

Respostas morfológicas e bioquímicas da microalga *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) crescendo em regimes de depleção de nitrogênio no meio de cultura Johnson¹

 [Ronald Tarazona Delgado](#)^{2,3,5},  [Mayara dos Santos Guarieiro](#)⁴ e  [Valéria de Oliveira Fernandes](#)⁴

Como citar: Delgado, R. T., Guarieiro, M.S. & Fernandes, V.O. 2025. Respostas morfológicas e bioquímicas da microalga *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) crescendo em regimes de depleção de nitrogênio no meio de cultura Johnson. Hoehnea 52: e512022, 2025. <https://doi.org/10.1590/2236-8906e512022>.

ABSTRACT - (Morphological and biochemical responses of the microalga *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) growing under nitrogen depletion regimes in Johnson culture medium). In response to nutritional changes, microalgae experience distinct metabolic responses, which may result in the synthesis and/or increase of certain biomolecule due to nutritional stress. The present study evaluated the morphological and biochemical responses of the microalgae *Picocystis salinarum* growing in Johnson culture medium under different levels of nitrogen limitation, ranging from 0,125 to 1 g L⁻¹ KNO₃. During cultivation, dry mass (MS), chlorophyll and carotenoids were not significantly altered in the treatments used. High nitrogen depletion (0,125 g L⁻¹ KNO₃) resulted in a significant increase in lipid (22,3% MS) and carbohydrate (32% MS) contents, while protein content decreased (25,3% MS). On the other hand, treatment with 0,5 g L⁻¹ KNO₃ revealed high values of saturated fatty acids (959,09 µg g⁻¹ MS) and a decrease in unsaturated fatty acids (2,56 µg g⁻¹ MS). The increase in lipid content was confirmed by the formation of voluminous lipid bodies, in addition to the detection of starch grains. Our results demonstrate that nitrogen depletion is a strategy to increase lipid and carbohydrate content, followed by modification of the fatty acid profile. This observation is critical for the generation of a biomass with potential biotechnological applications. **Keywords:** Algae, biomass, carbohydrates, lipids, nutritional stress

RESUMO - (Respostas morfológicas e bioquímicas da microalga *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) crescendo em regimes de depleção de nitrogênio no meio de cultura Johnson). Em resposta a alterações nutricionais, as microalgas experimentam respostas metabólicas distintas, podendo haver a síntese e/ou aumento de uma determinada biomolécula em decorrência do estresse nutricional. O presente estudo avaliou as respostas morfológicas e bioquímicas da microalga *Picocystis salinarum* crescendo em meio de cultura Johnson sob diferentes níveis de depleção de nitrogênio, variando de 0,125 a 1 g L⁻¹ KNO₃. Durante o cultivo, massa seca (MS), clorofila e carotenoides não foram significativamente alterados nos tratamentos utilizados. A alta depleção de nitrogênio (0,125 g L⁻¹ KNO₃) resultou em um aumento significativo nos teores de lipídios (22,3% MS) e carboidratos (32% MS), enquanto o teor proteico diminuiu (25,3% MS). Por outro lado, o tratamento 0,5 g L⁻¹ KNO₃ revelou altos valores de ácidos graxos saturados (959,09 µg g⁻¹ MS) e diminuição de ácidos graxos insaturados (2,56 µg g⁻¹ MS). O aumento do teor lipídico foi confirmado pela formação de volumosos corpos lipídicos, além da detecção de grãos de amido. Nossos resultados demonstram que a depleção de nitrogênio é uma estratégia para aumentar o teor de lipídios e carboidratos, seguida de modificação do perfil de ácidos graxos. Essa observação é crítica para a geração de uma biomassa com potenciais aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Alga, biomassa, carboidratos, estresse nutricional, lipídeos

1. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro Autor

2. Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Avenida Itália, km 8, 96203-900 Rio Grande, RS, Brasil

3. Universidade Nacional de San Marcos, Museu de História Natural 'Javier Prado', Avenida Arenales, 1256, 14-0434 Lima, LIM, Peru

4. Universidade Federal do Espírito Santo, Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais, Avenida Fernando Ferrari, 519, 29075-910 Vitória, ES, Brasil

5. Autor para correspondência: ronald.mtd@hotmail.com

Introdução

A necessidade de fornecer nutrientes para obter cultivos unialgais remonta ao século XIX, com a obtenção de uma cepa axênica de *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890). Com o passar dos anos, numerosos estudos foram realizados para determinar as concentrações ótimas de nutrientes que atendam às exigências de um grupo majoritário das microalgas (Grobbelaar 2013). Vonshak (1986) identificou os requisitos fundamentais para o desenvolvimento de meios de cultura para microalgas: a salinidade (que é determinada pelo habitat de onde o microrganismo é oriundo), os principais componentes iônicos como K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , e Cl^- , a fonte de nitrogênio, a fonte de carbono ou CO_2 , e o pH.

Os meios de cultura são formulados de tal forma que os componentes supracitados são fornecidos de maneira adequada para evitar fatores restritivos de crescimento (Andersen *et al.* 2005). No entanto, em novas formulações e modificações de formulações, os nutrientes são propositadamente fornecidos em concentrações limitantes a determinadas espécies de microalgas para a produção, por exemplo, de β -caroteno, carboidratos ou ácidos graxos (Grobbelaar 2013).

O nitrogênio é um dos nutrientes críticos para o crescimento de microalgas, por participar da composição de biomoléculas como os ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, pigmentos (clorofilas), e moléculas de transferência de energia como o trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP) (Chia *et al.* 2013). As microalgas anabolizam o nitrogênio na forma inorgânica como íons amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-); mas também na forma orgânica, como a ureia ($((NH_2)_2CO)$). O principal caminho para a assimilação do nitrogênio é através do sistema enzimático da glutamina sintetase, através do qual o glutamato reage com o amônio, energeticamente acionado pelo ATP, para formar o aminoácido glutamina (Markou *et al.* 2014). Em escala laboratorial, o nitrato é a forma nitrogenada mais comumente utilizada nos meios sintéticos para o cultivo de microalgas, sendo os mais empregados o nitrato de sódio ($NaNO_3$) e o nitrato de potássio (KNO_3) (Andersen *et al.* 2005).

