

MARIANA FONSECA MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA DE  
DIATOMÁCEAS CULTIVADAS SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE SILÍCIO E NITROGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M149c  
2014 Machado, Mariana Fonseca, 1983-  
Caracterização fisiológica e metabólica de diatomáceas  
cultivadas sob diferentes concentrações de silício e  
nitrogênio / Mariana Fonseca Machado. - Viçosa, MG, 2014.  
xi, 93f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Adriano Nunes Nesi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Diatomáceas. 2. Metabolismo. 3. Fotossíntese.  
4. Nitrogênio. 5. Silício. 6. Lipídeos. 7. Água residuais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.85

MARIANA FONSECA MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA DE  
DIATOMÁCEAS CULTIVADAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES  
DE SILÍCIO E NITROGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 11 de agosto de 2014.

---

Dimas Mendes Ribeiro

---

Diolina Moura Silva  
(membro externo)

---

Marcio Arêdes Martins  
(coorientador)

---

Wagner Luiz Araújo  
(coorientador)

---

Adriano Nunes Nesi  
(orientador)

*D*edico

**Aos meus pais, Geraldo e Maria**

**Helena.**

*“Nossa passagem pela vida é rápida.  
Cada um vem, conta sua história, vai embora  
e depois ela será apagada para sempre. A vida continua.”*  
(Oscar Niemeyer)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me guiou neste caminho e durante toda minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal que ofereceram toda estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Petrobrás pela bolsa de estudos concedida e pelos recursos necessários para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Rosane Aguiar (in memorian), sem o seu incentivo eu não teria trilhado o caminho que percorri por esses anos. Serei sempre grata!

Ao meu orientador, Prof. Adriano Nunes Nesi. Obrigada pela paciência, atenção e pelas oportunidades que me ajudaram a crescer como pesquisadora.

Aos meus coorientadores Prof. Marcio Arêdes Martins e Prof. Wagner Luiz Araújo. Agradeço por todos os momentos de aprendizado.

Ao Prof. Lothar Willmitzer que me acolheu em seu grupo no Instituto Max Planck e a todos os membros do grupo WILLMITZER, principalmente Dr. Mariuz Bromke, Dr. Jędrzej Szymanski, Dr. Michael Meret, Anne Eckardt e Gudrun Wolter.

Aos membros da banca Prof. Dimas Mendes Ribeiro e Prof<sup>a</sup>. Diolina Moura Silva.

Aos amigos brasileiros que convivi no Instituto Max Planck. Em especial a Laise Rosado e Adilson Pereira Domingues Junior.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, em especial Rogério Gomide, Antônio Teixeira Cordeiro e Carlos Raimundo Alves de Souza pelo auxílio técnico em vários momentos do doutorado.

Ao Ângelo Valentim Lopes, secretário da Botânica.

Aos colegas da UCP, por todo o conhecimento que adquirimos juntos no dia-a-dia do laboratório. Obrigada pelas ótimas companhias!

Aos professores e amigos da pós-graduação em Botânica que tive o prazer de conhecer e conviver.

Ao meu noivo, Diego Ismael Rocha, que é meu amigo, companheiro, parceiro de profissão e que me faz aprender a cada dia mais. Obrigada pelo amor, apoio e incentivo!

A minha família que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida acadêmica/ e profissional, com palavras de carinho. Minha gratidão será eterna!

## **BIOGRAFIA**

Mariana Fonseca Machado, filha de Geraldo Eustáquio Rodrigues Machado e Maria Helena Fonseca Machado, nasceu em 11 de agosto de 1983, na cidade de Divinópolis, Minas Gerais. Completou ensino médio em sua cidade de nascimento em 2001.

Fez curso de Licenciatura plena em Ciências Biológicas na Universidade de Itaúna, concluindo-o no ano de 2007.

No ano de 2009 iniciou o programa de mestrado em Botânica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo os requisitos para obtenção do título de Magister Scientiae em fevereiro de 2011.

Em março de 2011 iniciou o programa de doutorado em Botânica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo os requisitos para obtenção do título de Doctor Scientiae em 11 de agosto de 2014.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS CITADAS .....	6
Capítulo I - Caracterização fisiológica e metabólica de cepas de diatomáceas cultivadas sob diferentes níveis de nitrogênio .....	10
Resumo.....	10
Abstract .....	12
1.    Introdução .....	14
2.    Materiais e Métodos.....	17
2.1.    Obtenção, seleção e manutenção das cepas .....	17
2.2.    Condições de cultivo e tratamentos aplicados .....	18
2.3.    Coleta de amostras e análises bioquímicas .....	19
2.4.    Análises de crescimento .....	20
2.5.    Análises fisiológicas.....	21
2.6.    Análises metabólicas .....	21
2.7.    Análise estatística.....	23
3.    Resultados .....	23
3.1.    Análises Fisiológicas.....	23
3.2.    Análise dos perfis metabólicos.....	26
3.3.    Análises de Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes .....	28
3.4.    Análise do perfil de lipídeos .....	37
3.5.    Correlação entre metabólitos e parâmetros fisiológicos .....	42
4.    Discussão .....	46
5.    Conclusões .....	52
6.    Referências citadas .....	53
Capítulo II - Efeitos da limitação nutricional por ureia e silicato de sódio em diatomáceas cultivadas em meios a base de água residuária .....	57
Resumo.....	57
Abstract .....	59
1.    Introdução .....	61

2.	Materiais e Métodos.....	63
2.1.	Água de efluente residuário utilizada no experimento.....	63
2.2.	Preparo do inóculo e condições de crescimento da cultura.....	64
2.3.	Delineamento Experimental.....	66
2.4.	Determinação das taxas de crescimento e produção de biomassa .....	68
2.5.	Extração e quantificação de proteínas totais .....	68
2.6.	Extração e quantificação de carboidratos neutros totais .....	68
2.7.	Extração e quantificação de lipídeos totais .....	69
2.8.	Análise de Perfil de Ácidos Graxos .....	69
3.	Resultados.....	71
4.	Discussão .....	79
5.	Conclusões .....	83
6.	Referências citadas .....	85
7.	Anexos .....	90
	CONCLUSÃO GERAL.....	92

## RESUMO

MACHADO, Mariana Fonseca, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Caracterização fisiológica e metabólica de diatomáceas cultivadas sob diferentes concentrações de silício e nitrogênio.** Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientadores: Márcio Arêdes Martins e Wagner Luiz Araújo.

A crescente busca por fontes alternativas de energia impulsiona as pesquisas ligadas a cadeia produtiva de biocombustíveis. Neste contexto, as microalgas podem ser utilizadas como fonte de biomassa alternativa às plantas terrestres. Entre os grupos de microalgas encontrados na natureza as diatomáceas têm recebido grande atenção devido ao acúmulo de lipídeos neutros e produção de lipídeos raros que muitas espécies deste grupo apresentam. Estudos recentes com diatomáceas têm demonstrado que estresses causados por deficiência nutricional podem estimular a biossíntese de lipídeos. O nitrogênio é um dos principais nutrientes cuja disponibilidade está relacionada com a biossíntese de lipídeos em microalgas. Entretanto, apesar dos efeitos positivos dessa limitação, os mecanismos que levam a reprogramação metabólica em face de limitação de N promovendo a biossíntese de lipídeos ainda são muito pouco conhecidos em diatomáceas. Assim, com intuito de estudar o comportamento de diatomáceas foi realizado um experimento utilizando duas cepas de diatomáceas do gênero *Nitzschia* sp. BR006 e BR022, cultivadas em meios com 0, 5, 26 e 107 mM de N utilizado no meio BG11, comumente utilizado no cultivo de microalgas. Após a instalação do experimento uma caracterização detalhada de parâmetros fisiológicos e análise metabolômica e lipidômica foi realizada nas fases de adaptação, logaritmica e estacionária. Posteriormente, análises multivariadas revelaram que diferenças metabólicas e fisiológicas entre as duas cepas. As maiores alterações foram encontradas entre o tratamento controle (107 mM de N) e no sem N para cada cepa. Nas células cultivadas sem N (0 mM de N) foram observadas diminuição da taxa de crescimento e das taxas fotossintéticas para ambas cepas, sendo que em BR006 foram encontradas

mais alterações. Foi constatado a diminuição de aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina, quando o cultivo foi realizado na ausência de N, assim como o aumento dos intermediários da via glicolítica e de intermediário do ciclo TCA. No metabolismo de lipídeos pode-se observar aumento de TAGs e diminuição dos lipídeos de membrana como MGDGs e DGDGs nos cultivos sem N. Deve-se ressaltar no entanto, que as alterações foram menos pronunciadas em BR022, evidenciando que esta cepa faz melhor reaproveitamento do N em situações de deficiência. Em um segundo experimento, objetivando o desenvolvimento de meios alternativos a base de água residuária da indústria petrolífera, duas cepas de diatomáceas, *Cyclotella* sp. BR021 e *Nitzschia* sp. BR022, foram cultivadas em meios com diferentes concentrações de ureia e silicato de sódio. Para encontrar as concentrações de uréia e silicato necessárias para maior crescimento e produção de lipídeos utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR). Observou-se que o silicato de sódio foi importante para o crescimento das duas cepas, sendo que em maiores concentrações deste nutriente foram obtidas as maiores quantidades de biomassa seca. Quanto a produção de lipídeos verificou-se diferentes respostas entre as duas cepas testadas. A BR021 apresentou maior produção de lipídeos em menores doses de N associadas a altas doses de silicato. Enquanto que BR022 não apresentou diferença significativa com as doses de ureia utilizadas e baixas doses de silicato estimularam o acúmulo de lipídeos. Tomados em conjunto podemos concluir que estresses nutricionais podem ser uma forma importante para estimular acúmulo de lipídeos, que são a matéria prima para produção de biodiesel. Ao mesmo tempo, os experimentos realizados sugerem que a água residuária pode ser utilizada como uma fonte viável de nutrientes para o cultivo de diatomáceas em escala industrial. Além de reduzir o custo a utilização de água de efluentes permite e dando um destino ecologicamente correto ao rejeito.

## ABSTRACT

MACHADO, Mariana Fonseca, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Metabolic and physiological characterization of diatoms cultured under different silicon and nitrogen concentration.** Advisor: Adriano Nunes Nesi. Co-Advisors: Márcio Arêdes Martins and Wagner Luiz Araújo.

