, também contamos com os serviços fornecidos pelas microalgas, como a biorremediação de efluentes industriais (ALSARAYREH et al., 2022; JAIN et al., 2022; VERASOUNDARAPANDIAN et al., 2022; YAN et al., 2022). Em aquicultura, as microalgas promovem uma maior sustentabilidade aos cultivos, uma vez que permitem o desenvolvimento da economia circular por meio da recuperação de sua biomassa em sistemas de biorremediados por estas (FRAGA-CORRAL et al., 2022; MISHRA; TIWARI; MAHMOUD, 2022).

A eficiente síntese de biomoléculas por meio da fotossíntese das microalgas, e quimiossíntese em alguns subgrupos (SIGNORI; FELIZARDO; ENRICH-PRAST, 2020), nos proporciona uma gama de biomoléculas com importantes aplicações comerciais (DIXON; WILKEN, 2018). As proteínas se destacam, pois podem apresentar um perfil de aminoácidos próximo aos encontrados nos ovos, porém com maior teor em aminoácidos (SIAHBALAEI; KAVOOSI; NOROOZI, 2021). Além disso, possuem maior solubilidade que proteínas encontradas em animais terrestres e vegetais (SCHWENZFEIER; WIERENGA; GRUPPEN, 2011), tornando-se fontes seguras de proteínas com alta qualidade nutricional e escalabilidade mercadológica (BECKER, 2007).

A produção de lipídios, em especial os ácidos graxos, da biomassa de microalgas se destaca pela alta escalabilidade em pequenas áreas (MIN et al., 2022), principalmente quando se objetiva a produção de biodiesel (JACOB et al., 2022), assim como relativa sustentabilidade de obtenção, quando comparado a outras fontes energéticas (MISHRA; ROY; MOHANTY, 2019). Entretanto, os usos destes ácidos graxos se estendem para outras aplicações, visto que além de suportar taxas de compressão ideais ao funcionamento em motores ciclo Diesel (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019), também apresentam perfis de interesse nutricional para humano e animal (CONDE et al., 2021). A existência de ácidos graxos essenciais como os ômegas 3 e 6 nas microalgas expressa seu alto valor nutricional, uma vez que estes ácidos podem ser precursores de carotenoides bioativos com relevante atividade anti-inflamatória (SOARES et al., 2019).

Os pigmentos presentes nas microalgas variam em função da diversidade de habitats e formas de vida (AMBATI et al., 2019). Diversos pigmentos são fontes de moléculas bioativas, destacando as clorofilas, ficobilinas e o betacaroteno (SILVA et al., 2020), apontados para o tratamento de diversas doenças, como as de origens crônicas, neurodegenerativas e hereditárias e inflamatórias (SIRAJUNNISA et al., 2021). Um

pigmento carotenoide de microalgas que vem se destacando comercialmente é a astaxantina, que possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes expressivas (VILLARÓ et al., 2021), com uso comercial bem estabelecido, sendo utilizado de aplicações farmacológicas a nutracêuticas (MULARCZYK; MICHALAK; MARYCZ, 2020).

Novos usos acerca das biomoléculas de microalgas surgem diariamente (DE ANDRADE; PORTO; BEZERRA, 2022), porém ainda existem muitos avanços quanto ao desenvolvimento das técnicas de cultivo, colheita e processamento para obtenção de biomassa (SIDDIKI et al., 2022). As características de cultivo de muitas espécies ainda são uma incógnita, dificultando assim avanços mais expressivos no desenvolvimento da biotecnologia das microalgas (SHARMA et al., 2022).

Para a expressão desta vasta gama de biomoléculas, as microalgas contam com um metabolismo fotossintético de alta eficiência (KHAN et al., 2022). Como precursoras dos processos fotossintéticos presentes hoje nos demais organismos fotossintetizantes (OBORNÍK, 2022), estas desenvolveram adaptações evolutivas que permitiram o aumento da eficiência energética, como o desenvolvimento de pigmentos fotossintéticos especializados, enzimas e estratégias otimizadas para absorção dos nutrientes presentes no ambiente (WANG et al., 2021).

O nitrogênio é um macronutriente chave ao processo fotossintético, pois está relacionado a síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos dentro da célula (EVANS; CLARKE, 2019). Esta dependência associada a concentração do nitrogênio no meio reflete na reprodução das microalgas e no acúmulo de biomassa, sendo importante para o crescimento populacional e composição bioquímica (COSTA et al., 2018). A variação deste nutriente proporciona diversas modificações no metabolismo celular das microalgas (SU, 2021). Maiores concentrações estão relacionadas a elevada taxa de crescimento e maior produção de biomassa (ZARRINMEHR et al., 2020). Já menores concentrações levam a baixos índices de crescimento e produtividade (NAGAPPAN et al., 2020), mas por outro lado pode elevar o acúmulo de lipídios e carboidratos para vias metabólicas de suprimento energético celular (WANG et al., 2019). Em alguns grupos de microalgas, a diminuição das concentrações de nitrogênio desencadeiam o desenvolvimento das fases de resistência celular ou dormência, onde os organismos diminuem sua atividade metabólica a níveis mínimos (FIGUEROA et al., 2009). Outro macronutriente essencial envolvido na modulação do crescimento das microalgas é o fósforo, porém este é requerido em menores concentrações que o nitrogênio, sendo

normalmente encontrado em relações 16:1 (N:P) no fitoplâncton marinho (CHEN et al., 2012; REDFIELD, 1934).

A obtenção da biomassa das microalgas permite o desenvolvimento de diversas aplicações que envolvem suas moléculas, como já relatado. Contudo, esta ascensão depende que características técnicas e biológicas das espécies estejam descritas para cultivos em diferentes escalas (BARCELLOS et al., 2012). Para o desenvolvimento de cultivos industriais, visando a obtenção de biomassa algal, se faz necessário uma precisa elucidação das informações sobre suas curvas de crescimento, índices de produtividade, composição e *inputs* nutricionais para a espécie alvo (RICHMOND; HU, 2013). Subgrupos de microalgas como as clorofíceas e as cianofíceas possuem espécies comerciais (*e.g. Chlorella* spp. e *Arthrospira* spp.) com elevado grau de conhecimento produzido, sendo expressiva a obtenção industrial de biomassa, assim como, aplicações comerciais (GARRIDO-CARDENAS et al., 2018). Entretanto, outros subgrupos de microalgas, como os dinoflagelados, apresentam pouco conhecimento produzido acerca de suas características de cultivo e escalabilidade (OLIVEIRA et al., 2020).

1.2. Dinoflagelados

O nome dinoflagelado remete ao termo grego "*dineo*", que descreve o ato de giro ou rotação sobre o próprio eixo, sendo um comportamento comum a estes organismos devido a presença de dois flagelos, onde um destes está introduzido transversalmente a célula, e ao produzir movimento causa um efeito rotatório; contudo também se apresentam como espécies imóveis (ROBERTS; ROBERTS, 1991). Ocorrem predominantemente na forma unicelular microscópica e apresentam uma variedade de formas e modos de vida, integrando assim diversos ambientes, principalmente em função de sua complexa diversidade evolutiva (FRANCESCHINI et al., 2010, p. 45). Os principais gêneros do grupo estão taxonomicamente integrados a divisão Pyrrophyta, na classe Dinophyceae, entretanto alguns dinoflagelados podem ser encontrados em grupos taxonômicos distintos a este (HOPPENRATH, 2017).

Dentre a diversidade de ecossistemas que estes são encontrados, um se destaca em função da essencialidade dos mecanismos fotossintéticos de fixação de carbono (C) e nitrogênio (N) dos dinoflagelados para a sua manutenção: os recifes de corais. Nestes ecossistemas, os dinoflagelados formam relações endossimbióticas que permitem o desenvolvimento das estruturas coralíneas, seja por meio da ação repelente de

organismos invasores ou pela biodisponibilização de micronutrientes essenciais ao crescimento destes, enquanto os corais propiciam substrato e macronutrientes em contrapartida (BAKER; CORREA; CUNNING, 2017). Há fortes evidências indicando um aumento da resiliência destes ecossistemas em cenários de instabilidade ambiental, quando em presença de biomoléculas oriundas dos dinoflagelados simbiontes, contudo esta interação ainda precisa ser melhor elucidada (SUGGETT; WARNER; LEGGAT, 2017). Os dinoflagelados endossimbiontes foram recentemente reorganizados na família Symbiodiniaceae, possuindo atualmente sete gêneros, sendo *Symbiodinium* seu principal representante (SHOGUCHI et al., 2021). Mesmo apresentando grande diversidade filogenética este gênero é caracterizado pela sua presença histórica nos ambientes recifais, onde sua constante produção de metabólitos secundários permitiram o surgimento e manutenção dos ambientes recifais que conhecemos hoje (KEMP; KEMPF; FITT, 2020; LAJEUNESSE et al., 2018).