Em resposta da disponibilidade de nutrientes, as microalgas podem sofrer uma série de aclimações metabólicas que frequentemente resultam em variações na composição de suas macromoléculas. Portanto, é possível conseguir a síntese ou aumentar o teor de

uma determinada biomolécula a partir da indução de estresse nutricional (Ördög *et al.* 2012). A depleção de nutrientes é uma das abordagens mais utilizadas para direcionar as vias metabólicas da síntese de lipídeos e carboidratos em microalgas. Nesse cenário, os metabólitos acumulados como principal meio de armazenamento sob limitação de nutrientes, quando a fonte de energia (luz) está disponível (Pancha *et al.* 2014).

Spoehr & Milner (1949) foram os primeiros a demonstrar que a deficiência de nitrogênio induz aumento significativo no teor de lipídeos em microalgas. Embora tenha sido relatado que nutrientes inorgânicos como fósforo e ferro canalizam o fluxo metabólico para a biossíntese de lipídeos, o nitrogênio continua sendo considerado o fator limitante nutricional mais efetivo no desencadeamento de altos teores de óleos (Li-Beisson *et al.* 2019, Courchesne *et al.* 2009).

Picocystis salinarum (Chlorophyta) é uma microalga halófila pertencente ao picoplâncton (organismos que não excedam uma dimensão celular de 3 μm), ocorrente apenas em ambientes aquáticos continentais salinos (Pálmai *et al.* 2020, Lewin *et al.* 2000). *P. salinarum* é caracterizada por possuir um conjunto específico de pigmentos com um padrão incomum de carotenoides, contendo a presença de pigmentos de outras linhagens de algas como diatoxantina e monadoxantina, que são geralmente encontradas em diatomáceas e criptófitas, respectivamente. A espécie forma uma linhagem filogenética separada, constituindo assim sua própria classe: Picocystophyceae (Santos *et al.* 2017).

No ambiente e no seu cultivo, as células de *P. salinarum* são de morfotipo esférico e possuem um cloroplasto parietal em forma de taça e bilobado. A reprodução é por autoesporulação gerando duas células filhas, e não há evidência de reprodução sexual. No decorrer dos dias de cultivo, algumas células senescentes possuem um morfotipo trilobado, do qual os dois lobos laterais contêm partes do cloroplasto, enquanto o lobo central contém o núcleo (Santos *et al.* 2017, Lewin *et al.* 2000). Poucos gêneros possuem uma morfologia completamente diferente quando cultivados em escala laboratorial, em que a mesma (neste caso, o morfotipo trilobado) constitua o caráter fenotípico para sua identificação (Delgado *et al.* 2017, Krienitz *et al.* 2012).

Um dos meios comumente usados para o cultivo de clorófitas halófilas é o meio Johnson,

caracterizado por um pH alcalino e por conter uma fonte de nitrogênio e salinidade elevada, que simula o ambiente desses microrganismos (Borowitzka 1988). Meios de cultura para microalgas marinhas como meio ASP, meio f/2 e meio de água do mar enriquecido de Parvasoli também são úteis para esse grupo de microalgas (Andersen *et al.* 2005).

Devido à sua posição-chave como produtor primário com alta taxa de produção nas cadeias alimentares dos ambientes salinos inóspitos que habita e sua plasticidade metabólica (Krienitz *et al.* 2012), estudos relatam a *P. salinarum* como uma espécie potencial para uso biotecnológico, como a biorremediação de águas poluídas por metais pesados (Ben Ali *et al.* 2017) e por compostos intermediários na produção de plásticos e resíduos farmacêuticos (Ben Ali *et al.* 2022). Além disso, Wang *et al.* (2014) sugeriram o uso de sua biomassa como potencial fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel ao observarem um aumento substancial nos corpos lipídicos durante o seu cultivo em condições de déficit de nitrogênio. O presente estudo visa contribuir para o conhecimento dos aspectos morfológicos e bioquímicos de *P. salinarum* no meio de cultura Johnson sob diferentes níveis de depleção de nitrogênio.

Material e métodos

Cepa e condições de cultivo - A cepa *Picocystis salinarum* USM 303650 foi isolada das Salinas de Chilca; localizadas na região costeira árida central do Peru, e depositada no Herbário do Museu de História Natural 'Javier Prado' da Universidade Nacional de San Marcos. Seu registro, acompanhado de algumas características fisiológicas, foi descrito em um estudo prévio (Delgado *et al.* 2017). A cepa foi cultivada no meio Johnson (Borowitzka 1988), com pH corrigido para 8 utilizando uma solução de NaOH 0,01N, e esterilizado por autoclavagem (121 °C, 20 min). Os cultivos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (29 ± 1 °C), intensidade luminosa ($47,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obtida por meio de lâmpadas fluorescentes 40 W do tipo *daylight* e fotoperíodo (12: 12 h, claro: escuro). Os cultivos tipo *batch* foram realizados em erlenmeyers de 3 L, contendo 2,7 L do meio de cultura e 0,3 L do inóculo ($9,5 \pm 0,5 \times 10^5$ cel mL^{-1}), por um período de 20 dias e posteriormente liofilizados.

Delineamento experimental - Foram ensaiados três tratamentos de depleção de nitrogênio no cultivo de

P. salinarum para avaliar e comparar seu crescimento (massa seca), morfologia e composição bioquímica. A concentração original de nitrogênio no meio Johnson ($1 \text{ g L}^{-1} \text{ KNO}_3$) foi denominada 1 N (controle). Este foi modificado para diluições seriadas: 1/2, 1/4 e 1/8 vezes, recebendo as denominações 0,5 N, 0,25 N e 0,125 N, respectivamente.

Determinação da massa seca - Foi realizada por gravimetria a cada quatro dias filtrando alíquotas de 20 mL através de microfiltros de fibra de vidro (Macherey-Nagel, GF-1 47 mm), seguido de secagem em estufa a 60 °C até atingirem peso constante.