Increasing search for energy source drives research related to biofuels production chain. In this context, microalgae are an alternative to terrestrial plant biomass source. Between microalgae groups found in nature diatoms have received great attention due to accumulation of neutral lipids present in many species. Recent studies have shown that diatoms stresses caused by nutritional deficiency stimulate lipids biosynthesis. Nitrogen is one of more important nutrient whose availability is related to the lipids biosynthesis in microalgae. However, despite positive impact of this limitation, mechanisms that lead to metabolic reprogramming in nitrogen starvation promoting lipids biosynthesis of are still poorly understood in diatoms. Thus, in order to study diatoms behavior an experiment was performed using two diatoms strains, *Nitzschia* sp. BR006 and *Nitzschia* sp. BR022, grown in media with 0, 5, 26 and 107 mM of nitrogen used in BG11 medium, commonly used in microalgae cultivation. After experiment a detailed characterization of physiological parameters, metabolomics and lipidomics analysis was performed on adaptation, logarithmic and stationary growth phase. Thereafter, multivariate analysis revealed that metabolic and physiological differences between two strains. The biggest changes were found between control treatment (100 mM N) and no nitrogen treatment for each strain. Growth rate and photosynthetic rates in starvation (0 mM N) decreased for both strains, and in BR006 more changes were found. The decrease branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine was found when strains was conducted in nitrogen absence, as well as increase of glycolytic pathway and TCA cycle intermediate. In lipid metabolism was observed an increase in TAG and decreased I membrane lipids as MGDGs and DGDGs in nitrogen starvation (0

mM de N). However, it should be noted that changes were less pronounced in BR022, indicating that this strain does best nitrogen recycling in deficiency situations. In a second experiment, aimed to developing alternative wastewater medium two diatoms strains, *Cyclotella* sp. BR021 and *Nitzschia* sp. BR022, with different concentrations of urea and sodium silicate were cultured. Order to find urea and silicate concentrations necessary for growth and lipids production used a rotatable central composite design (RCCD). It was observed that sodium silicate was important for growth of both strains and in higher nutrient concentration larger quantities of dry biomass were obtained. As lipids production found were different responses between the two strains tested. Strain BR021 showed higher lipids production in lower nitrogen levels associated with high silicate concentration. While BR022 showed no significant difference in urea levels low silicate concentration stimulated lipid accumulation. Taken together we can conclude that nutritional stress may be an important way to stimulate accumulation of lipids, which are feedstock for biodiesel production. At same time, experiments suggest that wastewater can be used as a viable source of nutrients for diatoms cultivation in an industrial scale. Besides reducing cultivation cost use of wastewater allows a correct ecologically destination reject.

## INTRODUÇÃO GERAL

A quantidade de CO<sub>2</sub> liberado por processos industriais e utilização de combustíveis fósseis tem aumentado. Uma vez que não tem ocorrido um aumento equivalente no sequestro de carbono, são observados aumentos dos níveis deste gás na atmosfera. Estima-se que o CO<sub>2</sub> liberado em um ano de consumo de combustíveis fósseis está acima de quatrocentas vezes a quantidade de carbono que pode ser fixado via produtividade primária (Fields et al., 2014). O aumento da produtividade primária juntamente com a diminuição do consumo de combustíveis fósseis pode amenizar a elevação dos níveis de CO<sub>2</sub>. Assim, torna-se cada vez mais necessária a utilização de combustíveis de fontes renováveis.

Dentre as fontes de matéria-prima para produção de biocombustíveis, as plantas vasculares tem sido as mais utilizadas (Yamabhai et al., 2014; Goldemberg, 2013). Apesar de ser uma fonte alternativa importante, existe a competição com o mercado alimentício, uma vez que necessitam de terras agriculturáveis (Chisti, 2007; Singh et al., 2011). Uma alternativa a utilização de plantas é o uso de microalgas para geração de biomassa. As microalgas tem elevada taxa fotossintética e consomem menos energia para seu crescimento do que as plantas o que permite que elas tenham um saldo final maior em carbono fixado por grama de biomassa (Chisti, 2007, Li et al., 2008). Esses microorganismos ainda possuem a vantagem de não competirem por terras agriculturáveis e poderem ser cultivados em águas residuárias, muitas vezes descartadas de forma incorreta no meio ambiente (Cai et al., 2013). Assim, a utilização de águas residuárias como meio de cultura para microalgas além de reduzir os custos de produção

dos meios de cultura, reduz a quantidade nutrientes liberados no meio ambiente (Devi et al., 2012; Pittman et al., 2011; Chinnasamy et al., 2010).

Dos vários grupos de microalgas existentes os phylum Bacillariophyta (diatomáceas) e Chlorophyta (algas verdes) ganham atenção devido ao elevado número de espécies estudadas. Estes microorganismos são eucariontes fototróficos que utilizam carbono inorgânico (como o  $\text{CO}_2$ ) e energia solar para realizar fotossíntese e gerar energia química que supram as necessidades de seu crescimento (Chisti, 2007).

As diatomáceas são um importante grupo no fitoplâncton, presentes tanto em água doce quanto em salgada, dominando em regiões ricas em nutrientes. Nos oceanos elas contribuem com cerca de 40 % da produtividade primária (Field et al., 1998; Nelson et al., 1995). A presença delas é de crucial importância no sistema marinho, do ponto de vista ecológico (Allen et al., 2006). Além de sua flexibilidade ecológica, elas tem um papel importante na ciclagem de carbono, nitrogênio (N), fósforo (P), silício (Si), ferro (Fe), além de elementos traço (Ashworth et al., 2013; Allen et al., 2006).

A elevada multiplicação celular de diatomáceas (florações) geralmente ocorrem em regiões em que as fontes de N são variáveis. Esses microorganismo possuem uma variedade de transportadores e enzimas (Allen et al., 2005, Armbrust et al., 2004) podendo utilizar tanto formas inorgânicas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) como orgânicas (ureia, aminoácidos) como fonte de N para o crescimento.

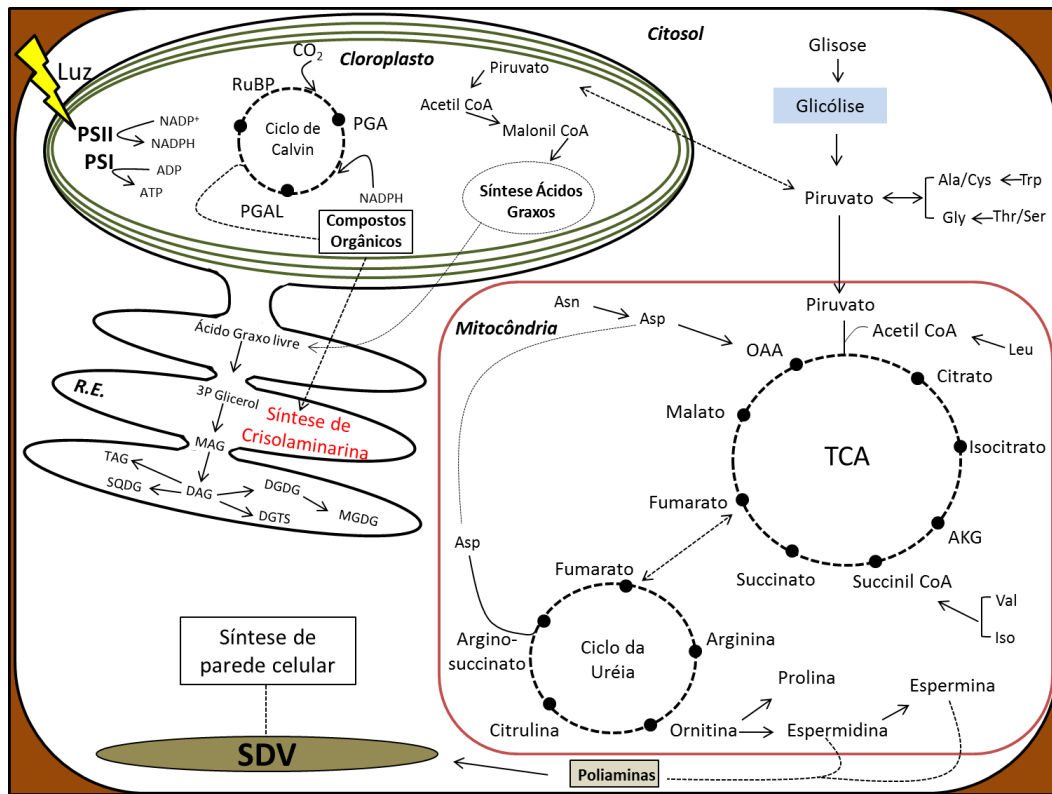
Pertencente ao grupo heterokontophyta, as diatomáceas apresentam diferenças evolucionárias do grupo das plantas. Organismos pertencentes aos grupos das plantas, Chlorophyta, Rhodophyta e Glaucophyta são organismos derivados de um evento de endossimbiose primária, no qual um organismo eucarionte e não fotossintético adquiriu

cloroplasto engolfando uma cianobactéria, organismo procarionte (Armbrust et al., 2010; Bowler et al., 2008; Armbrust et al., 2004). Enquanto isso, as diatomáceas derivaram de um evento de endossimbiose secundária, em que um eucarionte não fotossintetizante adquiriu um cloroplasto engolfando um eucarionte fotossintetizante, provavelmente uma Rhodophyta. Cada evento de endossimbiose levou a novas combinações de genes derivados dos hospedeiros e dos embossimbiontes (Falkowski et al., 2004; Armbrust et al., 2004).

Devido aos diferentes eventos que acompanharam a evolução das diatomáceas, os processos metabólicos encontrados nelas se diferenciaram das demais microalgas. Como exemplo, elas possuem o ciclo da ureia completo (Figura 1) (Allen et al., 2011; Armbrust et al., 2004). Esta rota metabólica foi previamente descrita somente em metazoários, sendo ela utilizada para eliminar excretas do sistema na forma uréia (Mommsen e Walsh, 1989). Nas diatomáceas, no entanto, esta rota funciona como um reaproveitamento de N, uma vez que elas possuem a enzima urease ativa e podem crescer utilizando a ureia como única fonte de N, caso necessário (Armbrust et al., 2004).

As diatomáceas acumulam principalmente crisolaminarina (1,3- $\beta$ -glicano) e triacilgliceróis como produtos de reservas, variando entre espécies a proporção destes componentes na célula (Armbrust et al., 2004; Yang et al., 2013). O acúmulo destas reservas também pode alterar devido a fatores ecofisiológicos, acumulando mais ou menos lipídeos e carboidratos (Palmucci et al., 2011). Alterações no metabolismo das diatomáceas podem ocorrer quando as células são submetidas a estresses causados por alterações no pH (Hervé et al., 2012), na temperatura (Chalifour e Juneau, 2011; Fukao

et al., 2012), na salinidade (Cheng et al., 2013), na disponibilidade de nutrientes (Fieldas et al., 2014), dentre outros (Moll et al., 2014; Chen et al., 2014). Em adição, estresses nutricionais causados pelo desbalanço de nutrientes como Fe (Allen et al., 2008), P (Yang et al., 2014), Si (Mock et al., 2008; Chaffin et al., 2011) e N (Frada et al., 2013) também têm proporcionado alterações em rotas metabólicas que alteram a biossíntese de lipídeos.