Os metabólicos secundários e as biomoléculas produzidos por dinoflagelados vem sendo amplamente estudados visando o seu uso em aplicações biotecnológicas (GORDON; LEGGAT, 2010; KITA et al., 2005; LANGENBACH; MELKONIAN, 2019). A filogenia do grupo em consonância com sua vasta ocorrência e hábitos existentes justificam a observação de uma variedade de compostos bioativos nestes, sobretudo nas espécies pertencentes ao gênero *Symbiodinium*. Os principais pigmentos do *Symbiodinium* são as clorofilas *a*, *b*, *c* e peridinina, sendo estes encontrados normalmente em associação por meio do complexo fotossintético PCP (peridinina-clorofila-proteína) (HOFMANN et al., 1996). Em ocorrências naturais, onde há prevalência deste táxon, são observados compostos como peridinina, symbioiminas, zooxantelamidas e symbiopiróides, sendo estes compostos antioxidante, anti-inflamatório, vasoconstritor e modulador de atividade celular, respectivamente (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2021). Diversos usos terapêuticos são projetados, por meio da aplicação destes compostos em fármacos, como no tratamento da fibrose cística, câncer de garganta, Alzheimer e osteoporose (KITA et al., 2005). Além disso, são apontados como importantes produtores de ácidos graxos poli-insaturados, sendo promissores organismos às biorrefinarias (CHO et al., 2020; KOYAMA, 2011; TSIRIGOTI et al., 2020). Entretanto, a obtenção de biomassa desses é inespecífica e limita-se às florações naturais, fator que contribui negativamente para a quantidade de estudos detalhados acerca destes compostos bioativos, assim como sua aplicação fática (OLIVEIRA et al., 2020).

Estudos relacionados à obtenção de biomassa dos dinoflagelados em sistemas de cultivo são escassos (LIM et al., 2020). O crescimento dos dinoflagelados é fortemente impactado por suas características morfológicas e dentre as microalgas é o grupo com maior susceptibilidade às condições de cultivo, ocorrendo altas taxas de mortalidade celular e baixo crescimento (GALLARDO-RODRÍGUEZ et al., 2012). Essas características, são atribuídas principalmente à alta dependência de meios de cultura adequados às características fisiológicas destes organismos e a sensibilidade dos organismos às tensões de cisalhamento (BURKHOLDER; GLIBERT; SKELTON, 2008; LÓPEZ-ROSALES et al., 2015; WANG; LAN, 2018).

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de microalgas apresentam a proporção de seus nutrientes de forma a reproduzir os encontrados em meio natural para determinado organismo (SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2019). Entretanto, podem ser encontrados com modificações visando otimizar características fisiológicas ou bioquímicas (XIN et al., 2010), podendo estimular o crescimento celular ou o acúmulo de determinadas biomoléculas. Para microalgas marinhas a proporção ofertada dos nutrientes essenciais reproduz as encontradas no fitoplâncton presente em ambiente marinho (REDFIELD, 1934). O estímulo de maiores taxas de crescimento ocorre por meio do aporte dos principais macronutrientes, como nitrogênio, fósforo e ferro, visto que são importantes insumos ao metabolismo celular basal (JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012). O nitrogênio figura um dos nutrientes com maior importância para os organismos fotossintetizantes, uma vez que está presente na síntese proteica, assim como em diversas reações energéticas e estruturais dos organismos, influenciando diretamente no crescimento celular e na sua produção de biomassa (LOURENÇO, 2006, p. 62).

Para os dinoflagelados simbiontes ainda não há uma definição das proporções ideais dos nutrientes para uma manutenção eficiente de seus cultivos (LIM et al., 2020), pois em ambiente natural há variação diária nas proporções dos macronutrientes disponíveis (BAKER; CORREA; CUNNING, 2017), sendo difícil sua mensuração devido às flutuações causadas pelas marés (DUBINSKY; STAMBLER, 2011). A interação com as regiões mais próximas ao litoral também propicia maiores concentração nos nutrientes disponíveis (HOUK et al., 2020). Sendo assim, esta é uma importante área de investigação visando o cultivo em laboratório para produção de biomassa destes organismos.

1.3. Hipótese

Maiores relações nitrogênio:fósforo (N:P) aumentam a produção de biomassa e de proteínas em *Symbiodinium glynnii*.

1.4. Objetivos do trabalho

1.4.1. Geral

Avaliar o desempenho do dinoflagelado *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio.

1.4.2. Específicos

- Avaliar o crescimento de *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio, resultando em diferentes proporções de N:P.
- Analisar o consumo de nitrogênio e fósforo do *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio;
- Obter a produtividade em biomassa seca de *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio;
- Analisar os efeitos da relação N:P na composição bioquímica de *Symbiodinium glynnii*.

2. Influência de diferentes relações N:P no crescimento, teor proteico e lipídico do dinoflagelado *Symbiodinium glynnii*.

2.1. Introdução

Os dinoflagelados estão entre as microalgas mais promissoras para fins biotecnológicos, uma vez que podem sintetizar complexas moléculas de baixo peso molecular de elevada atividade biológica (*e.g*., ácidos graxos de cadeia longa, carotenoides, toxinas, etc.) (OLIVEIRA et al., 2020a; SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2021). Contudo, os mecanismos intermediadores da síntese desses compostos de alto interesse ainda são desconhecidos, assim como, as condições de cultivo para o crescimento ótimo ainda não foram totalmente elucidadas (PARK; DAM, 2021; WU et al., 2021). Além disso, diferente das outras microalgas, os dinoflagelados apresentam sensibilidade às tensões presentes aos sistemas de cultivo, tornando a uniformização do seu meio para com os padrões naturais mais complexa (POCHON; PAWLOWSKI, 2006).

Dinoflagelados endossimbiontes são organismos importantes na produtividade dos ambientes recifais. *Symbiodinium glynnii* é um promissor dinoflagelado para produção de biomassa em larga escala (WHAM; NING; LAJEUNESSE, 2017). Em ambiente natural, *S. glynnii* está associado a alta produtividade de compostos aleloquímicas de baixo peso molecular, capazes de prevenir a infestação dos recifes de corais por bactérias patogênicas (MCILROY; WONG; BAKER, 2020). O desenvolvimento das técnicas para o cultivo deste dinoflagelado se torna essencial para o melhor entendimento acerca de sua produção de biomoléculas, as quais possuem elevado potencial biotecnológico (LAWSON et al., 2019; VAN DE WATER et al., 2022), além de contribuir à elucidação de mecanismos fisiológicos e bioquímicos que possam estar relacionados com o papel destes organismos nos ambientes naturais (BAKER; CORREA; CUNNING, 2017). São notórios habitantes das regiões recifais (DECELLE et al., 2018), nas quais apresentam resistência às mudanças físicas e químicas que ocorrem nesses ambientes (LU et al., 2020), bem como a gradientes intensos de compostos nitrogenados (EL-SHEEKH et al., 2021).

Nos ambientes recifais ocorre constante deposição de nutrientes, seja em função da atividade metabólica da biota local ou da atividade antropogênica (CHEN et al., 2012; OLDS et al., 2018). Porém, compostos oriundos dos metabolismos coralíneos são facilmente depurados pelas dinâmicas ecossistêmicas (DUBINSKY; STAMBLER, 2011), enquanto os excedentes exógenos ficam disponíveis no ambiente e aumentam a

eutrofização (HOUK et al., 2020). As diferentes proporções (N:P) disponíveis podem alterar as taxas fotossintéticas das microalgas (DÖRNER et al., 2020; KEMP; KEMPF; FITT, 2020), uma vez que estes são macronutrientes essenciais ao metabolismo energético primário e o crescimento algal (JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012). Desta maneira, o balanço desses nutrientes pode proporcionar uma maior produtividade em biomassa.

Meios de cultura para microalgas marinhas possuem similaridade com a água do mar, contando com pequenas modificações que visam atender demandas específicas das espécies a serem cultivas (KISIELEWSKA et al., 2021). Estes quando desenvolvidos para dinoflagelados não podem ser considerados multipropósito, visto que a diversidade filogenética é elevada (FRANCESCHINI et al., 2010) e diferentes metabolismos estão presentes (COUSSEAU et al., 2020). Contudo, meios básicos podem propiciar um crescimento estável (TUTTLE; LOEBLICH, 1975). Modificações na concentração dos macronutrientes podem promover um aumento das taxas de crescimento e do volume celular (LEE et al., 2021). Sendo o nitrogênio um dos mais importantes nutrientes do metabolismo fotossintético (EVANS; CLARKE, 2019), estando presente na constituição das enzimas (BENTAHAR et al., 2019), proteínas (LAI et al., 2019), pigmentos (SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2019) e de alguns lipídios (REHMAN; ANAL, 2019), essenciais ao funcionamento celular. Um aumento nas concentrações deste nutriente estimula a produção de biomassa em microalgas (AVILA-LEÓN et al., 2020), enquanto a depleção altera o metabolismo lipídico, quando em disponibilidade de fósforo (YAAKOB et al., 2021). Uma maior disponibilidade dos macronutrientes essenciais às reações fotossintéticas e metabólicas permite um maior desenvolvimento populacional em ambientes naturais (LÓPEZ-SANDOVAL; DUARTE; AGUSTÍ, 2021). Com isso, o entendimento acerca dos efeitos de diferentes relações N:P colabora com a otimização das condições de crescimento em cultivo ideais a serem estabelecidas para os dinoflagelados.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos das diferentes concentrações de nitrogênio, resultando em diferentes relações de N:P, no crescimento e nos teores proteico e lipídico, do dinoflagelado endossimbionte *S. glynnii*.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Delineamento experimental

Symbiodinium glynnii foi obtido do banco de cepas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (Lapavi) situado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram utilizados quatro tratamentos com as respectivas proporções N:P: ZN (0:1); MN (7:1); NN (14:1); DN (28:1), obtidas por meio da modificação da solução de nitrato de sódio do meio f/2 (GUILLARD, 1975). Foram realizados três cultivos sucessivos em triplicata.