Análise da morfologia e estrutura celular - Durante o período do cultivo, as imagens das células foram registradas com um microscópio óptico (Nikon, Eclipse E2000). As microfotografias e medidas morfométricas foram efetuadas com a câmera Nikon DS-Fi2 acoplada ao software NIS Elements v. 4.10.01. Análises por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) também foram realizadas de acordo com o método de Souza *et al.* (2017), com pequenas modificações. As amostras (0,05 mg de biomassa liofilizada) foram lavadas em tampão fosfato-salino e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M a 4 °C por 12 h. Na sequência, foram lavadas três vezes com tampão cacodilato por 10 min. A pós-fixação foi realizada em OsO_4 1% em tampão de cacodilato 0,1 M e 1,25% de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1, v/v), seguida por desidratação em uma série de banhos de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram então infiltradas em resina Epon e polimerizadas em estufa a 60 °C por 48 h. Os blocos resultantes foram cortados a 60 nm em ultramicrotomo (PowerTome, PT-XL) e os cortes contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 1% por 30 min. Os cortes ultrafinos foram montados em grades de malha n° 400 revestidas com formvar e examinados no microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, JEM-1400), operado a uma voltagem de aceleração de 120 kV com um filamento LaB6.

Análises bioquímicas - A clorofila *a* e os carotenoides foram extraídos com acetona 90% a frio, e suas concentrações foram medidas espectrofotometricamente (Thermo Scientific, Aquamate Plus UV-Vis), seguindo os protocolos estabelecidos por Jeffrey & Humphrey (1975) e Strickland & Parsons (1972), respectivamente. As concentrações dos pigmentos foram avaliadas a cada quatro dias. A concentração de proteínas

hidrossolúveis foi determinada seguindo o método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina. Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método de Kochert (1978), com base em uma curva padrão de glicose anidra. Os lipídeos totais foram extraídos e analisados de acordo com Bligh & Dyer (1959). As análises de proteínas, carboidratos e lipídeos foram avaliadas apenas ao final do experimento e apresentadas como porcentagem da massa seca (% MS).

Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) - Os ácidos graxos procedentes da biomassa de microalgas foram determinados através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos ésteres metílicos. Inicialmente, a biomassa foi transesterificada seguindo a metodologia proposta por Menezes *et al.* (2013), com algumas modificações. Duzentas mg de biomassa foram suspensos em 3 mL de solução NaOH 0,5 M em metanol seguido de aquecimento a 70 °C por 10 min. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionando 9 mL de uma mistura esterificante composta por 2 g de NH₄Cl, 60 mL de metanol e 3 mL de H₂SO₄ concentrado que foi levado previamente a rotaevaporador a 150 rpm por 15 min. As amostras foram novamente aquecidas a 70 °C, resfriadas em banho de gelo, e 5 mL de heptano e 2 mL de água destilada foram adicionados à mistura e agitados em vórtex. A fase heptânica foi coletada e liofilizada para posteriormente ser analisada por cromatografia líquida.

Os FAME foram dissolvidos em 10 µL de acetonitrila e analisados em um sistema de cromatografia (Shimadzu, CBM-20A), equipado com um desgaseificador de solvente DGU-20AS, uma bomba quaternária de gradiente LC-20AT, um injetor de amostra automático SIL-20AHT, um detector de arranjo de diodos SPD-M20A e uma coluna analítica Kinetex C18 (100 × 2,1 mm, 2,6 µm, 100 nm). Uma fase móvel binária consistindo em (A) solução de ácido trifluoroacético e água destilada (0,1:99,9, v/v) e (B) acetonitrila foi filtrada usando um sistema de filtração a vácuo através de filtros de membrana de 0,45 µm e desgaseificada em um banho de ultrassom (Limpsonic). O sistema HPLC foi programado para operar sob condições controladas de temperatura da coluna (37 °C), comprimento de onda de detecção (210 nm) e vazão (0,25 mL min⁻¹). A seguinte eluição em gradiente foi empregada: 0-1 min: A 100%; 1-12 min: A 90-70%, B 20-40%; 12-32 min: A 100-90%, B 62-40%; 32-32,5 min (equilíbrio da coluna): A 100%.

Os ácidos graxos foram analisados comparando o tempo de retenção dos picos correspondentes com uma mistura padrão conhecida de FAME adicionada a cada amostra. O software LCSolutions v. 2.1 foi utilizado para aquisição e análise dos dados.

Análise estatística - Os tratamentos e controle foram realizados em triplicata (n = 3). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$). A análise de componentes principais (PCA) foi usada para determinar a relação entre todos os parâmetros analisados. A ANOVA e o teste de Tukey foram realizados com o software SigmaPlot v. 14.0 e a PCA com o software XLSTAT v. 2020.

Resultados e Discussão

A privação de nutrientes no cultivo de microalgas, como a depleção de nitrogênio (-N), exerce um impacto crítico na capacidade fotossintética da célula. Este efeito se manifesta principalmente através da redução na síntese dos pigmentos fotossintéticos e de alterações no metabolismo energético. Como resultado, observa-se a diminuição da densidade celular e, conseqüentemente, na produção de biomassa (Chia *et al.* 2013, Ördög *et al.* 2012). Não obstante, até o 16º dia de cultivo de *P. salinarum*, a massa seca dos tratamentos não mostrou diferença significativa entre si (figura 1). Entretanto, no final do cultivo, 1 N apresentou valor superior (0,89 g L⁻¹) em comparação a 0,5 e 0,25 N (0,81 e 0,80 g L⁻¹, respectivamente), seguido de 0,125 N que registrou valor de 0,76 g L⁻¹. Da mesma forma, Chen *et al.* (2011) não observaram diferenças significativas na massa seca em cultivos da microalga halófila *Dunaliella tertiolecta* quando a concentração de nitrogênio diminuiu à metade. Diante do exposto, a -N no meio Johnson em *P. salinarum* indica que determinadas espécies podem ter requerimentos nutricionais que não demandam concentrações elevadas de nutrientes inorgânicos para seu crescimento.