**Figura 1.** Representação esquemática simplificada das rotas do metabolismo de diatomáceas. Na figura observa-se a glicólise que acontece no citossol, o ciclo TCA e o ciclo da uréia que ocorrem na mitocôndria. No cloroplasto são visualizados a maquinaria fotossintética e a síntese de ácidos graxos. No retículo endoplasmático (RE) os ácidos graxos dão prosseguimento à síntese de lipídeos. Neste mesmo compartimento acontece a síntese de crisolaminarina. Na região próxima a membrana celular está localizada a membrana depositora de sílica (SDV), responsável pela síntese da parede celular. Abreviaturas: PGA, ácido-3-fosfoglicérico; PGAL, 3-fosfoglicetato; Ala, alanina; Cys, cisteína; Trp, triptofano; Gly, glicina; Thr, treonina; Ser, serina; Leu, leucina; Val, valina; Iso, isoleucina; TCA, ciclo dos ácidos tricarbóxicos; Asp, aspartato; Asn, asparagina; OAA, oxaloacetato; MAG, monoacilglicerol; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol, DGTS=diacilgliceriltrimetilhomoserina; MGDG=monogalactosildiacilglicerol; DGTS, diacilgliceriltrimetilhomoserina.

Estudos realizados com diatomáceas cultivadas em diferentes níveis de N têm sugerido que a ausência deste nutriente no meio de cultura promove o acúmulo de lipídeos de reserva e redução nas taxas de crescimento por meio de uma reprogramação metabólica (Yang, 2013). Na maioria dos casos a síntese de aminoácidos é diminuída e o metabolismo do carbono é direcionado para a síntese de lipídeos, em geral, triacilgliceróis (TAG) ou crisolaminarina (Palmucci et al., 2011).

Neste contexto, este trabalho buscou investigar aspectos metabólicos de diatomáceas submetidas a diferentes níveis de N, observando a relação entre fotossíntese, crescimento e metabolismo. Uma vez caracterizado o comportamento dessas diatomáceas, foi verificada a capacidade destes microorganismos crescerem em água residuária de refinaria de petróleo, sob diferentes concentrações de N e Si.

## REFERÊNCIAS CITADAS

Allen AE, Vardi A, Bowler C (2006) An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. **Current Opinion in Plant Biology** 9:264-273. doi:10.1016/j.pbi.2006.03.013

Allen AE, LaRoche J, Maheswari U, Lommer M, Schauer N, Lopez PJ, Finazzi G, Fernie AR, Bowler C (2008) Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105:10438-10443. doi:10.1073/pnas.0711370105

Allen AE, Dupont CL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR, Bowler C (2011) Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. **Nature** 473:203-207. doi:10.1038/nature10074.

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, et al. (2004) The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. **Science** 306:79-86. doi: 10.1126/science.1101156.

Armbrust EV (2010) The life of diatoms in the world's oceans. **Nature** 459:185-192. doi:10.1038/nature08057

Ashworth J, Coesel S, Lee A, Armbrust EV, Orellana MV, Baliga NS (2013) Genome-wide diel growth state transitions in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 30:7518-7523. doi:10.1073/pnas.1300962110

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, et al. (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature** 456:239-244. doi:10.1038/nature07410.

Cai T, Park SY, Li Y (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 19:360-369. doi: org/10.1016/j.rser.2012.11.030

Chaffin JD, Mishra S, Kuhaneck RM, Heckathorn SA, Bridgeman TB (2011) Environmental controls on growth and lipid content for the freshwater diatom, *Fragilaria capucina*: A candidate for biofuel production. **Journal of Applied Phycology** 24:1045-1051. doi 10.1007/s10811-011-9732-x.

Chalifour A, Juneau P (2011) Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. **Aquatic Toxicology** 103:9-17. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.016

Cheng J, Feng J, Sun J, Huang Y, Zhou J, Cen K (2014) Enhancing the lipid content of the diatom *Nitzschia* sp. by  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  irradiation mutation and high-salinity domestication. **Energy** (in press) DOI: 10.1016/j.energy.2014.06.009

Cheng RL, Feng J, Zhang BX, Huang Y, Cheng J, Zhang CX (2013) Transcriptome and gene expression analysis of an oleaginous diatom under different salinity conditions. **BioEnergy Research** 7:192-205. doi:10.1007/s12155-013-9360-1

Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt WH, Das KC (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology** 101:3097–3105. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.026.

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** 25:294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Devi MP, Subhash GV, Mohan SV (2012) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy** 43:276-283. doi: 10.1016/j.renene.2011.11.021.

Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJR (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. **Science** 305:354-360. doi:10.1126/science.1095964.

Fields MW, Hise A, Lohman EJ, Bell T, Gardner RD, et al. (2014) Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. doi:10.1007/s00253-014-5694-7

Frada MJ, Burrows EH, Wyman KD, Falkowski PG (2013) Quantum requirements for growth and fatty acid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) in nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Phycology**. 49:381-388. doi:10.1111/jpy.12046

Fukao T, Kimoto K, Kotani Y (2012) Effect of temperature on cell growth and production

of transparent exopolymer particles by the diatom *Coscinodiscus granii* isolated from marine mucilage. **Journal of Applied Phycology** 24:181-186. doi:10.1007/s10811-011-9666-3

Goldemberg J (2013) Sugarcane ethanol: strategies to a successful program in Brazil. In:

Lee JW (ed.). **Advanced Biofuels and Bioproducts**, Springer - New York, USA. doi: 10.1007/978-14614-3348-4\_2

Hervé V, Derr J, Douady S, Quinet M, Moisan L, Lopez PJ (2012) Multiparametric analyses reveal the pH-dependence of silicon biomineralization in diatoms. **Plos One** 7:e46722. doi:10.1371/journal.pone.0046722

Li Q, Du W, Li D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology** 80:749-756. doi: 10.1007/s00253-008-1625-9

Mock T, Samanta MP, Iverson V, Berthiaume C, Robinson M, et al. (2008) Whole-genome expression profiling of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* identifies genes involved in silicon bioprocesses. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105:1579-84. doi:10.1073/pnas.0707946105

Moll KM, Gardner RD, Eustance EO, Gerlach R, Peyton BM (2014) Combining multiple nutrient stresses and bicarbonate addition to promote lipid accumulation in the diatom RGD-1. **Algal Research** 5:7–15 DOI: 10.1016/j.algal.2014.04.002

Mommsen TP, Walsh PJ (1989) Evolution of urea synthesis in vertebrates: the piscine connection. **Science** 243:72–75. doi:10.1126/science.2563172

Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Quéguiner B. (1995) Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. **Global Biogeochemical Cycle** 9: 359-372.

Palmucci M, Ratti S, Giordano M (2011) Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: A fourier transform infrared spectroscopy approach. **Journal of Phycology** 47:313-323. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x

Pittman JK, Dean AD, Osundeko O (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology** 102:17-25. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.035.

Singh A, Nigam SP, Murphy JD (2011) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. **Bioresource Technology** 102:10-16. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.032.

Yamabhai M, Sak-Ubol S, Srila W, Haltrich D (2014) Mannan biotechnology: from biofuels to health. **Critical Reviews in Biotechnology** 15:1-11. doi:10.3109/07388551.2014.923372.

Yang ZK, Niu YF, Ma YH, Xue J, Zhang MH, Yang WD, Liu JS, Lu SH, Guan Y, Li H (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. **Biotechnology for Biofuels**, 6:67. doi:10.1186/1754-6834-6-67

Yang ZK, Ma YH, Zheng JW, Yang WD, Liu JS, & Li HY (2014) Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Applied Phycology** 26:73-82. doi 10.1007/s10811-013-0050-3

## **Capítulo I - Caracterização fisiológica e metabólica de cepas de diatomáceas cultivadas sob diferentes níveis de nitrogênio**

### **Resumo**

As microalgas podem ser utilizadas como fonte de biomassa alternativa às plantas terrestres. Entre os grupos de microalgas encontrados na natureza, as diatomáceas têm recebido grande atenção, devido ao acúmulo de lipídeos neutros e produção de lipídeos raros que muitas espécies deste grupo apresentam. Estudos recentes com diatomáceas têm demonstrado que estresses causados por deficiência nutricional podem estimular a biossíntese de lipídeos. O nitrogênio é um dos principais nutrientes cuja disponibilidade esta relacionada com a biossíntese de lipídeos em microalgas. Entretanto, apesar dos efeitos positivos dessa limitação, os mecanismos que levam a reprogramação metabólica em resposta a limitação de N, promovendo a biossíntese de lipídeos, ainda são muito pouco conhecidos em diatomáceas. Assim, com intuito de investigar o comportamento de diatomáceas um experimento utilizando duas cepas de diatomáceas do gênero *Nitzschia* BR006 e BR022, cultivadas em meios com 0, 5, 26 e 107 mM do N utilizado no meio BG11, comumente utilizado no cultivo de microalgas. Após a instalação do experimento uma caracterização detalhada de parâmetros fisiológicos e análise metabolômica e lipidômica foi realizada nas fases de adaptação (LAG), logaritmica (LOG) e estacionária (STA). Posteriormente, análises multivariadas revelaram que diferenças metabólicas e fisiológicas entre as duas cepas. Na fase LOG foram encontradas as maiores correlações entre metabólitos, crescimento e fotossíntese para as duas cepas. As maiores alterações foram encontradas entre o tratamento controle (107

mM de N) e no sem N para cada cepa. Nas células cultivadas sem N (0 mM) foram observadas diminuição da taxa de crescimento e das taxas fotossintéticas para ambas cepas, sendo que em BR006 foram encontradas mais alterações. Foi constatado a diminuição de aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina, quando o cultivo foi realizado na ausência de N, assim como foi observado aumento dos intermediários da via glicolítica e de intermediários do ciclo TCA. Em relação ao metabolismo de lipídeos pode-se observar aumento de TAGs e diminuição dos lipídeos de membrana como MGDGs e DGDGs nos cultivos sem N. Deve-se ressaltar no entanto, que as alterações foram menos pronunciadas em BR022, evidenciando que esta cepa faz melhor reaproveitamento do N em situações de deficiência. Associando todos os dados, conclui-se que as duas cepas reprogramaram o metabolismo quando cultivadas na ausência de N, diminuindo as taxas fotossintéticas, ativando a via glicolítica e ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Ademais, foi observado o acúmulo de lipídeos de reserva e diminuição dos lipídeos de membrana do tilacóide. De modo geral, pode-se concluir que na ausência de nitrogênio existe uma reprogramação no metabolismo das cepas de diatomáceas. Além disso, esta alteração que ocorre no metabolismo acontece de forma diferente entre as cepas estudadas, sendo que BR006 mais sensível a limitação nitrogenada, enquanto que BR022 parece ter melhor regulação da homeostase durante o estresse.