As culturas foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL, nos quais foi adicionada água do mar natural a 30 UPS, filtrada (0,2 μm), autoclavada (121 ºC por 21 min.) e enriquecida com vitaminas do complexo B: tiamina (B1), piridoxina (B6) e cianocobalamina, em concentração de 0,2 mL L^{-1}. Nestas foram inoculadas células de *S. glynnii* a uma concentração inicial de 5 x 10^4 cél. mL^{-1}. As culturas foram mantidas em 22 ± 1 °C, sob aeração constante, irradiância de 300 μmol fótons m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo integral.

2.2.2. Avaliação do crescimento

Foi avaliada a densidade celular a cada 72h por meio do hematocitômetro de Neubauer em microscópio óptico de campo claro (OLYMPUS CH30), para isto foram coletadas alíquotas de 0,5 mL, as quais foram fixadas em solução de formol a 2%. A partir destes dados foram calculadas Densidade Celular Máxima (DCM), Velocidade de crescimento (K) (eq. 01), Taxa de crescimento específico (μ) (eq. 02) e Tempo de duplicação (TD) (eq. 03), de acordo com metodologia proposta por Stein (1973).

$$K = \frac{3{,}322}{(\Delta_t) * \log(\frac{d}{d0})} \quad \text{(eq. 01)}$$

Onde K é a velocidade de crescimento em divisões por dia. "Δ_t", variação temporal da curva de crescimento analisada, em dias. "d0", densidade celular final. "d", densidade celular inicial.

$$\mu = \frac{\ln(n_t - n_0)}{\Delta_t} \quad \text{(eq. 02)}$$

Onde "μ" é o crescimento específicos expresso em dias. "N_t", número de células ao término da fase exponencial, em células por mililitro. "N_0", número de células no

início da fase exponencial, em células por mililitro. "Δ_t", variação temporal da fase exponencial da curva de crescimento analisada, em dias.

$$TD = \frac{1}{K} \quad \text{(eq. 03)}$$

2.2.3. Consumo de nutrientes no meio

O consumo de nitrogênio e fósforo em meio de cultura foi avaliado pelo método fotocolorimétrico. Semanalmente, foram coletadas alíquotas de 30mL das unidades experimentais, as quais foram homogeneizadas, filtradas e submetidas aos métodos do nitrato NTD (535nm) e ortofosfato (650nm), em triplicata. As leituras foram realizadas em fotocolorímetro portátil (ALFAKIT AT10P). Os resultados obtidos de NO_3 e PO_4 foram convertidos em N e P por meio de estequiometria. O consumo foi expresso em pontos percentuais.

2.2.4. Produtividade em biomassa seca

Um cultivo sucessivo, utilizando como inóculo o cultivo anterior e seus tratamentos (exceto ZN) foi executado em garrafões de 5 L como unidades experimentais. Após a detecção do decaimento da curva, o volume foi centrifugado (3200 x g), congelado em ultrafreezer a -80 ºC (SANYO MDF U33V) e liofilizado (TERRONI LS) por 48h, de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2020a). Em seguida o material foi pesado em balança semi-analítica (0,01g) e determinado o rendimento de biomassa (mg L^{-1}) (eq. 04) e produtividade diária (mg L^{-1} dia^{-1}) (eq. 05).

$$RBS = \left(\frac{B}{V}\right) * 1000 \qquad \text{(eq. 04)}$$

Onde RBS é o rendimento em biomassa seca, em miligrama por litro. "B", biomassa seca, em grama. "V", volume total do cultivo onde a biomassa foi extraída, em litros.

$$PBS = \frac{RBS}{d} \qquad \text{(eq. 05)}$$

Onde PBS é a produtividade diária em biomassa seca, em miligrama por litro. "d", tempo de cultivo total, em dias.

2.2.5. Composição bioquímica

Conteúdo proteico

Três alíquotas de 0,2 g da biomassa seca de cada tratamento foram submetidas a digestão, destilação e titulação por meio do método micro Kjeldahl (MA; ZUAZAGA, 1942), para obtenção do nitrogênio total. Sendo utilizado o fator de conversão Kjeldahl (F = 6,38) para a quantificação proteica das amostras, a partir da qual foi obtido o percentual de proteína total (%).

Conteúdo de lipídios brutos

Três alíquotas entre 1,0 a 1,5 g da biomassa seca de cada tratamento foram submetidas a extração e quantificação pelo método de extração por solvente em alta temperatura Am 5-04 (AOCS, 2009).

Rendimento e produtividade em proteínas e lipídios

Foram calculados a partir do RBS e PBS, por meio das equações 06 e 07.

$$REx = (T_x * RBS) \qquad \text{(eq. 06)}$$

Onde REx é o rendimento em proteínas (REP) ou lipídios (REL), em miligrama por litro. "T_x", o teor em proteínas totais ou lipídios brutos (%).

$$PRx = (T_x * PBS) \qquad \text{(eq. 06)}$$

Onde PRx é a produtividade em proteínas (PRP) ou lipídios (PRL), em miligrama por litro. "T_x", o teor em proteínas totais ou lipídios brutos (%).

2.2.6. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade, por meio do teste de Shapiro-Wilk e Cochran, respectivamente. Sendo submetidos posteriormente a análise de variância unidirecional (*one-way* ANOVA) e teste *post-hoc* de Tukey, quando necessário, por meio do software R (v. 4.1.2), com um nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$). Correlações lineares foram verificadas por meio de regressões.

2.3. Resultados

Os dados referentes as variáveis de crescimento do *Symbiodinium glynnii* são mostrados na Tabela 1. O dinoflagelado apresentou maior densidade celular máxima (DCM) no tratamento MN (87,17 ± 8,46 x 10^4 cél. mL^{-1}), sendo este estatisticamente diferente dos tratamentos DN (53,73 ± 8,78 x 10^4 cél. mL^{-1}) e NN (53 ± 0,50 x 10^4 cél. mL^{-1}). O tratamento ZN não apresentou crescimento consistente no cultivo sucessivo. A maior velocidade de crescimento (K) foi verificada no tratamento DN (0,19 ± 0,02), porém não difere estatisticamente do tratamento NN (0,16 ± 0,03), assim como se correlaciona linearmente ($y = 0,04297 * x + 0,1092$ e $R^2 = 0,8997$) com MN (0,12 ± 0,01) (Figura 03). Para a taxa de crescimento específico (μ) não houveram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Quanto ao tempo de duplicação, foi menor no tratamento DN (5,26 ± 0,38 dias), seguido por NN (6,18 ± 0,95 dias) e MN (8,21 ± 0,74 dias). Com relação a RBS, o tratamento DN se destacou com 753,33 ± 14,14 mg L^{-1}, assim como em PBS (31,39 ± 0,59 mg L^{-1} dia^{-1}) (Tabela 01).

Ao observar as curvas de crescimento do primeiro cultivo pode-se notar certa semelhança entre estas, havendo apenas pequenas variações com relação ao adiantamento da fase logarítmica de crescimento, à medida que se encontra maior concentração de N. Entretanto, a partir da observação das curvas de crescimento de *glynnii* no cultivo consecutivo, podemos observar um decaimento expressivo no tratamento ZN, assim como o não desenvolvimento da população. Enquanto nos demais houve crescimento no cultivo e subcultivo, assim como o alcance da fase de decaimento populacional nos tratamentos NN e DN, por volta dos 20 dias de cultivo (Figura 01).

Quanto ao consumo de N e P no meio pode-se observar semelhanças entre os tratamentos, quanto ao N há consumo mais intenso na primeira semana, sendo menos acentuado nas próximas. Já quanto ao P observamos semelhanças no consumo entre os tratamentos MN e DN, havendo entre a primeira e terceira semana diminuição menos intensa do que o tratamento NN. Por volta da 4ª semana, em todos os tratamentos, houve consumo total do P (Figura 02).

Para conteúdo proteico foram encontrados maiores teores (PPT) associados ao tratamento DN (31,51 ± 0,15 %), seguido de NN (23,14 ± 3,35 %) e MN (17,96 ± 0,48 %), onde apresentam diferença estatística entre os tratamentos. Resultado análogo foi encontrado para o rendimento (REP) e produtividade (PRP) em proteína, sendo

encontrados para DN (237,38 mg L^{-1} e 9,89 mg L^{-1} dia^{-1}), NN (119,29 mg L^{-1} e 4,97 mg L^{-1} dia^{-1}) e MN (66,33 mg L^{-1} e 2,76 g L^{-1} dia^{-1}), respectivamente (Tabela 02).

Quanto ao conteúdo dos lipídios brutos (LBT), foi verificado que os tratamentos MN (5,52 ± 0,48 %) e NN (5,52 ± 0,41 %) não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), apresentando maior teor em lipídios brutos o tratamento DN (7,27 ± 0,65 %). Contudo, para o rendimento em lipídios (REL) foram encontradas diferenças significativas onde: DN (54,77 mg L^{-1}) > NN (28,46 mg L^{-1}) > MN (20,36 mg L^{-1}). A produtividade média em lipídios brutos (PRL) também apresentou resultados diferentes, sendo a maior produtividade atribuída a DN (2,28 ± 0,04 mg L^{-1} dia^{-1}) (Tabela 02).