A morfologia e estrutura celular microalgal é afetada pela -N, e essas variações são tidas como uma consequência proporcional ao suprimento de nitrogênio no meio de cultivo (Pancha *et al.* 2014). As observações ao microscópio óptico revelaram que os cultivos de *P. salinarum* sob -N, ao contrário do esperado morfotipo trilobado (figura 2a) que foi observado minimamente, estiveram compostas principalmente por células esféricas e ovais (figura 2b). Isto representa uma estratégia de

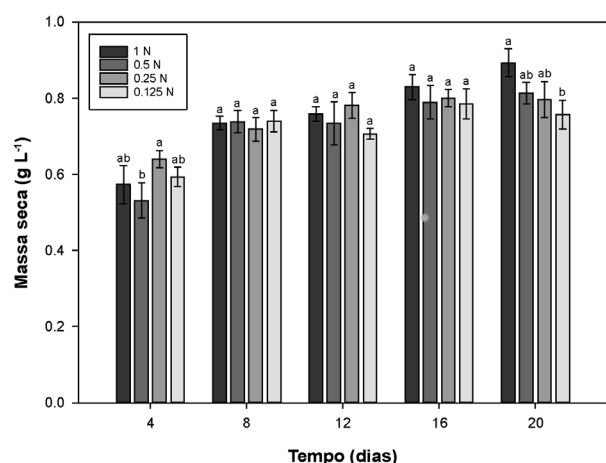


Figura 1. Efeito da depleção de nitrogênio na massa seca de *P. salinarum*. As barras de erro representam o desvio padrão ($n = 3$). Valores seguidos pela mesma letra entre os tratamentos em cada dia de avaliação não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figure 1. Effect of nitrogen depletion on the dry mass of *P. salinarum*. Bars represent the standard deviation ($n = 3$). Values followed by the same letter among treatments on each evaluation day do not differ significantly according to the Tukey test ($p < 0.05$).

crescimento da espécie sob estresse nutricional, na qual as células de morfotipo trilobado redefinem sua morfologia (figura 2c), que representa um menor gasto energético. Durante os últimos dias de cultivo, as células exibiram um corpo lipídico como organela armazenadora de substância de reserva (figura 2d), passando a ocupar uma grande fração do volume celular (figura 2e).

A TEM também permitiu observar como as células esféricas de *P. salinarum* em condições normais (figura 3a) mudam a formatos elipsoides nos tratamentos de -N acompanhados da desorganização e contração do cloroplasto (figura 3b, c, d). De modo similar, as células de *Chlamydomonas reinhardtii* com formato elipsoide (correspondendo à morfologia normal) foram gradualmente substituídas por formas esféricas maiores sob a -N, produto da aparição de corpos lipídicos citosólicos que causaram o aumento do volume celular e a redução das membranas plastidiais (Cakmak *et al.* 2012, Siaut *et al.* 2011). A aparição de corpos lipídicos em *P. salinarum* foi evidenciada em 0,25 e 0,125 N, acompanhada de grãos de amido (figura 3c, d). Nos tratamentos empregados, verificou-se que existe uma relação inversamente proporcional entre a concentração de nitrogênio e a formação do corpo lipídico. Nesse contexto, observa-se a transição de múltiplas unidades (figura 3c)

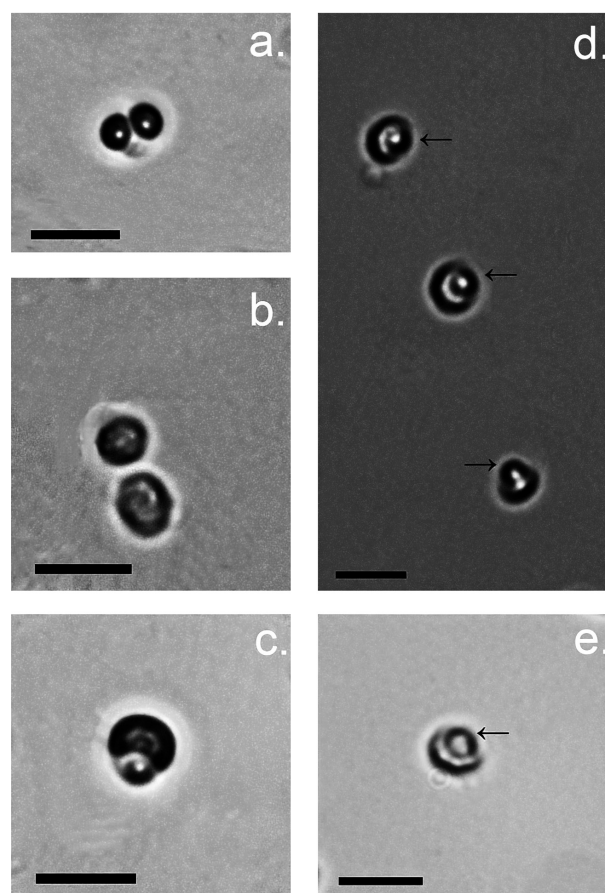


Figura 2. Morfologia de *P. salinarum*. a. Morfotipo trilobado (4º dia de cultivo). b. Morfotipo esférico e oval (8º dia de cultivo). c. Célula trilobada em transição à forma esférica (12º dia de cultivo). d. Células esféricas contendo corpo lipídico em formação (16º dia de cultivo). e. Célula esférica contendo corpo lipídico volumoso (20º dia de cultivo). As pontas das setas indicam os corpos lipídicos. Escala = 5 μm .

Figure 2. Morphology of *P. salinarum*. a. Trilobed morphotype (4th day of cultivation). b. Spherical and oval morphotype (8th day of cultivation). c. Trilobed cell in transition to spherical shape (12th day of cultivation). d. Spherical cells containing forming lipid bodies (16th day of cultivation). e. Spherical cell containing a voluminous lipid body (20th day of cultivation). Arrowheads indicate the lipid bodies. Scale = 5 μm .

para uma única e proeminente estrutura lipídica (figura 3d), promovendo assim o aumento do volume celular. A formação dessa organela e o aumento do tamanho celular em condições de -N foram também observadas nas clorófitas *D. tertiolecta* (Chen *et al.* 2011), *Nannochloropsis oceanica* (Jia *et al.* 2015) e *Scenedesmus subspicatus* (Dean *et al.* 2010).