## **Chapter I - Physiological and Metabolic characterization of diatoms strains grown under different nitrogen levels**

### **Abstract**

Microalgae can be used as a biomass alternative source to terrestrial plants. Between groups of microalgae found in nature diatoms have received great attention due to accumulation of neutral lipids and rare lipids production. Recent studies have shown that stresses caused by nutritional deficiency in diatoms stimulates lipids biosynthesis. Nitrogen is a major nutrient whose availability is related to lipids biosynthesis in microalgae. However, despite positive impact of this limitation, mechanisms that lead to metabolic reprogramming in nitrogen limitation promoting lipids biosynthesis are still understudied in diatoms. Thus, in order to study diatoms behavior experiment using two *Nitzschia* strains BR006 and BR022, grown in media with 0, 5, 25 and 100% of nitrate used in BG11 medium, commonly used in microalgae cultivation. After the experiment, it was a detailed characterization of physiological parameters, metabolomics and lipidomics analysis was performed on stages of adaptation (LAG), logarithmic (LOG) and stationary (STA). Thereafter, multivariate analysis revealed that metabolic and physiological differences between two diatoms strains. LOG phase had highest correlations between metabolites, growth and photosynthesis for the two strains were found. Biggest changes were found between control treatment (100% N) and treatment with nitrogen for each strain. In cells grown without nitrogen (0% N) were observed growth and photosynthetic rate decreased for both strains, and in BR006 more changes were found. The decrease in branched chain amino acids, leucine, isoleucine and valine was found when strains was conducted in absence of nitrogen, as well as the increase of

intermediates of glycolytic pathway and the TCA cycle intermediate was observed. In lipid metabolism it was observed a TAGs increase and decreased in lipids membrane as MGDGs and DGDGs in cultures without nitrogen. However, it should be noted that changes were less pronounced in BR022, indicating that this strain does best recycling of nitrogen deficiency situations. Combining all data, it was possible to conclude that two strains metabolism were reprogrammed when cultured in medium without nitrogen, decreasing photosynthetic rates, activating glycolytic pathway and citric acid cycle. Moreover, lipid reserves accumulation and thylakoid membrane lipids reduction was observed. In general, it can be concluded that in N starvation there is a reprogramming of diatoms strains metabolism. In addition, this alteration in metabolism occurs differently among the strains studied, with BR006 more sensitive to nitrogen limitation, while BR022 seems has better regulation of homeostasis during stress.

## **Capítulo I - Caracterização fisiológica e metabólica de duas cepas de *Nitzschia* cultivadas sob diferentes níveis de nitrogênio**

### **1. Introdução**

O interesse nos combustíveis renováveis tem aumentado nos últimos anos devido a instabilidade do preço do petróleo e as alterações climáticas causadas pelo aumento dos gases na atmosfera, levando ao efeito estufa (Ahmad et al., 2011). Dentre os biocombustíveis existentes no mercado, o biodiesel tem se mostrado promissor por apresentar características físico-químicas semelhantes as do diesel, o que facilita sua mistura ou mesmo substituição ao combustível de petróleo (Knoth et al., 2005), como já é realizado em grandes centros urbanos em todo mundo.

Como fonte de óleo, para a produção de biocombustíveis, o cultivo de microalgas têm se mostrado como uma estratégia competitiva, quando comparadas as espécies vegetais oleaginosas, tradicionalmente utilizadas para a produção de energia. Sua eficiência fotossintética acoplada a um rápido crescimento e produção de biomassa em curto intervalo de tempo (Feng et al., 2011), tornam esses organismos interessantes fontes de lipídeos para a produção de biocombustíveis (Chisti, 2007; Li et al., 2008; Mata et al., 2010).

Dentre os diferentes grupos de microalgas, as diatomáceas (phylum Bacillariophyta) têm-se destacado como promissoras fontes de óleo, uma vez que acumulam carbono principalmente na forma de lipídeos (Nurachman et al., 2012; Obata et al., 2013). Em adição, acredita-se que as diatomáceas representem uma das classes com maior produtividade primária oceânica, sendo responsáveis por cerca de 40% da produtividade primária dos oceanos (Field et al., 1998; Nelson et al., 1995).

Os lipídeos são os metabólitos mais abundantes nas diatomáceas, sendo compostos por lipídeos neutros, polares e traços de esterol (Chen, 2012). Dentre estes, os lipídeos neutros representam a classe mais abundante, podendo representar 60 % dos lipídeos totais de uma célula. Nesta classe, encontram-se os triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs) e monoacilgliceróis (MAGs) (Chen, 2012).

O conteúdo total e os tipos de lipídeos podem variar de acordo com a espécie, condições ambientais, estado nutricional e, bem como, o estágio de desenvolvimento da microalga (Graham et al., 2011; Chen, 2012; Hildebrand et al., 2012; Su et al., 2013). Os TAGs em algumas diatomáceas, por exemplo, apresentam um acúmulo pronunciado durante a fase estacionária em comparação com as demais fases de crescimento (Su et al., 2013). Isto sugere que a biossíntese de lipídeos de reserva em microalgas possa ser regulada diferencialmente nas diferentes fases de crescimento (Graham et al., 2011; Su et al., 2013).

A disponibilidade de nutrientes é outro fator que interfere na produção e acúmulo de lipídeos (Lombardi e Wangersky, 1991; Obata et al., 2013). Chaffin et al. (2011) relataram que o teor lipídico encontrado em *Fragilaria capucina* pode ser alterado conforme as doses de silício (Si) e nitrogênio (N) utilizadas no meio de cultura. Em *Talassiosira pseudonana* o teor lipídico aumentou 1,4 vezes quando estas células foram transferidas do meio repleto de N para meio sem N durante quatro dias (Jiang et al., 2012). No trabalho de Adams e Bugbee (2013), foi relatado que a produção de lipídeos totais aumentou 50 % em *Chaetoceros gracilis* quando cultivada com baixa concentração de Si. Acredita-se que estímulos a maiores acúmulos de lipídeos são produzidos quando as células são privadas destes elementos. No entanto, apesar dos

claros efeitos dos estresses nutricionais sobre a produção lipídica total, a regulação das rotas de biossíntese de lipídeos em células de microalgas em respostas a condições de estresse ainda não foram estudadas em detalhes (Obata et al., 2013).

A síntese lipídica acontece primariamente no cloroplasto produzindo ácidos graxos de dezesseis e dezoito carbonos. Esses compostos são os precursores de outros tipos lipídicos, como os lipídeos de membrana e também lipídeos neutros que são usados como fonte de reserva (Hu et al., 2008). O próximo passo na rota de síntese lipídica é a produção de Acetil coenzimaA (AcCoA). Este metabólito também está relacionado ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA), sendo responsável pela geração de intermediários para a síntese de proteínas (Frada et al., 2013; Guerra et al., 2013). No entanto, sob condições de deficiência de N o comportamento desta rota metabólica pode favorecer a síntese de lipídeos, e principalmente acúmulo de TAGs (Yang et al., 2013; Obata et al., 2013).

A habilidade de acumular TAGs faz com que as diatomáceas sejam visadas para a indústria de biocombustíveis. Os TAGs são utilizados na produção do biodiesel, por meio de uma reação denominada transesterificação (Popovich et al., 2012), que ocorre entre esse lipídeo e um álcool de cadeia curta (Schuchardt et al., 1998) formando ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), o principal componente do biodiesel.

Além dos lipídeos neutros, são encontrados lipídeos não polares que são componentes estruturais das membranas das células, como os glicosilglicerídeos monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG) presentes nas membranas do cloroplasto (Guschina e Harwood, 2013). Em situações de limitação de nutrientes (ex., N) foi observado a mobilização de MGDG e DGDG (Yang et al., 2013)

com consequente aumento dos TAGs, a partir da degradação das membranas dos tilacóides (Yang et al., 2013).

A compreensão do metabolismo de lipídeos e seu papel na ecologia de microalgas são essenciais para estratégias de cultivo que objetivam potencializar o uso de microalgas para produção de biocombustíveis. Pouco se conhece acerca do comportamento das diatomáceas relacionando metabólitos (tanto metabólitos primários como lipídeos) e parâmetros fisiológicos durante limitação por N. Informações sobre como extensão ocorre acúmulo de reserva nas fases de crescimento e como estresse por limitação nitrogenada age no metabolismo são necessárias para entender o sucesso ecológico destas microalgas. Desta forma, neste trabalho investigaram-se alterações metabólicas e sua relação com a fotossíntese e crescimento celular decorrentes da limitação de N, com ênfase ao metabolismo de lipídeos das cepas de diatomáceas BR006 e BR022.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Obtenção, seleção e manutenção das cepas**

As amostras de água foram coletas em diferentes lagoas artificiais do município de Viçosa – MG, e também da Universidade Federal de Viçosa (UFV), utilizando-se rede de fitoplâncton com abertura de malha igual a 20 µm, em arrastes verticais e horizontais, sendo as mesmas acondicionadas em frascos de vidro com tampas herméticas. Também foram coletados substratos em que poderiam haver espécies perifíticas. O material foi

levado para laboratório de Ficolologia da UFV e enriquecido com meio BG11 (Andersen, 2005) com adição de  $0,6 \text{ g L}^{-1}$  silicato sódio.

O isolamento das cepas foi realizado aplicando-se os métodos de micropipetagem e diluição (Lourenço, 2006), cuja finalidade é a obtenção de culturas monoespecíficas. A identificação de gêneros foi baseada em caracteres morfológicos de acordo com a chave de identificação (Bicudo e Menezes, 2006; Shubert, 2003 e Huber-Pestalozzi, 1983).

As duas cepas que apresentaram maiores taxas de crescimento e adaptação as condições de cultivo artificial foram selecionadas para este trabalho (*Nitzschia* sp. BR006 e BR022). As culturas foram mantidas em meio BG11, em sala de cultivo em mesa de agitação orbital, sob condições fotoautotróficas de crescimento, temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16:8 h de luz:escuro e irradiância média de  $100 \mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

## **2.2. Condições de cultivo e tratamentos aplicados**

Para realizar os experimentos foram feitos cultivos em batelada a partir de culturas em fase estacionária. As diatomáceas foram cultivadas em Erlenmeyers, com capacidade de 250 mL em sala de cultivo sob as condições mencionadas no item anterior. O experimento foi conduzido até o final da fase estacionária, que ocorreu 15 dias após o início do cultivo. Antes da adição das doses de N (na forma de nitrato de sódio) os cultivos foram centrifugados e o precipitado lavado com meio sem N, e ressuspensos em meio BG11 com adição de  $0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SiO}_3$ , sem N por 12 horas antes do início do experimento (Liu et al., 2013).

Para investigar os efeitos das diferentes concentrações de N, quatro tratamentos foram delineados, com diferentes concentrações iniciais de NaNO<sub>3</sub> em relação a concentração de nitrato presente no meio BG11. Foram elas: sem N (0 % em relação ao meio BG11); 5 mM (5 % em relação ao meio BG11), 26 mM (25 % em relação ao meio BG11); 107 mM (100 % em relação ao meio BG11). Além disso, foram adicionados macro e micronutrientes baseados nas concentrações do meio de cultura BG11 (Andersen, 2005), com adição de 0,6 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, dose estabelecida em experimentos preliminares.