Tabela 1 - Variáveis de crescimento de *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes proporções nitrogênio:fósforo.

Variáveis	**Tratamentos**		
	MN	**NN**	**DN**
DCM (cél. x 10^4 mL^{-1})	87,17 ± 8,46 ^{a}	53,00 ± 0,50 ^{b}	53,73 ± 8,78 ^{b}
K (div. dia^{-1})	0,12 ± 0,01 ^{b}	0,16 ± 0,03 ^{ab}	0,19 ± 0,02 ^{a}
μ (dia^{-1})	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,06	0,17 ± 0,04
TD (dias)	8,21 ± 0,74 ^{a}	6,18 ± 0,95 ^{b}	5,26 ± 0,38 ^{b}
RBS (mg L^{-1})	368,89 ± 12,57 ^{c}	515,56 ± 14,01 ^{b}	753,33 ± 14,14 ^{a}
PBS (mg L^{-1} dia^{-1})	15,37 ± 0,52 ^{c}	21,48 ± 0,58 ^{b}	31,39 ± 0,59 ^{a}

Notas: DCM, densidade celular máxima. K, velocidade de crescimento. (μ), taxa de crescimento específico. TD, tempo de duplicação. RBS, rendimento em biomassa seca. PBS, produtividade em biomassa seca. Dados apresentados como média ± desvio - padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Composição bioquímica de *Symbiodinium glynnii* cultivado em diferentes proporções nitrogênio:fósforo.

Variáveis	Tratamentos		
	MN	NN	DN
PPT (%)	17,96 ± 0,48 ^{c}	23,14 ± 3,35 ^{b}	31,51 ± 0,15 ^{a}
LBT (%)	5,52 ± 0,48 ^{b}	5,52 ± 0,41 ^{b}	7,27 ± 0,65 ^{a}
REP (mg L^{-1})	66,33 ± 2,26 ^{c}	119,29 ± 3,24 ^{b}	237,38 ± 4,46 ^{a}
REL (mg L^{-1})	20,36 ± 0,69 ^{c}	28,46 ± 0,77 ^{b}	54,77 ± 1,03 ^{a}
PRP (mg L^{-1} dia^{-1})	2,76 ± 0,09 ^{c}	4,97 ± 0,14 ^{b}	9,89 ± 0,19 ^{a}
PRL (mg L^{-1} dia^{-1})	0,85 ± 0,03 ^{c}	1,19 ± 0,03 ^{b}	2,28 ± 0,04 ^{a}

Notas: PPT, percentual proteico total. LBT, lipídios brutos totais. REP, rendimento em proteína. REL, rendimento em lipídios. PRP, produtividade em proteína. PRL, produtividade em lipídios. Dados apresentados como média ± desvio - padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 1 - Curvas de crescimento logístico de *Symbiodinium glynnii* nas proporções 0:1 (ZN), 7:1 (MN), 14:1 (NN) e 28:1 (DN), referente ao primeiro (C1) e segundo (C2) subcultivos.

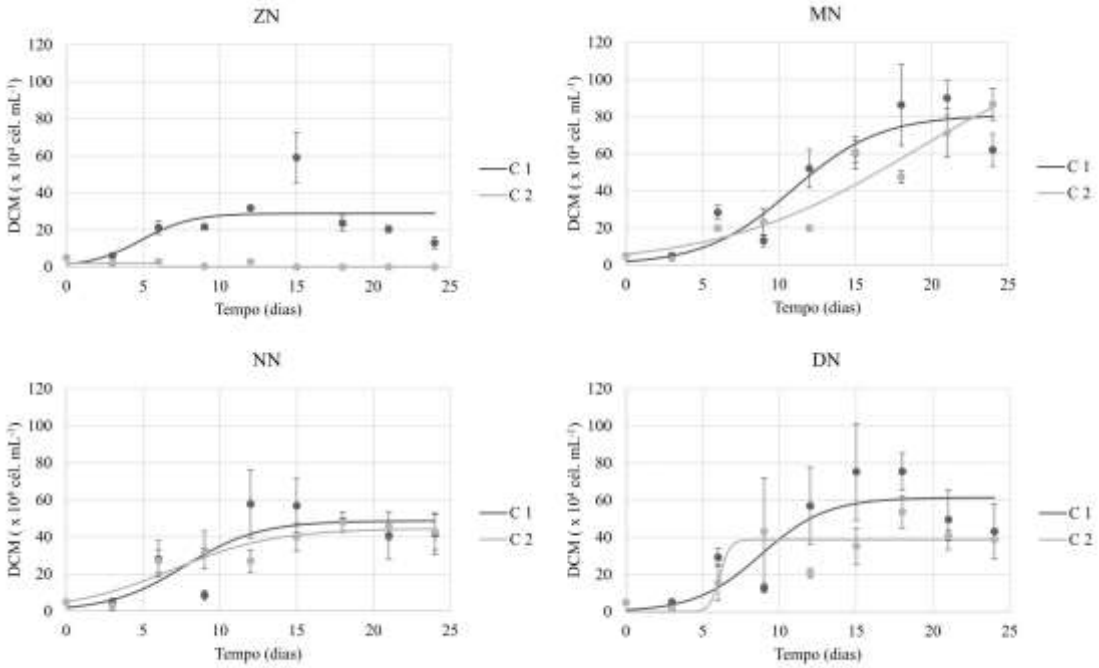


Figura 2 – Curvas de consumo de nitrogênio e fósforo pelo *Symbiodinium glynnii* nas proporções 7:1 (MN), 14:1 (NN) e 28:1 (DN), referente ao segundo subcultivo.

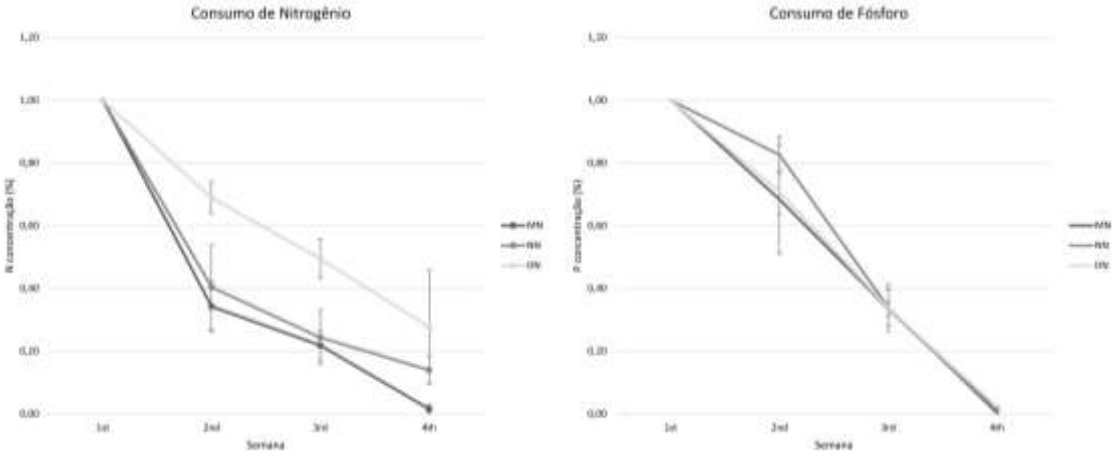
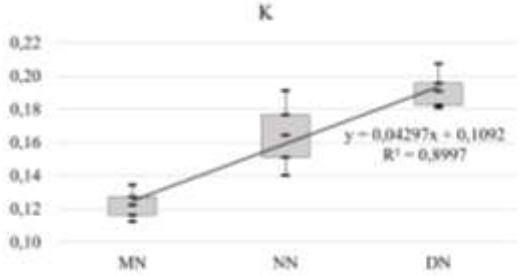


Figura 3 - Correlação entre as velocidades de crescimento (K) encontradas para *Symbiodinium glynnii* cultivado nas proporções 7:1 (MN), 14:1 (NN) e 28:1 (DN)



2.4. Discussão

O metabolismo de crescimento das microalgas é alterado de acordo com as concentrações dos macronutrientes no meio, como nitrogênio e fósforo (KIM et al., 2021). Em ambientes naturais eutrofizados com alta concentração de nitrogênio são observadas maiores produtividades de biomassa e taxas de crescimento para dinoflagelados (CHAI et al., 2021; KRUEGER et al., 2020; MEAVE DEL CASTILLO et al., 2020). Isto se dá por meio do metabolismo fotossintético das células vegetais, uma vez que em disponibilidade, o N do meio adentra as células e é rapidamente processado em forma de adenosina difosfato. Em presença de luz e P a molécula sofre a fotofosforilação, tornando-se adenosina trifosfato (ATP), a qual é processada para síntese de glicose, e manutenção energética da célula (REBEILLE; GANS, 1988). Contudo, não apenas ao transporte energético está associado ao nitrogênio, uma vez que a síntese de enzimas, pigmentos e metabólitos secundários estão associados a este nutriente (KUMAR; BERA, 2020), proporcionando maior eficiência metabólica e sobrevivência (PALIWAL et al., 2017). A concentração do nitrogênio influencia significativamente na via metabólica das microalgas, na produção de biomassa, na taxa de crescimento e composição bioquímica (HUANG et al., 2021).