O corpo lipídico é a principal estrutura de armazenamento de lipídeos neutros nos eucariotos, e evidências crescentes mostram seu envolvimento em outros processos celulares como homeostase

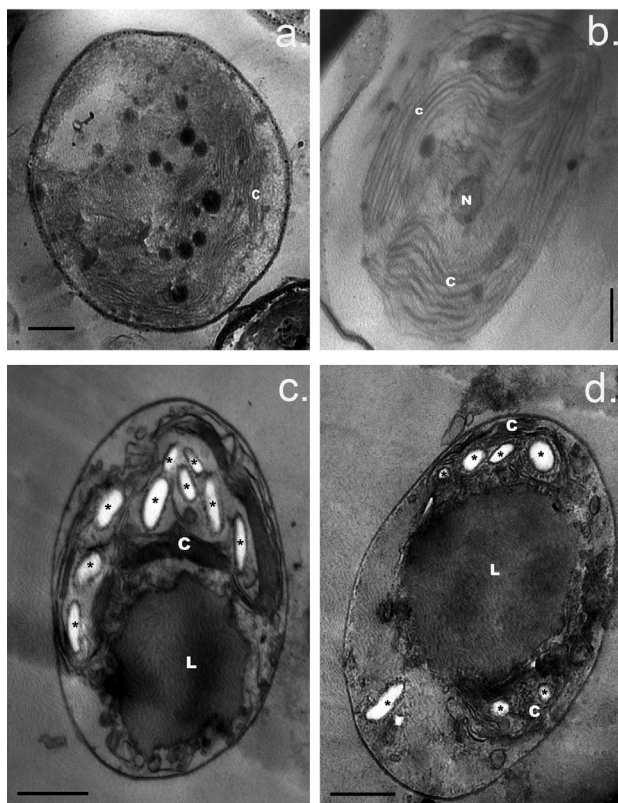


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de *P. salinarum* sob diferentes concentrações de nitrogênio: a. 1 N. b. 0,5 N. c. 0,25 N. d. 0,125 N. Símbolos: cloroplasto (C), núcleo (N), corpo lipídico (L), grão de amido (*). Escala = 0,5 µm.

Figure 3. Transmission electron microscopy of *P. salinarum* under different nitrogen concentrations: a. 1 N. b. 0,5 N. c. 0,25 N. d. 0,125 N. Symbols: chloroplast (C), nucleus (N), lipid body (L), starch grain (*). Scale = 0,5 µm.

lipídica e sinalização de comunicações entre outras organelas (Li-Beisson *et al.* 2019, Goold *et al.* 2014). Tem sido proposto que os lipídeos são sintetizados e empacotados inicialmente no plastídio e posteriormente transportados para o citoplasma, no qual formam o corpo lipídico (Eltgroth *et al.* 2005). O acúmulo de gotículas lipídicas pode ser desencadeado pela ausência de nutrientes (N, Fe, S, P), alta luminosidade, hipóxia ou aumento da salinidade. Dentre os vários fatores mencionados, o melhor estudado é a resposta da -N, na qual o corpo lipídico funciona como fonte de armazenamento de carbono sob condições adversas, visando a formação de um reservatório rico em energia para quando as condições ideais de crescimento se restabelecerem (Goold *et al.* 2014).

Os carboidratos armazenados nos cloroplastos na forma de grãos de amido constituem a principal

forma de reserva energética das microalgas (Maia *et al.* 2020). Zhu *et al.* (2014) observaram em *Chlorella zofingiensis* aumento dos grãos de amido após os primeiros dias sob -N. Posteriormente, as células aumentaram de tamanho devido à presença de corpos lipídicos ao invés de grãos de amido; além disso, foi observada a fusão de pequenos corpos lipídicos para formar outros maiores. Ito *et al.* (2013) demonstraram em *Pseudochoricystis ellipsoidea* sob -N, que os grânulos de amido podem se fundir e se converter em lipídeos. Esses achados sugerem que o fluxo de carbono do amido deve fornecer uma parte dos precursores necessários para a síntese lipídica, explicando assim a presença de um único e grande corpo lipídico nas células de *P. salinarum* no tratamento que corresponde ao menor teor de nitrogênio (figura 3d).

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e carotenoides) em *P. salinarum* nos diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa ao longo dos dias de cultivo (figura 4). As maiores concentrações dos pigmentos foram registradas no 20º dia de cultivo em 1 N, quando a clorofila *a* correspondeu a $2,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os carotenoides a $1,78 \mu\text{g mL}^{-1}$. Do mesmo modo, o teor de clorofila sob -N foi maior em comparação aos carotenoides em *C. reinhardtii* (Cakmak *et al.* 2012) e *D. tertiolecta* (Young & Beardall 2003). A persistência e aumento dos pigmentos em circunstâncias adversas como a -N pode refletir os custos diferenciais do nitrogênio entre a produção do pigmento principal e acessórios. Essa ocorrência pode estar relacionada à reorganização do aparato fotossintético para maximizar a eficiência de absorção de espectros específicos de luz sob situações de estresse nutricional (Young & Beardall 2003).

Os valores obtidos nas análises do teor final de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) em *P. salinarum* estão representados na figura 5. Sendo o nitrogênio o elemento essencial na participação da síntese proteica, a deficiência deste diminuirá sua biossíntese, afetando funções celulares como inibição do ciclo do ácido cítrico, diminuição da divisão celular devido à insuficiência de proteínas do centro reacional do fotossistema e do transporte fotossintético de elétrons, ativando assim vias metabólicas alternativas para a fixação de carbono, como a síntese de carboidratos ou lipídeos (Pancha *et al.* 2014). Em nosso estudo, a -N não afetou consideravelmente a concentração de proteínas de *P. salinarum* ($26,6 \pm 1,3\%$ MS), possivelmente porque,

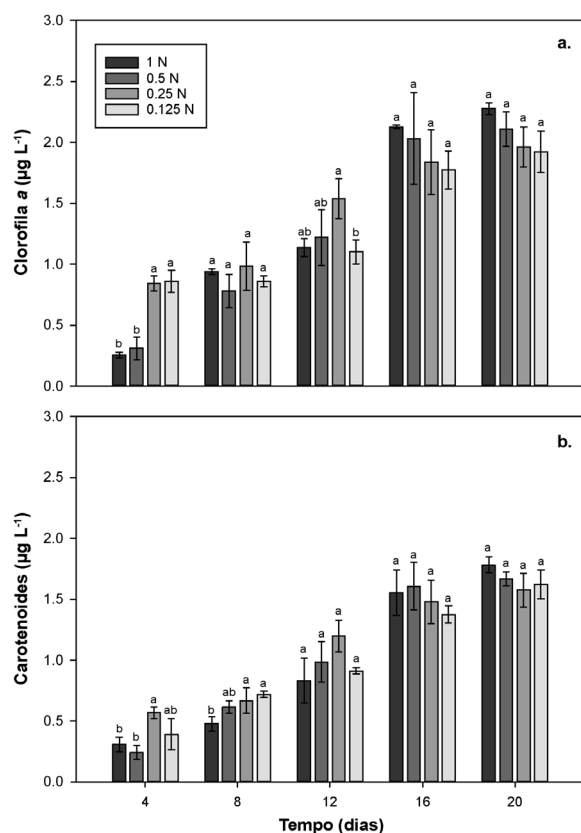


Figura 4. Efeito da depleção de nitrogênio no conteúdo de pigmentos fotossintéticos de *P. salinarum*. Barras representam o desvio padrão ($n = 3$). Valores seguidos pela mesma letra entre os tratamentos em cada dia de avaliação não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figure 4. Effect of nitrogen depletion on *P. salinarum* photosynthetic pigment content. Bars represent the standard deviation ($n = 3$). Values followed by the same letter among treatments on each evaluation day do not differ significantly according to the Tukey test ($p < 0.05$).