### 2.3. Coleta de amostras e análises bioquímicas

Para avaliar as diferenças entre as fases de crescimento foram estabelecidos pontos nas curvas de crescimentos de cada tratamento para cada uma das cepas que determinassem as fases de adaptação (LAG), logarítmica (LOG) e estacionária (STA). A partir destes dados foram estabelecidos dias para realizar as coletas para análises de crescimento, fisiológicas e de metabolismo primário e de lipídeos (Tabela 1).

Tabela 1 – Períodos em que foram realizadas as coletas para análises de fotossíntese e para análise de metabólitos nas três fases de crescimento e nas quatro condições de cultivo

Fase de crescimento	Período da coleta (horas a partir do início do cultivo)			
	Concentração de N (mM)			
	0	5	26	107
LAG	12	12	12	12
LOG	48	48	48	72
STA	72	120	144	144

Deve-se salientar que nos experimentos preliminares foi observado que os tratamentos sem N (0 mM N) não tiveram um padrão de crescimento com fases bem

definidas. Desta forma, optou-se por denominar por fases LAG, LOG e STA fazendo referência a horas passadas a partir do período sem N na cultura (Tabela 1).

#### 2.4. Análises de crescimento

O monitoramento das fases de crescimento foi realizado diariamente a partir de contagem do número de células em câmara de Neubauer utilizando um microscópio Olympus, com a qual curvas de crescimento para cada cultivo foram construídas (Figura 1). A partir dos dados obtidos nas curvas de crescimento foram calculadas as taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) para cada fase, por meio das equações 1, 2 e 3. Para isso, foram ajustadas regressões lineares e não lineares logísticas para cada tratamento utilizando o software R (Fox e Weisberg, 2010). O modelo que apresentou melhor ajuste foi escolhido para fazer o cálculo da curva. Para as fases de crescimento LOG e STA foi utilizada a equação 1.

$$\mu = \frac{(\ln x_2 - \ln x_1)}{T_2 - T_1} \quad (1)$$

em que,

$\mu$  é a taxa de crescimento,  $x_1$  é o número de células,  $x_2$  é o número de células no final,  $T_1$  é o tempo inicial e  $T_2$  é o tempo final.

A fase LAG foi calculada conforme Monod (1949), em que calcula-se uma constante que é definida como tempo LAG ( $T_i$ ).  $T_i$  é definida como a diferença do tempo observado ( $t_r$ ) quando a cultura alcança certa densidade celular ( $x_r$ ) que deve ser escolhido dentro da fase exponencial, e o tempo “ideal” no qual a mesma densidade celular será alcançada ( $t_i$ ), tendo como base a taxa de crescimento exponencial prevalescesse desde o início do crescimento, sem nenhum tempo LAG  $T_i = t_r - t_i$ , ou:

$$Ti = tr - \frac{\ln xr - \ln x0}{\mu} \quad (2)$$

A constante definida é apenas significativa quando as culturas a serem comparadas possuem a mesma taxa de crescimento exponencial. Uma definição mais geral de uma constante LAG deve ser baseada em taxas fisiológicas do que em tempo absoluto. Desta forma, outra constante pode ser chamada crescimento LAG (L) e pode ser definida como,

$$L = Ti \cdot \mu \quad (3)$$

## 2.5. Análises fisiológicas

Coletas de amostras (2 mL) de cultivo nas fases de crescimento LAG, LOG e STA. A partir destas amostras foram realizadas medidas de evolução de oxigênio em eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Oxy-Lab, Hansatech). As amostras permaneceram 20 minutos em ambiente escuro para remover efeitos residuais de exposição a luz. As curvas de luz foram feitas a partir das intensidades luminosas 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 400, 500  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que foram sendo alteradas a cada 2 minutos. A temperatura foi mantida a 25 °C e utilizou-se luz vermelha (LED vermelho com  $650 \pm 25 \text{ nm}$ ). Os valores obtidos foram normalizados por número de células. As curvas de luz geradas foram ajustadas conforme modelo de hipérbole não retangular (Henley, 1993). A partir dos dados gerados pela curva de luz foram estimados os parâmetros respiração no escuro ( $R_{\text{dark}}$ ) e taxa de assimilação máxima ( $A_{\text{max}}$ ).

## 2.6. Análises metabólicas

A fim de avaliar as respostas geradas pelo estresse nutricional nestas diatomáceas foram coletadas amostras nas diferentes fases de crescimento para análises

de perfil metabólico. Para isso, amostras de cultivo de diatomáceas foram rapidamente filtradas em membrana de nitrocelulose, com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ , e rapidamente acondicionadas em tubos criogênicos e congeladas em N líquido. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer até o momento da extração.

A extração dos metabólitos foi realizada conforme protocolo estabelecido por Giavalisco et al. (2011) e adaptado por Bromke et al. (2013). Posteriormente a extração, amostras da fase polar foram secas em centrifuga a vácuo e na sequência derivatizadas antes da injeção em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-TOF-EM; Leco3 TOF Pegasus), exatamente como descrito por Lisec et al. (2006).

Os cromatogramas gerados pelo CG-TOF-EM foram exportados do programa Leco ChromaTof (versão 3.25) para o programa R. A identificação e quantificação dos metabólitos foi realizada conforme descrito por Cuadros Inostroza et al. (2009). Os valores relativos de cada metabólito foram calculados dividindo a intensidade do pico referente ao metabólito pela intensidade do pico do padrão interno (Ribitol). O resultado foi dividido pelo número de células em cada amostra e então dividido pela mediana da fase LAG.

Para a análise de metabólitos da fase apolar utilizou-se cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (LC-EM; Thermo-Fisher, Alemanha) conforme descrito por Giavalisco et al. (2011). Os cromatogramas e os espectros de massa foram analisados exatamente como descrito por Giavalisco et al. (2011). Os dados foram normalizados por número de células da amostra e a mediana da fase LAG correspondente ao metabólito.

## **2.7. Análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento blocos casualizados (DIC), sendo realizadas 4 repetições para cada tratamento.

A fim de fazer uma observação do comportamento geral dos dados, foi realizada análise de componentes principais (PCA) (Worley and Powers, 2013), e para uma melhor separação entre os grupo foi feita uma análise de projeções ortogonais de estruturas latentes (OPLS e O2PLS; Szymanski et al., 2014; Tapp e Kemsley, 2009) com todos os dados de metabólitos primários e de lipídeos. Para estas análises foi utilizado o software R.

Para metabólitos que foram analisados separadamente assim como parâmetros de crescimento e fotossíntese foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste t, fazendo comparações dentro de cada fase de crescimento com o controle da respectiva fase (107 mM de N).

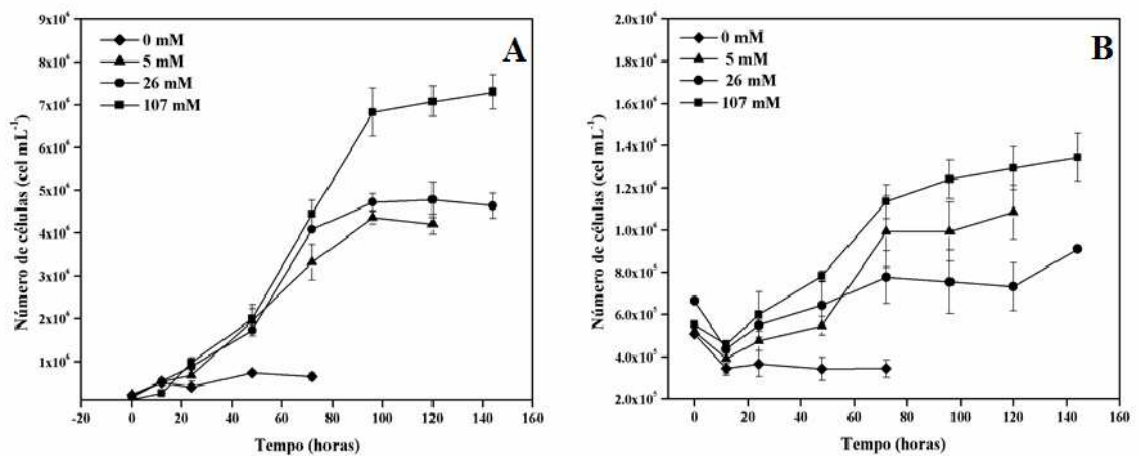
Além disso, para observar as relações existentes entre todos os parâmetros analisados (dados de crescimentos, fotossintéticos, metabolismo primário e metabolismo secundário) foram realizadas matrizes correlações de Pearson com probabilidade de 5 %, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows (Microsoft), GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA.

## **3. Resultados**

### **3.1. Análises Fisiológicas**

Acompanhando as fases de crescimento para cada cepa nos diferentes tratamentos pode-se observar diferenças no número de células nas concentrações de N e

entre as diatomáceas BR006 e BR022 (Figura 1). A cepa BR006 teve um aumento de 8 vezes no número de células no tratamento repleto de N (107 mM) enquanto a cepa BR022 teve um aumento de 6 vezes no mesmo tratamento em relação ao tratamento sem N. Na curva de crescimento da BR022 observou-se uma queda entre o momento de inoculação e as 12 horas seguintes, sendo o crescimento reestabelecido após as 24 horas, exceto para as células cultivadas com 0 mM de N que mantiveram seu número.