No presente estudo, se obteve maior velocidade de crescimento no tratamento DN, sendo este efeito correlacionado linearmente ($R^2 = 0,8997$) às respostas obtidas para esta variável (DN > NN > MN), visto que são correspondentes às proporções N:P presentes nos tratamentos. Este efeito de correlação já foi observado em outros cultivos de microalgas (LIU et al., 2017; ZHANG et al., 2019). Para dinoflagelados, Parkhill (1999) também observou interação de *feedback* positivo por meio do uso de meios de cultura modificados. Uma vez que em situações com maior disponibilidade de macronutrientes, cianobactérias e dinoflagelados conseguem modificar rapidamente o metabolismo, utilizando-se de complexas vias metabólicas, as quais os permitem alcançar alta velocidade de crescimento, e consequentemente menor tempo de duplicação celular (ABASSI; KI, 2022).

Obteve-se menor TD nos tratamentos NN e DN (6,18 e 5,26 dias), não sendo observada diferença estatística ($p > 0,05$). Valores de TD semelhantes entre os tratamentos NN e DN são oriundos de uma resposta ao consumo de N em função do equilíbrio iônico dos meios, como definido por Lourenço (2006). Assim como, o TD inversamente proporcional ao K ocorre em função de uma síntese mais eficiente de

compostos estruturais e proteínas quando em maior presença de N (COSTA et al., 2018). Neste sentido, os dinoflagelados possuem menor eficiência fotossintética em situações de irradiância e fotoperíodo semelhantes às deste estudo em comparação à outras microalgas, como por exemplo *Tetraselmis* sp. (WARNER et al., 2002; PACHECO-RUÍZ; VALENZUELA-ESPINOZA; AGUILAR-ROSAS, 1991).

O aumento das concentrações de N nas relações N:P do meio, além de propiciarem aumento das taxas de crescimento e concomitante diminuição do tempo de duplicação celular, propicia maior produtividade de aminoácidos e proteínas. Os dinoflagelados são especialmente afetados por esta condição, uma vez que podem alterar seu metabolismo celular em detrimento desta produtividade e de mudanças nas condições ambientais (MORSE; TSE; LO, 2018; SHI et al., 2021). O maior RBS foi observado no tratamento DN (753,33 mg L^{-1}), seguido de NN (515,56 mg L^{-1}) e MN (368,89 mg L^{-1}), resultado este também observado para PBS, onde pode-se associar uma maior produtividade em biomassa do *Symbiodinium glynnii* ao tratamento com maior concentração de nitrogênio. Esta relação também é observada em trabalhos com outros dinoflagelados, onde ocorrem possível incremento da produção e produtividade em biomassa por meio da disponibilidade de maiores concentrações de N nas relações N:P, ocorrência desencadeada pela pós-modulação gênica – em dinoflagelados - dos mecanismos fisiológicos associados às vias energéticas (MOREY et al., 2011).

Os dinoflagelados apresentam grande diversidade filogenética (FRANCESCHINI et al., 2010, p. 45), apresentando apenas o gênero *Symbiodinium* inúmeros clados, com diferentes origens evolutivas e expressões bioquímicas (GORNIK et al., 2019; LU et al., 2020). *Symbiodinium glynnii* quando exposto a gradientes extremos na composição química ou condições físicas - em ambiente natural - apresentam mecanismos de autorregulação que os conferem resiliência ao estresse (WHAM; NING; LAJEUNESSE, 2017). Para o presente estudo não foram observadas diferenças significativas em μ, portanto diferentes concentrações de N não influenciaram a fase de crescimento exponencial do *Symbiodinium* no intervalo observado. A atuação dos mecanismos autorregulatórios do dinoflagelado simbionte, que o provê resiliência em ambiente natural, pode estar a ocasionar o efeito observado (DECELLE et al., 2018), contudo mais estudos são necessários. Para outras microalgas como *Phaeodactylum tricornutum* e *Dunaliella tertiolecta*, observa-se alteração em suas taxas de crescimento mediante alterações na concentração de nitrogênio (JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012; PODEVIN et al., 2015).

Diferente do observado para K, TD, RBS e PBS, para DCM observou-se maior densidade no tratamento MN (87,17 ± 8,46 x 10^4 cél. mL^{-1}), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Menores DCM nos tratamentos NN e DN indicam alta produção de proteínas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2012), uma vez que o nitrogênio absorvido em excesso pode ser armazenado na forma de proteínas (XIE et al., 2017). Este resultado corrobora com o mecanismo de sobrevivência celular descrito por Steidinger e Garccés (2006), onde em virtude da depleção de nutrientes e estresse oxidativo, há aumento da quantidade de células vegetativas viáveis para posterior processo de encistamento. Diferentes estratégias adaptativas são encontradas nos dinoflagelados, variando em função dos diferentes habitats em que estes se encontram, porém possuem gatilhos em comum, como a concentração de nutrientes disponíveis no meio (SMAYDA; REYNOLDS, 2003). Sendo o desenvolvimento de cistos uma dessas estratégias, onde os dinoflagelados perfazem, em resposta a uma condição ambiental não favorável, um estágio de dormência (HEAD, 1996). Neste estado o metabolismo celular é mínimo (BRAVO; FIGUEROA, 2014); alguns dinoflagelados apresentam expressiva produção de células antes do encistamento, assim como o desenvolvimento de cistos temporários (ZONNEVELD; POSPELOVA, 2015).

As curvas de crescimento obtidas demonstram crescimento nos tratamentos MN, NN e DN, entretanto o tratamento ZN não apresentou crescimento, havendo colapso populacional a partir do 15º dia do subcultivo. A falta de nitrogênio pode levar ao encistamento precoce de células vegetativas (LEE, 2008, p. 108), diminuindo a viabilidade destas caso as condições ideais não retornem rapidamente (COSTA et al., 2018). Crescimento semelhante entre o cultivo e o subcultivo são observados para os tratamentos MN e NN. Crescimento semelhante entre o cultivo e o subcultivo são observados para os tratamentos MN e NN, assim como, proporções semelhantes no consumo dos nutrientes N e P, variando nas primeiras semanas de cultivo em mais de 50% (Figura 02). Para DN um consumo na faixa de 20% por semana foi registrado para N, porém o mesmo apresentou um consumo em P próximo a MN. Segundo Hillebrand e Sommer (1999), proporções N:P em torno de 16:1 é suficiente para a maioria das microalgas marinhas apresentarem um crescimento satisfatório. Maiores proporções N:P propiciam o acúmulo de proteínas (LIEFER et al., 2019), enquanto menores proporções estão associadas ao maior bioacúmulo de compostos de reservas, como os ácidos graxos saturados e certos carboidratos (GAO et al., 2018). As diferentes espécies de microalgas ao removerem nutrientes do meio tendem a manter proporções fixas de subtração

(FERNANDES et al., 2017). Da mesma forma, a relação N:P é importante para o equilíbrio metabólico das células, sendo essas diferentes para os grupos de microalgas, nos dinoflagelados também são relatadas proporções 16:1 com base nas observações de Redfield (1934).

Com fortes implicações às variáveis de crescimento observadas, maiores concentrações de nitrogênio no meio propiciam, além de um crescimento acelerado, uma maior expressão proteica na biomassa dos organismos fotossintetizantes, através de diferentes mecanismos celulares (AMORIM et al., 2021). Neste estudo, o dinoflagelado *Symbiodinium glynnii* apresentou elevada produção proteica associada ao tratamento DN, alcançando um PPT de 31,51% com REP de 237,38 mg L^{-1} e PRP de 9,89 mg L^{-1} dia^{-1}. A obtenção de menores PPT nos demais tratamentos [NN (23,14 %), MN (17,96 %)], proporcional a adição de nitrogênio, corresponde ao efeito proposto por outros autores), onde maiores concentrações de N promovem significativo aumento no metabolismo proteico (KLOK et al., 2013; XIE et al., 2017). Neste sentido, baixas concentrações de N refletem em maior síntese de carboidratos e lipídios, onde mecanismos enzimáticos são prejudicados, assim como as variáveis de crescimento (LIEFER et al., 2019).

O conteúdo observado em LBT não corresponde ao observado por outros autores para lipídios totais (FENG et al., 2011; JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012; REHMAN; ANAL, 2019), uma vez que o acúmulo em lipídios normalmente apresenta-se inversamente proporcional a presença de maiores concentrações de N. Entretanto, nota-se que para todos os tratamentos o teor encontrado é baixo (< 8 %), possuindo REL e PRL também baixos (Tabela 02). Sendo justificável a expressão obtida como parte dos metabólitos lipídicos básicos intrínsecos ao organismo, como constituintes celulares essenciais a sua manutenção (SAJJADI et al., 2018).

2.5. Conclusões

Maiores rendimentos em biomassa, proteínas e lipídios em *Symbiodinium glynnii* foram obtidos ao utilizar maior relação N:P (DN – 28:1). Além disso, relação de 7:1 (MN) ou menores são prejudiciais ao crescimento celular, sendo recomendado para o cultivo do *S. glynnii* proporções entre 14:1 (NN) e 28:1 (DN).