embora houvesse decréscimo na concentração de nitrato nos tratamentos, a concentração ainda seria suficiente para a produção proteica. Assim, o teor proteico em *C. reinhardtii* diminuiu apenas em 18% em resposta à -N (Dean *et al.* 2010), porém, podendo diminuir drasticamente para 82% (Cakmak *et al.* 2012). Em *N. oceanica*, a -N causou redução de até três vezes (de 38% MS para 9,5% MS) (Jia *et al.* 2015).

Geralmente, nas microalgas, os carboidratos são armazenados na camada externa da parede celular (pectina, ágar, alginato) e na camada interna da parede celular (celulose, hemiceluloses) (Maia *et al.* 2020). Sob -N, o carbono gerado pela fotossíntese pode ser direcionado para a síntese de moléculas de armazenamento como o amido (Msanne *et al.* 2012). A diminuição do fornecimento do nitrogênio aumentou

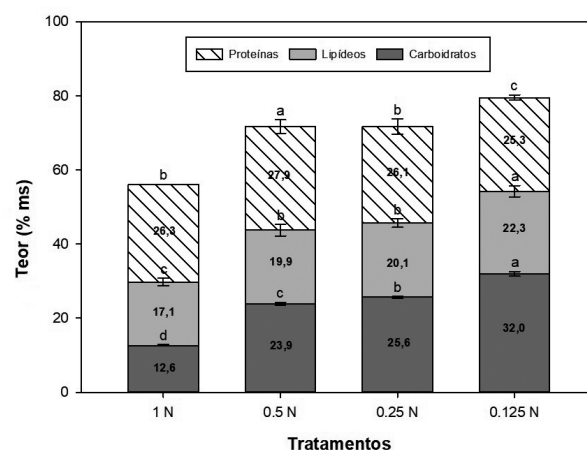


Figura 5. Efeito da depleção de nitrogênio no teor de proteínas, carboidratos e lipídeos de *P. salinarum*. Barras representam o desvio padrão ($n = 3$). Valores seguidos pela mesma letra entre os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figure 5. Effect of nitrogen depletion on the protein, carbohydrate and lipid content of *P. salinarum*. Bars represent the standard deviation ($n = 3$). Values followed by the same letter among treatments do not differ significantly according to the Tukey test ($p < 0.05$).

o teor de carboidratos em *P. salinarum* (figura 5), sendo a biomolécula predominante em 0,125 N (32% MS), com o acúmulo de numerosos grãos de amido, conforme descrito anteriormente e provavelmente pelo espessamento da parede celular. Cobos *et al.* (2017) também encontraram aumento no teor de carboidratos sob -N, de 44,3% MS para 49,6% MS em *Acutodesmus obliquus*, de 30,3% MS para 34,6% MS em *Ankistrodesmus* sp., e em *Chlorella lewinii* de 24,6% MS para 48,3% MS.

Na presença de nitrogênio, os lipídeos têm função principalmente estrutural na membrana (Ördög *et al.* 2012). Como detalhado previamente, sob -N o fluxo de carbono fotossintético também pode se canalizar em biomoléculas ricas energeticamente como os lipídeos, em detrimento de uma taxa de crescimento reduzida (Siaut *et al.* 2011). Os lipídeos são produtos de armazenamento preferidos pelas microalgas sob várias condições de estresse, porque são de natureza hidrófoba, têm estados muito reduzidos, são empacotados eficientemente na célula e podem ser utilizados nestas condições adversas para sua sobrevivência e posterior proliferação celular (Courchesne *et al.* 2009). A -N causou aumento no teor lipídico de *P. salinarum*, atingindo até 22,3% MS em 0,125 N (figura 5). Com tal característica, uma diminuição de 75% do nitrato no meio de cultura em N.

oceanica aumentou o teor de lipídeos de 7,9% MS para 15,31% MS e em *C. vulgaris* de 5,9% MS para 16,41% MS (Converti *et al.* 2009). Da mesma forma, em *Acutodesmus obliquus* ocorreu aumento do teor lipídico de 15,2% MS para 18,8% MS e em *Ankistrodesmus* sp. de 23,7% MS a 39,5% MS (Cobos *et al.* 2017). A -N também pode favorecer consideravelmente o aumento de lipídeos como constatado em três cepas de *Chlorella*: *C. emersonii*, *C. minutissima* e *C. vulgaris*, que mostraram teor lipídico na ordem de 63, 56 e 40% MS, respectivamente (Illman *et al.* 2000). Os resultados desse trabalho sugerem que o metabolismo de *P. salinarum* é dependente do nível de depleção de nitrogênio, selecionando vias metabólicas distintas em resposta às necessidades de desenvolvimento.

A composição dos FAME de *P. salinarum* sob diferentes níveis de -N está listada na tabela 1. Os ácidos graxos foram classificados como ácidos graxos saturados (SFA) e insaturados (UFA). Os SFA detectados foram o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0). Os UFA foram divididos em monoinsaturado (MUFA), como o ácido oleico (C18:1), e poli-insaturados (PUFA), como o ácido linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Dos SFA, o maior contribuinte foi o ácido palmítico em 0,5 e 1 N com 859,21 e 295,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS, respectivamente. Entretanto, nos tratamentos 0,25 e 0,125 N ocorreu uma considerável diminuição do ácido palmítico ($1,825 \pm 0,675 \mu\text{g g}^{-1}$ MS), seguida pelo aumento do ácido láurico. No caso dos UFA, o ácido oleico aumentou em detrimento da diminuição de nitrogênio, atingindo até 440,07 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS em 0,125 N. Nesse mesmo tratamento, o ácido linolênico foi o único a ser detectado.