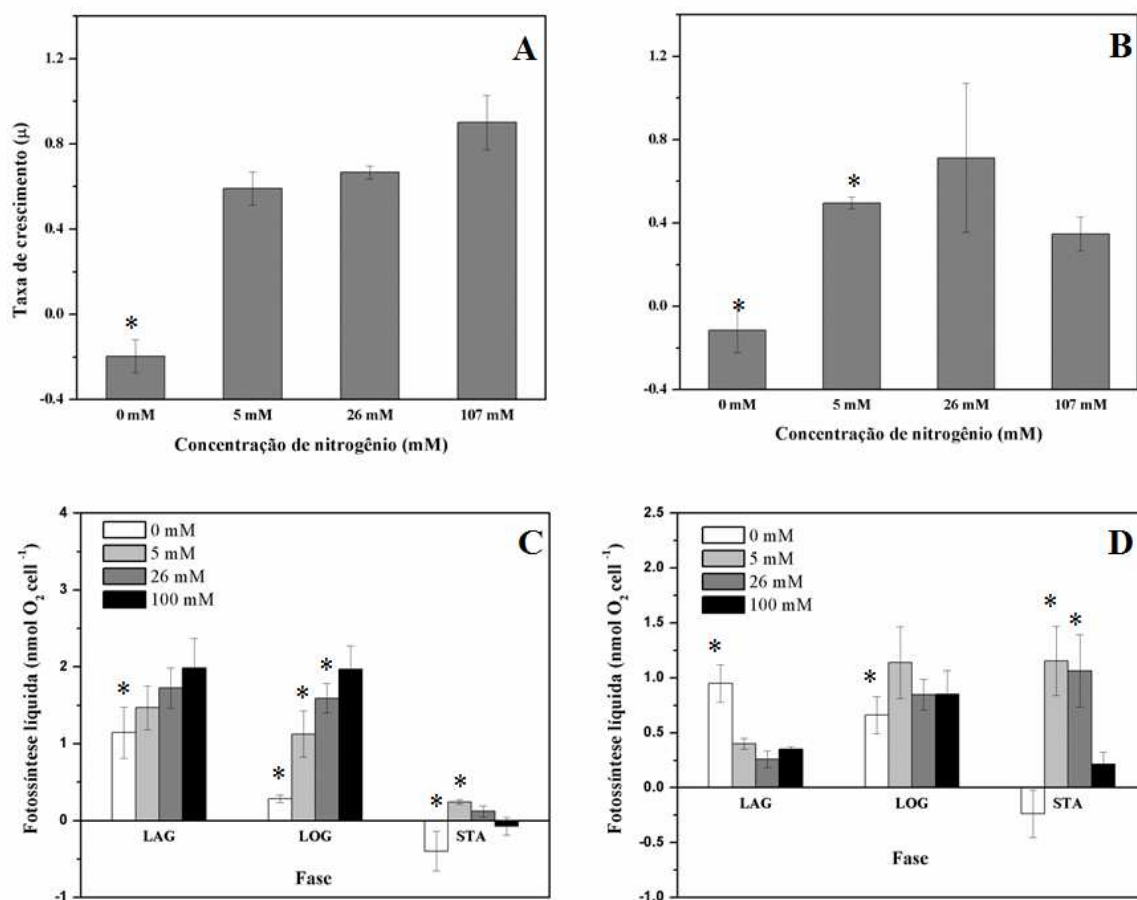


**Figura 1.** Curvas de crescimento das cepas (A) BR006 e (B) BR022 cultivadas em diferentes concentrações de nitrato de sódio, 0, 5, 26 e 107 mM em relação ao meio BG11.

Uma vez que a privação de nutrientes pode causar danos no aparato fotossintético, foram realizadas análises para verificar a atividade fotossintética das cepas nos diferentes tratamentos. A cepa BR006 apresentou maior número de células, sendo também constatado maiores valores de taxa fotossintética desta cepa, chegando a produzir 2,8 nmol O<sub>2</sub> cel<sup>-1</sup> no tratamento de 107 mM de N (Figura 2C). Para BR006 houve uma tendência de aumento das taxas fotossintéticas nas fases LAG e LOG aumentos nas doses de N. Já para a cepa BR022 a fotossíntese não diferiu entre as concentrações de N de 5, 26 e 107 mM na fase LAG e LOG. Entretanto, como esperado,

a ausência de N foi o único tratamento no qual foram observadas diferenças, sendo que nos demais tratamentos a cepa manteve a mesma taxa fotossintética ( $0,8 \text{ nmol O}_2 \text{ cel}^{-1}$ ) (Figura 2D). As duas cepas apresentaram menores taxas fotossintéticas na fase estacionária em relação a fase LOG com 107 mM de N. Na fase LOG, quando comparamos os tratamentos de 107 mM e de 0 mM de N para cada uma das cepas é possível notar que enquanto BR006 teve uma redução de 24 vezes na taxa fotossintética, em BR022 a redução foi de 7 vezes (Figuras 2C e 2D). Na concentração de 5 e 26 mM de N foram observadas maiores taxas fotossintéticas na fase STA comparando-se com os resultados para 100 mM de N na mesma fase. Um possível explicação para tal fato pode ser o autosombreamento causado pelo aumento do número de células no tratamentos de 107 mM.

Outra forma de avaliar as respostas das células a limitação de N é por meio da taxa de crescimento. Na cepa BR006 e BR022 os tratamentos na fase LAG apresentaram taxas de crescimento negativas, provavelmente devido a morte celular no período de adaptação (Figura 2A e 2B). As taxas de crescimento nas fases LOG dos tratamentos para as duas cepas foi alta com diminuição na fase estacionária. No tratamento com 0 mM de N, a cepa BR022 apresentou queda de crescimento em LOG e STA em relação a fase LAG, ao contrário de BR006 que exibiu leve incremento nas taxas de crescimento em LOG e STA em relação a LAG (Figuras 2B e 2A, respectivamente).



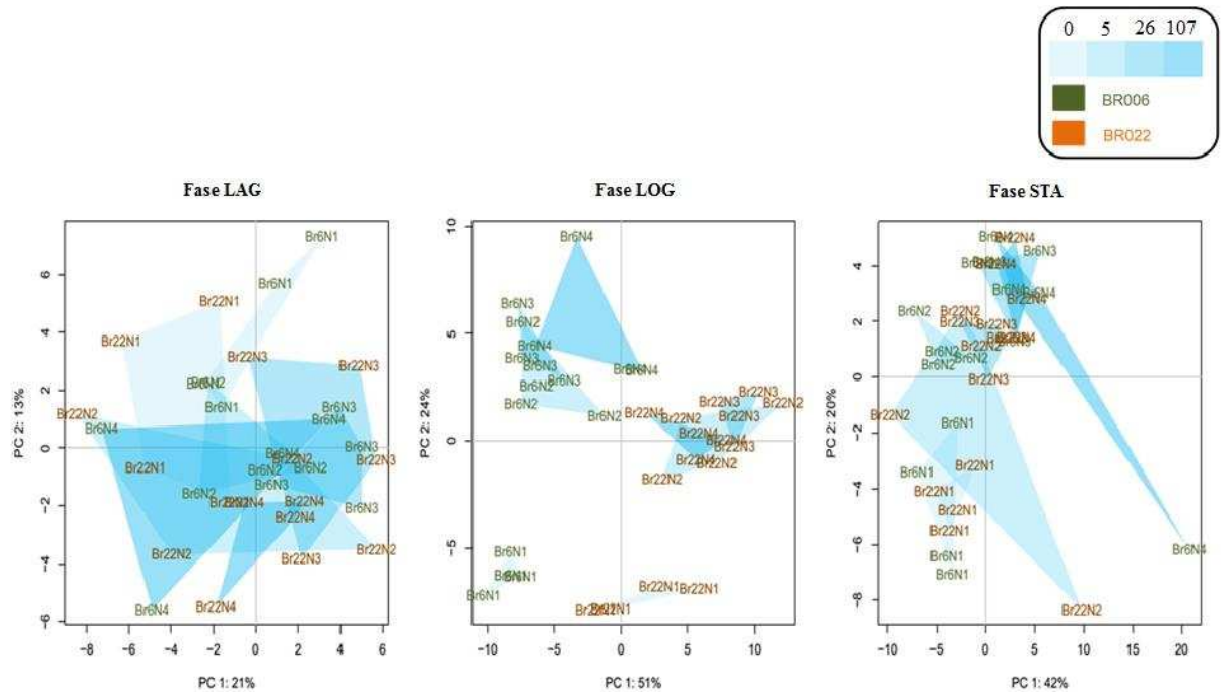
**Figura 2.** Taxa de crescimento ( $\mu$ ) e fotossíntese líquida (A) apresentados pelas cepas BR006 (A e C, respectivamente) e BR022 (B e D, respectivamente) cultivadas em quatro concentrações de nitrato de sódio, 0, 5, 26 e 107 mM. A fotossíntese líquida foi avaliada nas três fases de crescimento LAG, LOG e STA, enquanto que a taxa de crescimento apenas na fase LOG. Os valores referem-se a média de quatro repetições  $\pm$  desvio padrão. Foi realizado teste t ( $p$ , 0,05), comparando-se com o a concentração de 107 mM de N para cada fase. Os dados foram normalizados pela mediana da fase LAG. Abreviaturas: LAG, fase lag; LOG, fase logarítmica; STA, fase estacionária.

### 3.2. Análise dos perfis metabólicos

Para análise de metabolismo foram coletadas amostras nas diferentes fases de crescimento, assim como foi realizado para os parâmetros fisiológicos. Análises de CG-EM detectaram 90 metabólitos primários, sendo em sua grande parte representados por

aminoácidos (18), açúcares (5), açúcares fosfatados (11) ácidos orgânicos (15) e ácidos graxos (7) dentre outros.

Na fase LAG não foi observada a formação de diferentes grupos, o que era esperado uma vez que todos os dados foram normalizados pelos valores obtidos nesta fase (Figura 3). Entretanto, na fase LOG dois grandes grupos foram formados, os quais são separados pela componente 1 (PC1) indicando uma clara separação das duas cepas, BR006 e BR022. Além disso, a componente 1 também promoveu uma separação de grupos para a cepa BR006. O grupo formado pelos metabólitos provenientes do tratamento 107 mM de N pode ser destacado dos tratamentos de 5 mM e 26 mM de N. Por outro ângulo a componente 2 (PC2) consegue separar aqueles grupos que estão sob alta limitação de N (0 mM do nutriente). A análise de PCA permitiu distinguir os tratamentos com limitação de N em um único grupo para as duas cepas em fase estacionária. Este resultado sugere que alterações causadas no metabolismo primário devido a ausência de N tiveram um comportamento similar nesta fase de crescimento. A comparação entre as duas cepas de diatomáceas sugere que BR006 tende a formar grupos com as diferentes doses de N, o que não é muito claro para a cepa BR022, que separa apenas o tratamento com 0 mM de N dos demais (Figura 3).



**Figura 3.** Análise de componentes principais de metabólitos primários realizada com todos os tratamentos aplicados em duas cepas de diatomáceas, BR006 e BR022. Tratamentos indicados em verde e marrom representam as cepas BR006 e BR022, respectivamente. As formas geométricas mostradas em azul com diferentes tonalidades representam diferentes concentrações de nitrato de sódio, conforme a legenda de cores. As denominação Br6N e Br22N equivalem a BR006 e BR022, respectivamente. Os números representam as concentrações de N (1, 2, 3 e 4 equivalem a 0, 5, 26 e 107 mM de N).