2.6. Referências

ABASSI, S.; KI, J.-S. Increased nitrate concentration differentially affects cell growth and expression of nitrate transporter and other nitrogen-related genes in the harmful dinoflagellate Prorocentrum minimum. **Chemosphere**, v. 288, p. 132526, fev. 2022.

AMORIM, M. L. et al. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 12, p. 1976–2002, 4 jul. 2021.

AOCS. Official Method Am 5-04-Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. **Additions and revisions to the official methods and recommended pratices of the AOCS**, 2009.

AVILA-LEÓN, I. A. et al. Neochloris oleoabundans Growth Evaluation Under Different Nitrogen:Phosphorus:Carbon Feeding Strategies. **Current Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3270–3277, 4 nov. 2020.

BAKER, A. C.; CORREA, A. M. S.; CUNNING, R. Diversity, Distribution and Stability of Symbiodinium in Reef Corals of the Eastern Tropical Pacific. In: [s.l: s.n.].

BENTAHAR, J. et al. Investigation of β-galactosidase production by microalga Tetradesmus obliquus in determined growth conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 301–308, 28 fev. 2019.

BRAVO, I.; FIGUEROA, R. Towards an Ecological Understanding of Dinoflagellate Cyst Functions. **Microorganisms**, v. 2, n. 1, p. 11–32, 3 jan. 2014.

CHAI, X. et al. Blooms of diatom and dinoflagellate associated with nutrient imbalance driven by cycling of nitrogen and phosphorus in anaerobic sediments in Johor Strait (Malaysia). **Marine Environmental Research**, v. 169, p. 105398, jul. 2021.

CHEN, Y. et al. Spatial and temporal variations in nitrogen and phosphorous nutrients in the Yangtze River Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 10, p. 2083–2089, out. 2012.

COSTA, S. S. et al. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 116, p. 552–562, set. 2018.

COUSSEAU, A. et al. Marine dinoflagellates as a source of new bioactive structures. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2020. v. 65p. 125–171.

DECELLE, J. et al. Worldwide Occurrence and Activity of the Reef-Building Coral Symbiont Symbiodinium in the Open Ocean. **Current Biology**, v. 28, n. 22, p. 3625-3633.e3, nov. 2018.

DÖRNER, I. et al. Ocean acidification impacts on biomass and fatty acid composition of a post-bloom marine plankton community. **Marine Ecology Progress Series**, v. 647, p. 49–64, 13 ago. 2020.

DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. **Coral Reefs: An Ecosystem in Transition**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.

EL-SHEEKH, M. et al. Green technology for bioremediation of the eutrophication phenomenon in aquatic ecosystems: a review. **African Journal of Aquatic Science**, p. 1–19, 1 mar. 2021.

EVANS, J. R.; CLARKE, V. C. The nitrogen cost of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 7–15, 1 jan. 2019.

FENG, D. et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae Isochrysis zhangjiangensis (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6710–6716, 1 jun. 2011.

FERNANDES, T. V. et al. Toward an Ecologically Optimized N:P Recovery from Wastewater by Microalgae. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 11 set. 2017.

FRANCESCHINI, I. M. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

GAO, B. et al. Biological stoichiometry of oleaginous microalgal lipid synthesis: The role of N:P supply ratios and growth rate on microalgal elemental and biochemical composition. **Algal Research**, v. 32, p. 353–361, jun. 2018.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and

cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1655–1661, nov. 2012.

GORNIK, S. G. et al. The Biochemistry and Evolution of the Dinoflagellate Nucleus. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 245, 8 ago. 2019.

HEAD, M. J. Modern dinoflagellate cysts and their biological affinities. In: JANSONIUS, J.; MCGREGOR, D. C. (Eds.). . **Palynology: principles and applications**. [s.l.] American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation, 1996. p. 1197–1248.

HILLEBRAND, H.; SOMMER, U. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 2, p. 440–446, mar. 1999.

HOUK, P. et al. Nutrient thresholds to protect water quality and coral reefs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 159, p. 111451, out. 2020.

HUANG, Y. et al. Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic Chlorella vulgaris growth under stably controlled nutrient conditions. **Science of The Total Environment**, v. 752, p. 141747, jan. 2021.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70–77, maio 2012.

KEMP, D. W.; KEMPF, S. C.; FITT, W. K. The weight of it all: symbiotic dinoflagellates in Caribbean reef-building corals. **Marine Biology**, v. 167, n. 8, p. 121, 26 ago. 2020.

KIM, D. D. et al. Metagenomic insights into co-proliferation of Vibrio spp. and dinoflagellates Prorocentrum during a spring algal bloom in the coastal East China Sea. **Water Research**, v. 204, p. 117625, out. 2021.

KISIELEWSKA, M. et al. Effects of Liquid Digestate Treatment on Sustainable Microalgae Biomass Production. **BioEnergy Research**, 3 mar. 2021.

KLOK, A. J. et al. A model for customising biomass composition in continuous

microalgae production. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 89–100, out. 2013.

KRUEGER, T. et al. Intracellular competition for nitrogen controls dinoflagellate population density in corals. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, n. 1922, p. 20200049, 11 mar. 2020.

KUMAR, A.; BERA, S. Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100584, dez. 2020.

LAI, Y.-C. et al. Towards protein production and application by using Chlorella species as circular economy. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121625, out. 2019.

LAWSON, C. A. et al. Coral endosymbionts (Symbiodiniaceae) emit species-specific volatilomes that shift when exposed to thermal stress. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17395, 22 dez. 2019.

LEE, R. E. **Phycology, fourth edition**. [s.l: s.n.].

LEE, T. C.-H. et al. Establish axenic cultures of armored and unarmored marine dinoflagellate species using density separation, antibacterial treatments and stepwise dilution selection. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 202, 8 dez. 2021.

LIEFER, J. D. et al. The Macromolecular Basis of Phytoplankton C:N:P Under Nitrogen Starvation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 17 abr. 2019.

LIU, X. et al. Growth of Chlorella vulgaris and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 186, p. 977–985, nov. 2017.

LÓPEZ-SANDOVAL, D. C.; DUARTE, C. M.; AGUSTÍ, S. Nutrient and temperature constraints on primary production and net phytoplankton growth in a tropical ecosystem. **Limnology and Oceanography**, v. 66, n. 7, p. 2923–2935, 12 jul. 2021.

LOURENÇO, S. A. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. [s.l.] RiMa, 2006.

LU, Y. et al. Clade-Specific Sterol Metabolites in Dinoflagellate Endosymbionts Are Associated with Coral Bleaching in Response to Environmental Cues. **mSystems**, v. 5,

n. 5, 27 out. 2020.

MA, T.; ZUAZAGA, G. Micro-Kjeldahl Determination of Nitrogen.A New Indicator and An Improved Rapid Method. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition**, v. 14, n. 3, p. 280–282, 1 mar. 1942.

MCILROY, S. E.; WONG, J. C. Y.; BAKER, D. M. Competitive traits of coral symbionts may alter the structure and function of the microbiome. **The ISME Journal**, v. 14, n. 10, p. 2424–2432, 9 out. 2020.

MEAVE DEL CASTILLO, M. E. et al. Co-ocurrence of two toxic dinoflagellates in Acapulco Bay, Guerrero, Mexico: an opportunity to quantify their biology and ecology. **Acta Botanica Mexicana**, n. 127, 13 jan. 2020.

MOREY, J. S. et al. Transcriptomic response of the red tide dinoflagellate, Karenia brevis, to nitrogen and phosphorus depletion and addition. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 346, 5 dez. 2011.

MORSE, D.; TSE, S. P. .; LO, S. C. L. Exploring dinoflagellate biology with high-throughput proteomics. **Harmful Algae**, v. 75, p. 16–26, maio 2018.

OLDS, A. D. et al. The ecology of fish in the surf zones of ocean beaches: A global review. **Fish and Fisheries**, 2018.

OLIVEIRA, C. Y. B. et al. A Scientometric Overview of Global Dinoflagellate Research. **Publications**, v. 8, n. 4, p. 50, 25 nov. 2020a.

OLIVEIRA, C. Y. B. DE et al. A comparison of harvesting and drying methodologies on fatty acids composition of the green microalga Scenedesmus obliquus. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105437, jan. 2020b.

PACHECO-RUÍZ, I.; VALENZUELA-ESPINOZA, E.; AGUILAR-ROSAS, L. E. Mass Production Of Tetraselmis Suecica (Kylin) Butch. (Prasinophyceae), Under Different Concentrations Of Nutrients And Additions Of Carbon Dioxide. **Ciencias Marinas**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 6 mar. 1991.

PALIWAL, C. et al. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1216–1226, nov. 2017.

PARK, G.; DAM, H. G. Cell-growth gene expression reveals a direct fitness cost of grazer-induced toxin production in red tide dinoflagellate prey. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 288, n. 1944, p. 20202480, 10 fev. 2021.

PARKHILL, J. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate Alexandrium tamarense from northeastern Canada. **Journal of Plankton Research**, v. 21, n. 5, p. 939–955, 1 maio 1999.

POCHON, X.; PAWLOWSKI, J. Evolution of the soritids-Symbiodinium symbiosis. **SYMBIOSIS**, v. 42, p. 77–88, 2006.