As microalgas cultivadas com adequado conteúdo de nitrogênio geralmente têm aos SFA como principais constituintes dos FAME. Em contraste, a -N inibe a produção de SFA e estimula os UFA, com destaque no ácido oleico como encontrado em *Chlorella zofingiensis* (Zhu *et al.* 2014) e *D. tertiolecta* (Chen *et al.* 2011). A diminuição dos PUFA também é uma característica da -N registrada em microalgas, como detalham Msanne *et al.* (2012) em *Coccomyxa* sp., que diminuiu seus teores de ácido linoleico e linolênico sob essa condição estressante e, ao contrário, mostrou aumento do ácido oleico. Diante do exposto, evidencia-se que as microalgas tendem a diminuir o grau de insaturação dos ácidos graxos em resposta à -N.

A PCA permitiu obter um panorama geral dos efeitos da -N no crescimento, morfologia e

composição bioquímica de *P. salinarum* (figura 6). O cultivo desta microalga em condições normais apresenta características esperadas nas clorófitas, como o seu crescimento acompanhado de altos conteúdos de clorofila *a*, carotenoides e massa seca. A presença de altos teores de proteínas e ácidos mirístico e palmítico foi característica em 0,5 N. Já o alto teor de lipídeos e carboidratos foi relacionado aos tratamentos 0,25 e 0,125 N, o que tem relação com as observações de corpos lipídicos e grãos de amido por TEM. Ainda, os ácidos oleico, linoleico e linolênico estiveram relacionados com o tratamento 0,125 N. A pesquisa atual está se concentrando na bioprospecção de cepas microalgais e nas técnicas de cultivo para a otimização da síntese de biomoléculas como lipídeos e carboidratos como matéria-prima para biocombustíveis (Rizza *et al.* 2017). Os lipídeos das microalgas são usados para a produção de biodiesel após a esterificação em ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos, e sua composição com uma mistura alta de SFA e MUFA, é ideal por oferecer maior rendimento energético e estabilidade oxidativa (Chisti 2007). Por outro lado, os carboidratos das microalgas são mais facilmente hidrolisados em monossacarídeos do que outros materiais lignocelulósicos (plantas

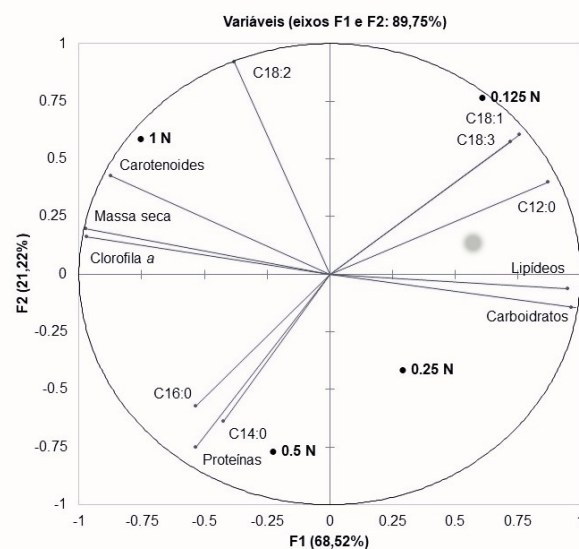


Figura 6. Análise de componentes principais de *P. salinarum* sob diferentes tratamentos de depleção de nitrogênio. Parâmetros agrupados no mesmo eixo ortogonal estão positivamente correlacionados, enquanto aqueles em eixos opostos têm uma correlação negativa.

Figure 6. Principal component analysis of *P. salinarum* under different nitrogen depletion treatments. Parameters grouped on the same orthogonal axis are positively correlated, while those on opposite axes are negatively correlated.

Tabela 1. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) de *P. salinarum* sob depleção de nitrogênio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Abreviações: não detectado (-).

Table 1. Profile of fatty acid methyl esters ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) of *P. salinarum* under nitrogen depletion. Values followed by the same letter do not differ significantly between treatments according to the Tukey test ($p < 0.05$). Abbreviations: not detected (-).

	1 N	0.5 N	0.25 N	0.125 N
Ácido láurico (C12:0)	-	19,74 c	36,06 b	132,31 a
Ácido mirístico (C14:0)	18,81 b	80,14 a	1,23 c	1,73 c
Ácido palmítico (C16:0)	295,67 b	859,21 a	1,15 c	2,50 c
Ácido oleico (C18:1)	42,21 c	2,19 d	76,25 b	440,07 a
Ácido linoleico (C18:2)	16,02 a	0,37 c	0,19 c	9,92 b
Ácido linolênico (C18:3)	-	-	-	0,17 a
SFA	314,48 b	959,09 a	38,44 d	136,54 c
UFA	58,23 b	2,56 c	76,44 b	450,16 a
MUFA	42,21 c	2,19 d	76,25 b	440,07 a
PUFA	16,02 a	0,37 c	0,19 c	10,09 b

superiores) porque a lignina não está presente. Desta forma, a produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal representa uma alternativa promissora (Maia *et al.* 2020).

Para produzir efetivamente biocombustíveis, é crucial encontrar uma espécie com alto teor de lipídios ou carboidratos que também possa gerar uma quantidade significativa de biomassa. Ao cultivar microalgas, é importante determinar as concentrações adequadas de macronutrientes para meios de cultura custo-efetivos. Portanto, o entendimento das características morfológicas e bioquímicas de cepas menos conhecidas, como *P. salinarum*, é importante. Esta linhagem tem uma alta taxa de produção de massa seca sob condições estressantes como deficiência de nitrogênio e pode sintetizar biomoléculas valiosas, tornando-se uma candidata promissora para a formulação de bioprodutos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores gostariam de agradecer aos seguintes laboratórios da UFES: Laboratório de Ultraestrutura Celular 'Carlos Alberto Redins' pelo auxílio na microscopia eletrônica de transmissão e Laboratório

de Saneamento pelo apoio na análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos.

Contribuição dos autores

Ronald Tarazona Delgado: Contribuição na elaboração e no delineamento do estudo. Contribuição na coleta, análise e interpretação de dados. Contribuição na preparação do manuscrito.

Mayara dos Santos Guarieiro: Contribuição na coleta de dados. Contribuição na preparação do manuscrito.

Valéria de Oliveira Fernandes: Contribuição na redação e revisão crítica do manuscrito.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Literatura citada

- Andersen, R.A., Berges, J.A., Harrison, P.J. & Watanabe, M.M.** 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In: R.A. Andersen (ed.). *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, San Diego, pp. 269-286.
- Beijerinck, M.W.** 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47: 726-740.