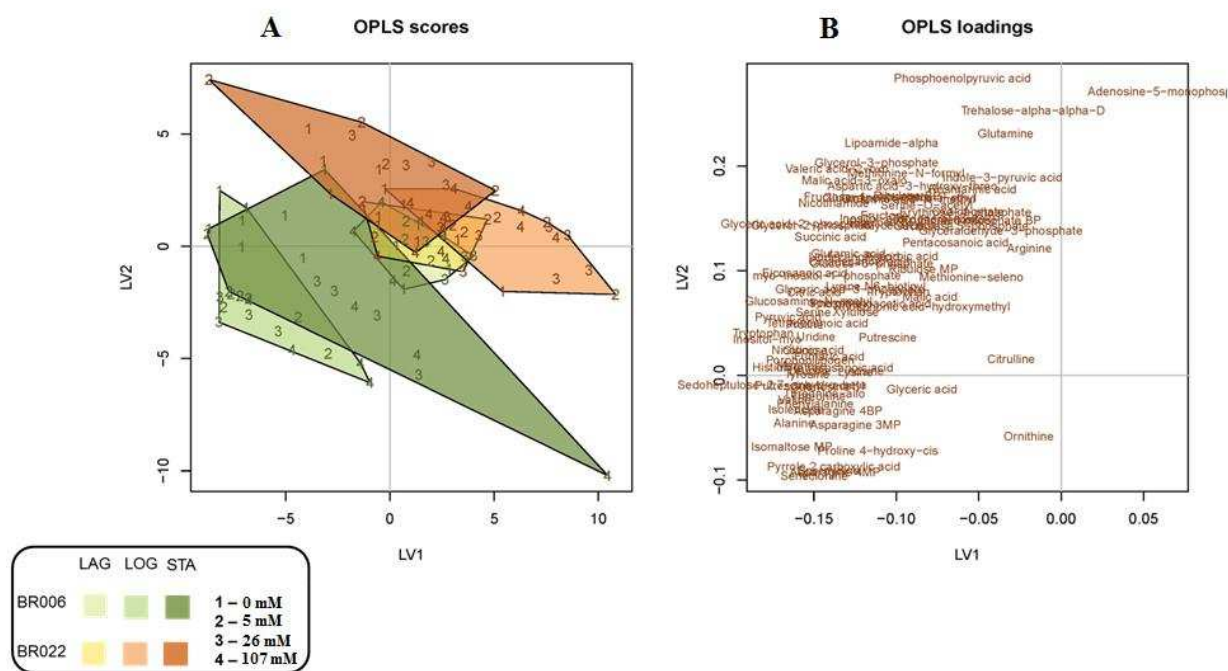
### 3.3. Análises de Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes

Apesar da análise de componentes principais permitir a separação de alguns grupos, buscou-se outras análises multivariadas que pudessem fazer uma melhor distinção de grupos para consequente interpretação dos resultados. Análises de Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes (OPLS) é uma das alternativas para se visualizar um número grande de dados, como os obtidos em análises do metaboloma (Worley e Powers, 2013). Nesta técnica de regressão multivariada é gerado um modelo que se ajuste aos dados de forma supervisionada. O modelo só é aceito após a validação

a partir de parte dos dados reais (Szymanski et al., 2014; Worley e Powers, 2013). Os parâmetros  $r^2X$ ,  $r^2Y$  e  $Q^2$  revelam se a capacidade discriminativa e a habilidade de predição do modelo.

O modelo estabelecido a partir dos dados obtidos foi capaz de distinguir diferenças entre as duas espécies de diatomáceas. A Figura 4 indica a representação gráfica da OPLS gerada para os dados de metabólitos primários obtidos por CG-EM. Na Figura 4A representada por escores da análise OPLS, são indicados os grupos formados com os tratamentos. Em contrapartida, na Figura 4B são indicados os metabólitos utilizados na análise. Aqueles metabólitos que se encontram mais distantes da origem são considerados os mais importantes para a separação de grupos, não deixando de levar em conta se está sendo analisado o eixo LV1 ou o eixo LV2 (Tabela 2).

As fases LAG das duas cepas, BR006 e BR022 não apresentam separação estando sobrepostas. Deve-se ressaltar que a normalização para cada diatomácea seguiu o mesmo procedimento, sendo realizadas separadamente para BR006 e BR022. As fases LOG e STA de cada cepa não tiveram uma separação muito clara, no entanto a separação entre as fases das suas cepas fica bem evidente sugerindo que elas possuem respostas diferentes no metabolismo quando em deficiência de N.



**Figura 4.** Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes (OPLS) utilizando uma matriz de dados de metabólitos primários obtidos por CG-EM. As duas cepas BR006 e BR022 estão representadas na figura pelas cores verde e marrom, respectivamente. As diferentes fases de crescimento estão em cores degrade de sua respectiva cepa (verde ou marrom, conforme legenda de cores). Os números representam as concentrações de N (1, 2, 3 e 4 equivalem a 0, 5, 26 e 107 mM de N).  $r^2X=0,48$ ;  $r^2Y=0,53$

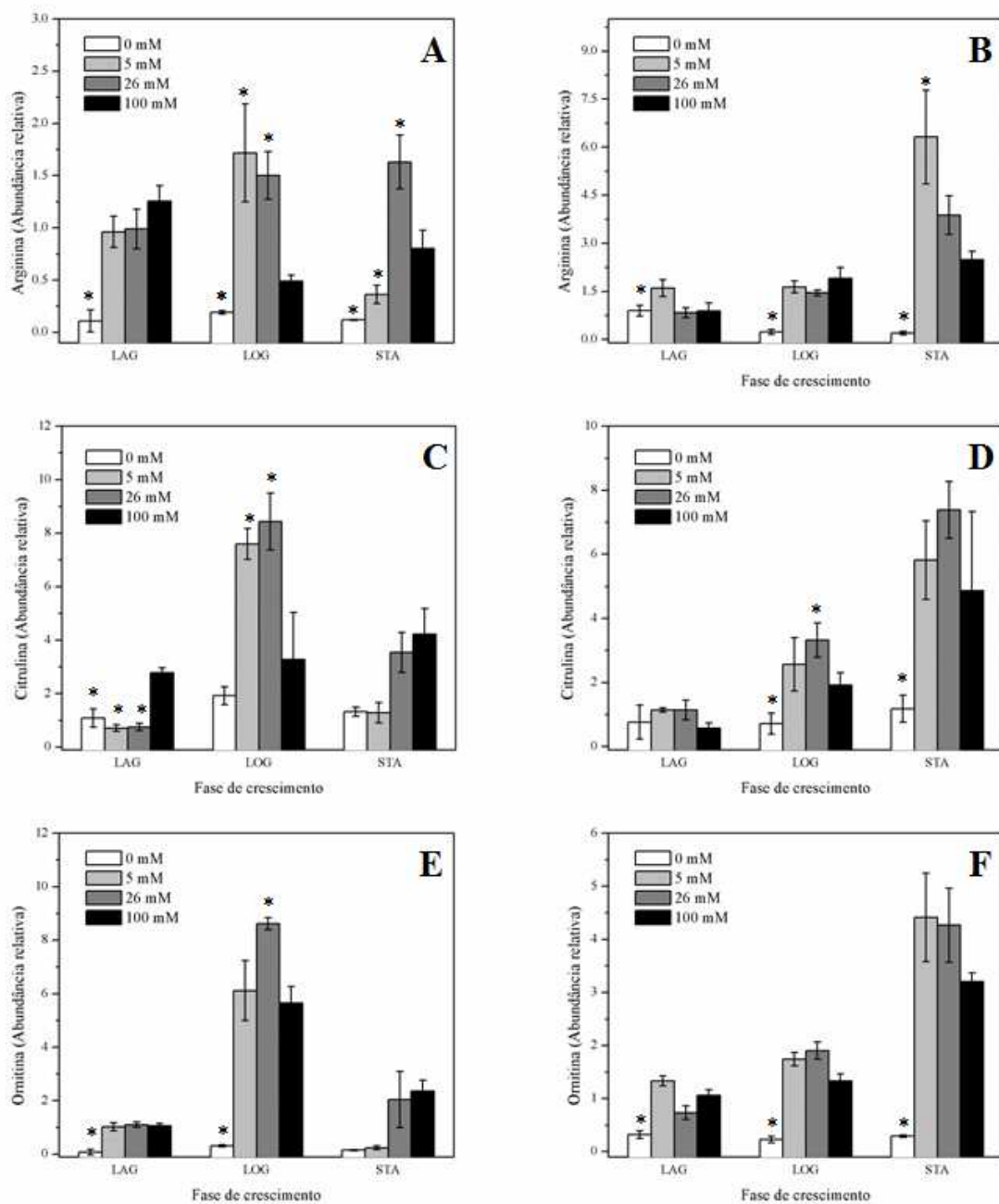
Dentre os metabólitos apontados como principais responsáveis pela separação das fases LOG das duas cepas estão aminoácidos como arginina, ornitina e citrulina, separados dos demais metabólitos pelo eixo LV1 da OPLS (Tabela 2 e Figura 4). Estes aminoácidos são intermediários do ciclo da uréia que ocorre de forma completa em diatomáceas (Allen et al., 2011). O destaque destes aminoácidos pela análise de OPLS sugere diferença na atividade deste ciclo em cada uma das cepas. Deve-se ressaltar que outros aminoácidos também se destacaram (Tabela 2), como triptofano, alanina, valina, isoleucina, prolina, glutamina e metionina que foram responsáveis pela separação entre as fases LOG de BR006 e BR022.

Neste caso, pode-se observar que os tratamentos mais distantes da origem são aqueles com baixa concentração de N (Figura 4A). Estes aminoácidos detectados nas duas cepas apresentaram alterações em relação a fase LAG. Enquanto a cepa BR006 apresentou valores maiores de Arginina e Ornitina para o tratamento de 0 mM de N, para Citrulina foi BR022 que apresentou maior valor (Figura 5).

**Tabela 2.** Metabólitos apontados pela análise de OPLS como importantes para a separação de grupos. LV1 e LV2 são as variáveis latentes da OPLS, que encontram-se representadas na figura 4. Os sinais negativo (-) e positivo (+) indicam a localização do metabólito no eixo LV, na parte negativa ou positiva.