PODEVIN, M. et al. Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high-throughput in vivo microplate autofluorescence method. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1415–1423, 2 ago. 2015.

REBEILLE, F.; GANS, P. Interaction between Chloroplasts and Mitochondria in Microalgae. **Plant Physiology**, v. 88, n. 4, p. 973–975, 1 dez. 1988.

REDFIELD, A. C. On the Proportions of Organic Derivatives in Sea Water and Their Relation to the Composition of Plankton. **James Johnstone Memorial Volume**, p. 176–192, 1934.

REHMAN, Z. U.; ANAL, A. K. Enhanced lipid and starch productivity of microalga (Chlorococcum sp. TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00298, mar. 2019.

SAJJADI, B. et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 200–232, dez. 2018.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, J. et al. Bioactivity and Biotechnological Overview of Naturally Occurring Compounds from the Dinoflagellate Family Symbiodiniaceae: A Systematic Review. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 1–10, 17 dez. 2021.

SHI, X. et al. Transcriptome responses of the dinoflagellate Karenia mikimotoi driven by nitrogen deficiency. **Harmful Algae**, v. 103, p. 101977, mar. 2021.

SMAYDA, T. J.; REYNOLDS, C. S. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. **Journal of Sea Research**, v. 49, n. 2, p. 95–106, mar. 2003.

SOSA-HERNÁNDEZ, J. E. et al. Light Intensity and Nitrogen Concentration Impact on the Biomass and Phycoerythrin Production by Porphyridium purpureum. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, p. 460, 7 ago. 2019.

STEIDINGER, K. A.; GARCCÉS, E. Importance of Life Cycles in the Ecology of Harmful Microalgae. In: **Ecology of Harmful Algae**. [s.l.] Springer, 2006. p. 37–49.

STEIN, J. R. Culture methods and growth measurements. In: STEIN, J. R. et al. (Eds.). . **Handbook of Phycological Methods**. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1973. p. 460.

TUTTLE, R. C.; LOEBLICH, A. R. An optimal growth medium for the dinoflagellate Crypthecodinium cohnii. **Phycologia**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 6 mar. 1975.

VAN DE WATER, J. A. et al. Coral holobionts and biotechnology: from Blue Economy to coral reef conservation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 110–121, abr. 2022.

WARNER, M. et al. Seasonal fluctuations in the photosynthetic capacity of photosystem II in symbiotic dinoflagellates in the Caribbean reef-building coral Montastraea. **Marine Biology**, v. 141, n. 1, p. 31–38, 1 jul. 2002.

WHAM, D. C.; NING, G.; LAJEUNESSE, T. C. Symbiodinium glynnii sp. nov., a species of stress-tolerant symbiotic dinoflagellates from pocilloporid and montiporid corals in the Pacific Ocean. **Phycologia**, v. 56, n. 4, p. 396–409, 2017.

WU, Z. et al. Effects of temperature on the growth and carbohydrate production of three benthic dinoflagellate species from Hainan Island, South China Sea. **Ecotoxicology**, v. 52, n. 6, p. 1064–1084, 17 jun. 2021.

XIE, T. et al. Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga Chlorella vulgaris : Over-compensation strategy. **Bioresource**

Technology, v. 233, p. 247–255, jun. 2017.

YAAKOB, M. A. et al. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 393, 14 fev. 2021.

ZHANG, Y. et al. Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of Scenedesmus acuminatus during nitrogen starvation and resupply. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 5, p. 2797–2809, 16 out. 2019.

ZONNEVELD, K. A. F.; POSPELOVA, V. A determination key for modern dinoflagellate cysts. **Palynology**, v. 39, n. 3, p. 387–409, 2 set. 2015.

3. Considerações finais

Pode-se concluir com este trabalho que os dinoflagelados possuem aptidão para a produção de biomassa em cultivos artificiais, assim como, possuem boas taxas de respostas a alterações em seus meios de cultura, principalmente no tangente as concentrações de nitrogênio e as relações N:P. O aumento das concentrações de nitrogênio influenciou positivamente no crescimento e expressão proteica do dinoflagelado *Symbiodinium glynnii*, sendo seu cultivo indicado para a produção de proteínas a partir de sua biomassa.

4. Referências

AHMAD, N.; MEHMOOD, M. A.; MALIK, S. Recombinant Protein Production in Microalgae: Emerging Trends. **Protein & Peptide Letters**, v. 27, n. 2, p. 105–110, 6 jan. 2020.

ALSARAYREH, M. et al. Biological-Based Produced Water Treatment Using Microalgae: Challenges and Efficiency. **Sustainability**, v. 14, n. 1, p. 499, 4 jan. 2022.

AMBATI, R. R. et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 12, p. 1880–1902, 4 jul. 2019.

AMORIM, M. L. et al. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 12, p. 1976–2002, 4 jul. 2021.

BAKER, A. C.; CORREA, A. M. S.; CUNNING, R. Diversity, Distribution and Stability of Symbiodinium in Reef Corals of the Eastern Tropical Pacific. In: [s.l: s.n.].

BARCELLOS, A. D. et al. MICROALGAS E SEU POTENCIAL DE USO. **Cadernos de Prospecção**, 2012.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, mar. 2007.

BURKHOLDER, J. A. M.; GLIBERT, P. M.; SKELTON, H. M. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. **Harmful Algae**, HABs and Eutrophication. v. 8, n. 1, p. 77–93, dez. 2008.

CARRASCO-REINADO, R. et al. Development of the "Applied Proteomics" Concept for Biotechnology Applications in Microalgae: Example of the Proteome Data in Nannochloropsis gaditana. **Marine Drugs**, v. 20, n. 1, p. 38, 29 dez. 2021.

CHAI, X. et al. Blooms of diatom and dinoflagellate associated with nutrient imbalance driven by cycling of nitrogen and phosphorus in anaerobic sediments in Johor Strait (Malaysia). **Marine Environmental Research**, v. 169, p. 105398, jul. 2021.

CHEN, F. et al. The application of microalgae biomass and bio-products as aquafeed for aquaculture. **Algal Research**, v. 60, p. 102541, dez. 2021.

CHEN, Y. et al. Spatial and temporal variations in nitrogen and phosphorous nutrients in the Yangtze River Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 10, p. 2083–2089, out. 2012.

CHO, K. et al. Industrial applications of dinoflagellate phycotoxins based on their modes of action: A review. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 805, 18 dez. 2020.

CONDE, T. A. et al. Microalgae as Sustainable Bio-Factories of Healthy Lipids: Evaluating Fatty Acid Content and Antioxidant Activity. **Marine Drugs**, v. 19, n. 7, p. 357, 23 jun. 2021.

COSTA, S. S. et al. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552–562, set. 2018.

DE ANDRADE, A. F.; PORTO, A. L. F.; BEZERRA, R. P. Photosynthetic microorganisms and their bioactive molecules as new product to healing wounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 2, p. 497–504, 5 jan. 2022.

DE CARVALHO SILVELLO, M. A. et al. Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126304, jan. 2022.

DEEGAN, L. A.; GARRITT, R. H. Evidence for spatial variability in estuarine food webs. **Marine Ecology Progress Series**, 1997.

DESHMUKH, S.; KUMAR, R.; BALA, K. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 191, p. 232–247, ago. 2019.

DIXON, C.; WILKEN, L. R. Green microalgae biomolecule separations and recovery. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 14, 28 dez. 2018.

DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. **Coral Reefs: An Ecosystem in Transition**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.

ELTANAHY, E.; TORKY, A. CHAPTER 1. Microalgae as Cell Factories: Food and Feed-grade High-value Metabolites. In: **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2021. p. 1–35.

EVANS, J. R.; CLARKE, V. C. The nitrogen cost of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 7–15, 1 jan. 2019.

FALKOWSKI, P. G. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. **Photosynthesis Research**, v. 39, n. 3, p. 235–258, mar. 1994.

FERNANDES, T.; CORDEIRO, N. Microalgae as Sustainable Biofactories to Produce High-Value Lipids: Biodiversity, Exploitation, and Biotechnological Applications. **Marine Drugs**, v. 19, n. 10, p. 573, 14 out. 2021.

FERREIRA, G. F. et al. Biomass and lipid characterization of microalgae genera Botryococcus, Chlorella, and Desmodesmus aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 5, p. 1675–1689, 16 out. 2021.

FIGUEROA, R. I. et al. The Life History and Cell Cycle of Kryptoperidinium foliaceum, A Dinoflagellate with Two Eukaryotic Nuclei. **Protist**, v. 160, n. 2, p. 285–300, maio 2009.

FRAGA-CORRAL, M. et al. Aquaculture as a circular bio-economy model with Galicia as a study case: How to transform waste into revalorized by-products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 23–35, jan. 2022.

FRANCESCHINI, I. M. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

GALLARDO-RODRÍGUEZ, J. et al. **Bioactives from microalgal dinoflagellatesBiotechnology Advances**: Special issue on ACB 2011., nov. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012001383>. Acesso em: 8 abr. 2019

GARRIDO-CARDENAS, J. A. et al. Microalgae research worldwide. **Algal Research**, v. 35, p. 50–60, 1 nov. 2018.

GORDON, B. R.; LEGGAT, W. Symbiodinium—Invertebrate Symbioses and the Role of Metabolomics. **Marine Drugs**, v. 8, n. 10, p. 2546–2568, 30 set. 2010.