- Ben Ali, R., Ben Ouada, S., Chouchene, L., Messaoudi, I., Ben Ouada, H. & Othmane, A.** 2017. Cadmium effect on physiological responses of the tolerant Chlorophyta specie *Picocystis* sp. isolated from Tunisian wastewaters. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 1803-1810.
- Ben Ali, R., Ben Ouada, S., Leboulanger, C., Jebali, A., Sayadi, S. & Ben Ouada, H.** 2022. Emerging contaminants and nutrients recovery by *Picocystis* sp. under continuous culture in contaminated secondary municipal wastewater effluent. *Algal Research* 66: 102804.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Borowitzka, M.A.** 1988. Algal growth media and sources of algal cultures. In: M.A. Borowitzka & L.J. Borowitzka (eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, New York, pp. 456-465.
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y.E., Ozkan, A.D., Elibol, Z. & Tekinay, T.** 2012. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 1947-1957.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y.S. & Salley, S.O.** 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102: 1649-1655.
- Chia, A.M., Lombardi, A.T., Melão, M.G.G. & Parrish, C.C.** 2013. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology* 48: 1-11.
- Chisti, Y.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.
- Cobos, M., Paredes, J.D., Maddox, J.D., Vargas-Arana, G., Flores, L., Aguilar, C.P., Marapara, J.L. & Castro, J.C.** 2017. Isolation and characterization of native microalgae from the Peruvian Amazon with potential for biodiesel production. *Energies* 10: 1-16.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. & Del Borghi, M.** 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing. Process Intensification* 48: 1146-1151.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B. & Lan, C.Q.** 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology* 141: 31-41.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B. & Pittman, J.K.** 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology* 101: 4499-4507.
- Delgado, R.T., Terreros, H.M., Astocondor, M.M. & Huatucu, E.M.** 2017. *Picocystis salinarum* (Prasinophyceae, Chlorophyta) en las Salinas de Chilca, Lima, primer registro para el Perú. *Arnaldoa* 24: 557-566.
- Eltgroth, M.L., Watwood, R.L. & Wolfe, G.V.** 2005. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliana huxleyi*. *Journal of Phycology* 41: 1000-1009.
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G. & Li-Beisson, Y.** 2014. Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports* 34: 545-555.
- Grobbelaar, J.U.** 2013. The microalgal cell with reference to mass cultures. Inorganic algal nutrition. In: A. Richmond & Q. Hu (eds.). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, Wiley-Blackwell, pp. 123-133.
- Illman, A.M., Scragg, A.H. & Shales, S.W.** 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 631-635.
- Ito, T., Tanaka, M., Shinkawa, H., Nakada, T., Ano, Y., Kurano, N., Soga, T. & Tomita, M.** 2013. Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics* 9: 178-187.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F.** 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167: 191-194.
- Jia, J., Han, D., Gerken, H.G., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q. & Xu, J.** 2015. Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research* 7: 66-77.
- Kochert, G.** 1978. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: J.A. Hellebust & J.S. Craigie (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 95-97.
- Krienitz, L., Bock, C., Kotut, K. & Luo, W.** 2012. *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) in saline lakes and hot springs of East Africa. *Phycologia* 51: 22-32.
- Lewin, R.A., Krienitz, L., Goericke, R., Takeda, H. & Hepperle, D.** 2000. *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) - a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* 39: 560-565.
- Li-Beisson, Y., Thelen, J.J., Fedosejevs, E. & Harwood, J.L.** 2019. The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 74: 31-68.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

- Maia, J.L., Cardoso, J.S., Mastrantonio, D.J.S., Bierhals, C.K., Moreira, J.B., Costa, J.A.V., & Morais, M.G. 2020. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules* 165: 2739-2749.
- Markou, G., Vandamme, D. & Muylaert, K. 2014. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* 65: 186-202.
- Menezes, R.S., Leles, M.I.G., Soares, A.T., Franco, M., Filho, N.R.A., Sant'Anna, C.L. & Vieira, A.A.H. 2013. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova* 36: 10-15.
- Msanne, J., Xu, D., Konda, A.R., Casas-Mollano, J.A., Awada, T., Cahoon, E.B. & Cerutti, H. 2012. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry* 75: 50-59.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Bálint, P., Van Staden, J. & Lovász, C. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology* 24: 907-914.
- Pálmai, T., Szabó B., Kotut K., Krienitz L. & Padisák J. 2020. Ecophysiology of a successful phytoplankton competitor in the African flamingo lakes: the green alga *Picocystis salinarum* (Picocystophyceae). *Journal of Applied Phycology* 32: 1813-1825.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R. & Mishra, S. 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology* 156: 146-154.
- Rizza, L.S., Smachetti, M.E.S., Nascimento, M., Salerno, G.L. & Curatti, L. 2017. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Research* 22: 140-147.
- Santos, A.L., Pollina, T., Gourvil, P., Corre, E., Marie, D., Garrido, J.L., Rodríguez, F., Noël, M.H., Vault, D. & Eikrem, W. 2017. Chloropicophyceae, a new class of picophytoplanktonic prasinophytes. *Scientific Reports* 7: 14019.
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y. & Peltier, G. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology* 11: 1-15.
- Souza, L.S., Simioni, C., Bouzon, Z.L., Schneider, R.C.S., Gressler, P., Miotto, M.C., Rossi, M.J. & Röhrig, L.R. 2017. Morphological and ultrastructural characterization of the acidophilic and lipid-producer strain *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 (Chlorophyta) under different culture conditions. *Protoplasma* 254: 1385-1398.
- Spoehr, H.A. & Milner, H.W. 1949. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant Physiology* 24: 120-149.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, Ottawa.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: A. Richmond (ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, pp. 117-145.
- Wang, S., Lambert, W., Giang, S., Goericke, R. & Palenik, B. 2014. Microalgal assemblages in a poikilohaline pond. *Journal of Phycology* 50: 303-309.
- Young, E.B. & Beardall, J. 2003. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of Phycology* 39: 897-905.
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J. & Yuan, Z. 2014. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology* 152: 292-298.

Associate Editor: Márcia Regina Braga

Received: 14/10/2022

Accepted: 19/07/2024