GREENE, C. H. et al. Geoengineering, marine microalgae, and climate stabilization in the 21st century. **Earth's Future**, v. 5, n. 3, p. 278–284, 21 mar. 2017.

HOFMANN, E. et al. Structural basis of light harvesting by carotenoids: Peridinin-chlorophyll-protein from Amphidinium carterae. **Science**, v. 272, n. 5269, p. 1788–1791, 21 jun. 1996.

HOPPENRATH, M. Dinoflagellate taxonomy — a review and proposal of a revised classification. **Marine Biodiversity**, v. 47, n. 2, p. 381–403, 29 jun. 2017.

HOUK, P. et al. Nutrient thresholds to protect water quality and coral reefs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 159, p. 111451, out. 2020.

JACOB, A. et al. Scaling-up heterotrophic cultures of C. Pyrenoidosa microalgae for sustainable synthesis of low-density biodiesel mixtures and predict CI engine behavior at optimal proportions. **Environment, Development and Sustainability**, 4 jan. 2022.

JAIN, M. et al. Current perspective of innovative strategies for bioremediation of organic pollutants from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126305, jan. 2022.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70–77, maio 2012.

KEMP, D. W.; KEMPF, S. C.; FITT, W. K. The weight of it all: symbiotic dinoflagellates in Caribbean reef-building corals. **Marine Biology**, v. 167, n. 8, p. 121, 26 ago. 2020.

KHAN, M. J. et al. Impact of light on microalgal photosynthetic microbial fuel cells and removal of pollutants by nanoadsorbent biopolymers: Updates, challenges and innovations. **Chemosphere**, v. 288, p. 132589, fev. 2022.

KIM, G. M.; CHANG, W.-S.; KIM, Y.-K. Biocomposites Using Whole or Valuable Component-Extracted Microalgae Blended with Polymers: A Review. **Catalysts**, v. 12, n. 1, p. 25, 27 dez. 2021.

KIM, S. et al. Microalgal transformation of food processing byproducts into functional food ingredients. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126324, jan. 2022.

KITA, M. et al. Symbioimine and neosymbioimine, amphoteric iminium metabolites from the symbiotic marine dinoflagellate Symbiodinium sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2005.

KOYAMA, T. Extracts of marine algae show inhibitory activity against osteoclast differentiation. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press Inc., 2011. v. 64p. 443–454.

LAJEUNESSE, T. C. et al. Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. **Current Biology**, v. 28, n. 16, p. 2570- 2580.e6, ago. 2018.

LANGENBACH, D.; MELKONIAN, M. Optimising biomass and peridinin accumulation in the dinoflagellate Symbiodinium voratum using a twin-layer porous substrate bioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 21–28, 26 maio 2019.

LIM, A. S. et al. Semi-continuous cultivation of the mixotrophic dinoflagellate gymnodinium smaydae, a new promising microalga for OMEGA-3 production. **Algae**, v. 35, n. 3, p. 277–292, 2020.

LÓPEZ-ROSALES, L. et al. An optimal culture medium for growing Karlodinium veneficum: Progress towards a microalgal dinoflagellate-based bioprocess. **Algal Research**, 2015.

LOURENÇO, S. A. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. [s.l.] RiMa, 2006.

MERLO, S. et al. Marine Microalgae Contribution to Sustainable Development. **Water**, v. 13, n. 10, p. 1373, 14 maio 2021.

MIN, K. H. et al. Recent progress in flocculation, dewatering, and drying technologies for microalgae utilization: Scalable and low-cost harvesting process development. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126404, jan. 2022.

MISHRA, B.; TIWARI, A.; MAHMOUD, A. E. D. Microalgal potential for sustainable aquaculture applications: bioremediation, biocontrol, aquafeed. **Clean Technologies and Environmental Policy**, 15 jan. 2022.

MISHRA, S.; ROY, M.; MOHANTY, K. Microalgal bioenergy production under zero-waste biorefinery approach: Recent advances and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 122008, nov. 2019.

MULARCZYK, M.; MICHALAK, I.; MARYCZ, K. Astaxanthin and other Nutrients from Haematococcus pluvialis—Multifunctional Applications. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, p. 459, 7 set. 2020.

NAGAPPAN, S. et al. Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 1–14, abr. 2020.

OBORNÍK, M. Organellar Evolution: A Path from Benefit to Dependence.

Microorganisms, v. 10, n. 1, p. 122, 7 jan. 2022.

OLIVEIRA, C. Y. B. et al. A Scientometric Overview of Global Dinoflagellate Research. **Publications**, v. 8, n. 4, p. 50, 25 nov. 2020.

PARK, Y.-K.; LEE, J. Achievements in the production of bioplastics from microalgae. **Phytochemistry Reviews**, 3 jan. 2022.

REDFIELD, A. C. On the Proportions of Organic Derivatives in Sea Water and Their Relation to the Composition of Plankton. **James Johnstone Memorial Volume**, p. 176–192, 1934.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

ROBERTS, K. R.; ROBERTS, J. E. The flagellar apparatus and cytoskeleton of the dinoflagellates. In: **The Cytoskeleton of Flagellate and Ciliate Protists**. Vienna: Springer Vienna, 1991. p. 105–122.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, J. et al. Bioactivity and Biotechnological Overview of Naturally Occurring Compounds from the Dinoflagellate Family Symbiodiniaceae: A Systematic Review. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 1–10, 17 dez. 2021.

SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae Tetraselmis sp. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9121–9127, out. 2011.

SERVAIS, T. et al. The onset of the 'Ordovician Plankton Revolution' in the late Cambrian. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 458, p. 12–28, set. 2016.

SHARMA, R. et al. Recent advances in microalgae-based remediation of industrial and non-industrial wastewaters with simultaneous recovery of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126129, jan. 2022.

SHOGUCHI, E. et al. A New Dinoflagellate Genome Illuminates a Conserved Gene Cluster Involved in Sunscreen Biosynthesis. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 2, 3 fev. 2021.

SIAHBALAEI, R.; KAVOOSI, G.; NOROOZI, M. Protein nutritional quality, amino acid profile, anti-amylase and anti-glucosidase properties of microalgae: Inhibition and mechanisms of action through in vitro and in silico studies. **LWT**, v. 150, p. 112023, out. 2021.

SIDDIKI, S. Y. A. et al. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, p. 121782, jan. 2022.

SIGNORI, C. N.; FELIZARDO, J. P. DE S.; ENRICH-PRAST, A. Bacterial production prevails over photo- and chemosynthesis in a eutrophic tropical lagoon. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 243, p. 106889, set. 2020.

SILVA, S. C. et al. Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3406, 28 jul. 2020.

SIRAJUNNISA, A. R. et al. An overview on the role of microalgal metabolites and pigments in apoptosis induction against copious diseases. **Algal Research**, v. 60, p. 102556, dez. 2021.

SOARES, A. T. et al. Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. e01529, abr. 2019.

SOSA-HERNÁNDEZ, J. E. et al. Light Intensity and Nitrogen Concentration Impact on the Biomass and Phycoerythrin Production by Porphyridium purpureum. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, p. 460, 7 ago. 2019.

SU, Y. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 762, p. 144590, mar. 2021.

SUGGETT, D. J.; WARNER, M. E.; LEGGAT, W. Symbiotic Dinoflagellate Functional Diversity Mediates Coral Survival under Ecological Crisis. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, n. 10, p. 735–745, out. 2017.

SUN, J. et al. Microalgae biodiesel production in China: A preliminary economic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 104, p. 296–306, abr. 2019.

TANG, D. Y. Y. et al. Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 1967–1985, 7 nov. 2020.

TSIRIGOTI, A. et al. Biofilm cultivation of marine dinoflagellates under different temperatures and nitrogen regimes enhances DHA productivity. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–16, 2020.

VERASOUNDARAPANDIAN, G. et al. Remediation of Pesticides by Microalgae as Feasible Approach in Agriculture: Bibliometric Strategies. **Agronomy**, v. 12, n. 1, p. 117, 4 jan. 2022.

VERMA, R.; SRIVASTAVA, A. Carbon dioxide sequestration and its enhanced utilization by photoautotroph microalgae. **Environmental Development**, v. 27, p. 95–106, set. 2018.

VILLARÓ, S. et al. Microalgae Derived Astaxanthin: Research and Consumer Trends and Industrial Use as Food. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2303, 28 set. 2021.

WANG, C. et al. The Active Phytohormone in Microalgae: The Characteristics, Efficient Detection, and Their Adversity Resistance Applications. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 46, 22 dez. 2021.

WANG, C.; LAN, C. Q. Effects of shear stress on microalgae – A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 4, p. 986–1002, 1 jul. 2018.

WANG, X. et al. Influence of Nitrogen Limitation on Lipid Accumulation and EPA

and DHA Content in Four Marine Microalgae for Possible Use in Aquafeed. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, 12 mar. 2019.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 1 jul. 2010.

YAN, C. et al. Microalgal bioremediation of heavy metal pollution in water: Recent advances, challenges, and prospects. **Chemosphere**, v. 286, p. 131870, jan. 2022.

ZARRINMEHR, M. J. et al. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, Isochrysis galbana. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 2, p. 153–158, jun. 2020.