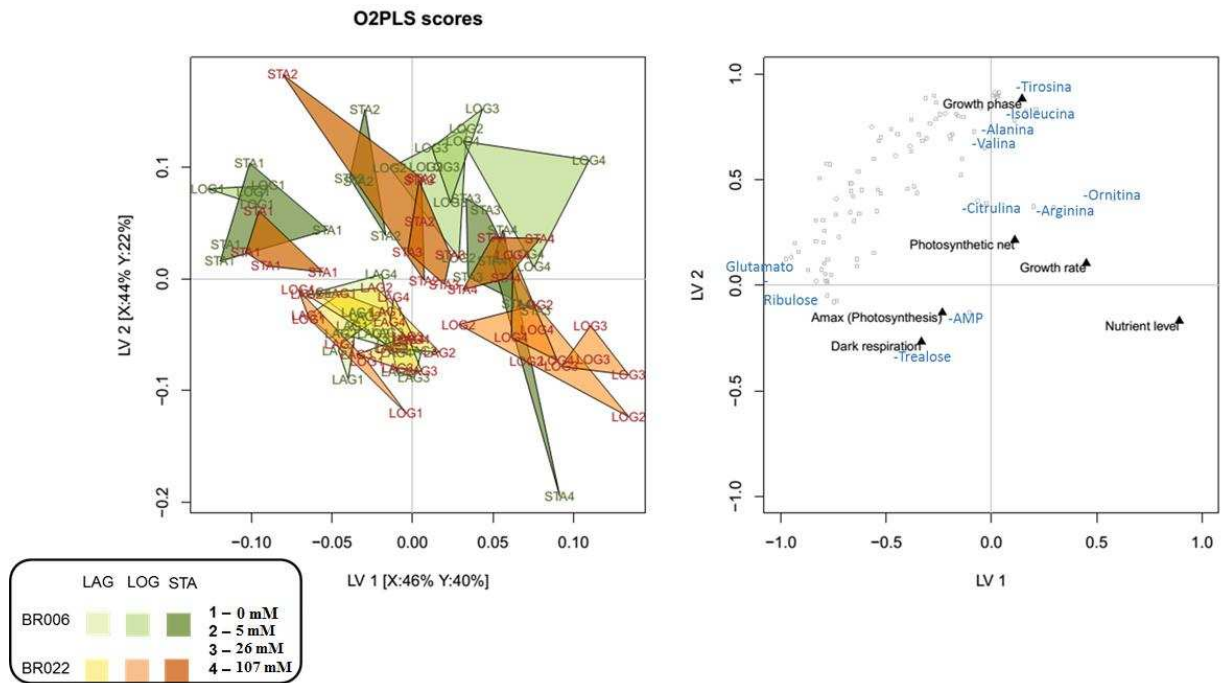
Metabólitos indicados pelo OPLS			
LV1		LV2	
Eixo (-)	Eixo (+)	Eixo (-)	Eixo (+)
Triptofano	Arginina	Asparagina	Glutamina
Alanina	Ornitina	Ornitina	Treonina
Valina	Citrulina	Alanina	Metionina
Isoleucina	Glutamina	Isoleucina	Trealose alfa alfa
Prolina	Metionina	Fenilalanina	PEP
Isomaltose	Trealose alfa alfa	Valina	AMP
Manose	Frutose 6P	2-Pirrol Ácido Carboxílico	Lipoamida
Sedoheptulose	Ribulose 5P	Espermidina	Gliceraldeído 3P
Mio-Inositol	Eritrose 4P	Isomaltose	Ácido pirúvico 3 Indol
Piruvato	AMP		Ácido Málico
Ácido Glicérico 2P	Ácido pirúvico 3 Indol		Ácido Aspartico
	Gliceraldeído 3P		
	OAA		

É possível observar que os intermediários do ciclo da uréia que foram detectados, possuem concentrações reduzidas na concentração de 0 mM de N em relação aos demais tratamentos, sendo essa característica observada em todas as fases de crescimento e para as duas diatomáceas analisadas (Figura 5).



**Figura 5.** Representação gráfica dos aminoácidos arginina (A e B), citrulina (C e D) e ornitina (E e F), nas diferentes fases de crescimento (LAG, LOG e STA) e com as diferentes concentrações de N usadas nos tratamentos (0, 5, 26 e 107 mM). Os gráficos à esquerda da figura representam BR006 e os à direita BR022. Os valores representam as médias de quatro repetições. Os valores referem-se a média de quatro repetições  $\pm$  desvio padrão. Foi realizado test t ( $p$ , 0,05), comparando-se com o a concentração de 107 mM de N para cada fase. Os dados foram normalizados pela mediana da fase LAG. Abreviaturas: LAG, fase lag; LOG, fase logarítmica; STA, fase estacionária.

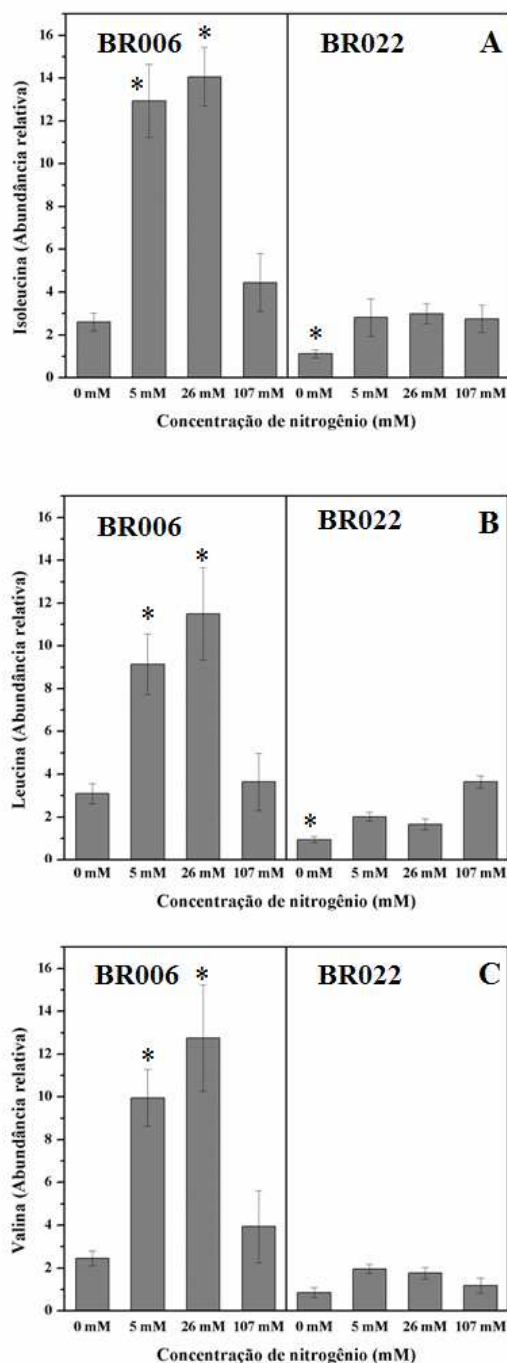
Na busca de associar os dados fisiológicos disponíveis com os dados de metabolismo foi realizada uma análise O2PLS (Szymanski et al., 2014). Esta análise de regressão multivariada é um método estatístico que permite a integração de dados de duas naturezas distintas vindos de um mesmo experimento, esperando-se que eles estejam de alguma forma conectados (Szymanski et al., 2014). A análise de O2PLS foca nas informações preditivas, separando a variância em comum entre os dois conjuntos de dados da variância única para um conjunto de dados e do ruído analítico.



**Figura 6.** Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes (O2PLS) utilizando duas matrizes de dados uma de dados fisiológicos e outra de dados de metabólitos primários obtidos por CG-EM. As duas cepas BR006 e BR022 estão representadas na figura pelas cores verde e marrom, respectivamente. As diferentes fases de crescimento estão em cores degrade de sua respectiva cepa (verde ou marrom, conforme legenda de cores). Os números representam as concentrações de N (1, 2, 3 e 4 equivalem a 0, 5, 26 e 107 mM de N). Os pontos cinza na figura a esquerda estão representando os metabólitos primários. Os dados fisiológicos estão representados por nomes.  $r^2X=0,9$ ;  $r^2Y=0,6$ .

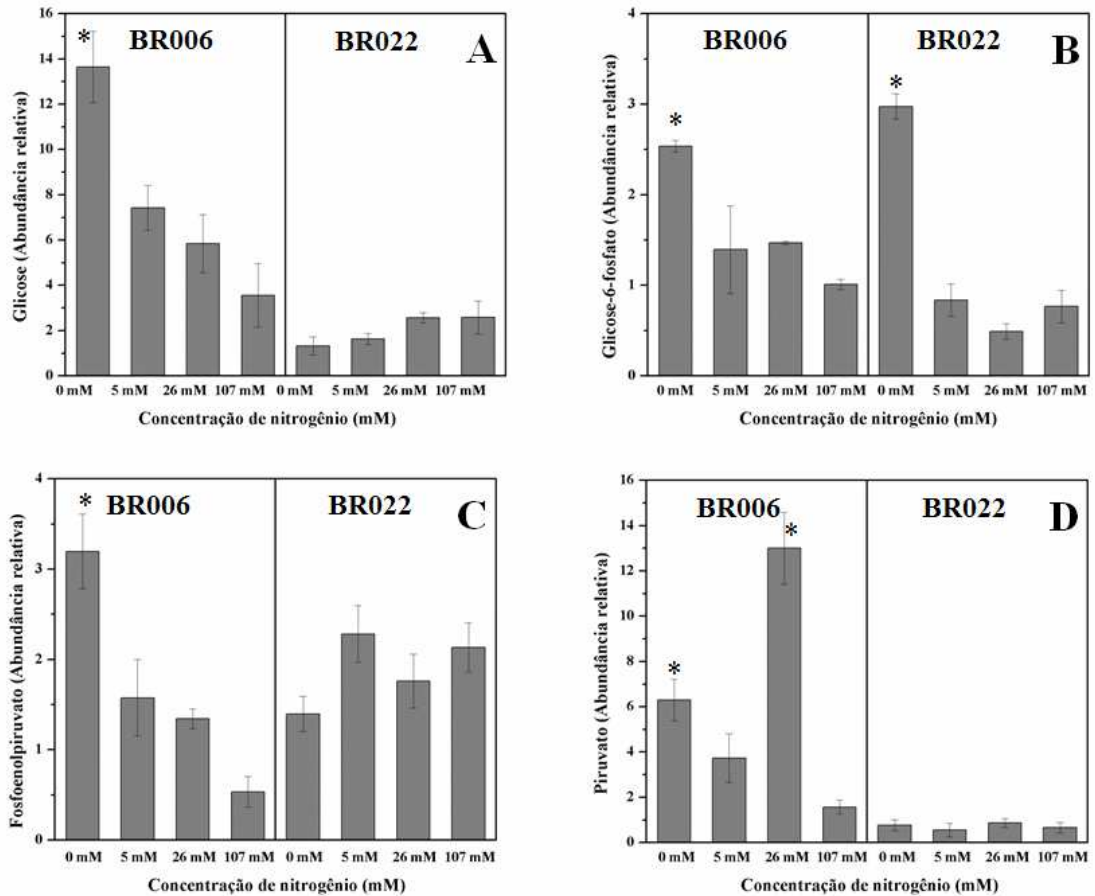
Nos eixos LV1 e LV2 estão representados os valores de X e Y, que são os indicativos de como o modelo está ajustado e explicado. A variável X representa o quanto os dados metabólicos podem prever os dados fisiológicos. Por outro lado, Y representa o quanto os parâmetros fisiológicos podem prever os dados metabólicos. Lembrando que aqueles parâmetros que se encontram mais distantes do ponto de origem do eixo são os mais representativos. Na análise de O2PLS para metabólitos primários (Figura 6), os principais parâmetros responsáveis por separações de grupos são nível de nutriente e fase de crescimento. No eixo LV1 pode-se notar a separação dos tratamentos sem N (LOG1, STA1, LOG2, e STA2 de ambas diatomáceas) na região negativa do eixo, enquanto na região positiva foram encontrados os tratamentos com maiores concentrações de N. A análise de O2PLS mostrou que alguns aminoácidos são importantes para esta separação, como alanina, isoleucina, tirosina e valina. Estes aminoácidos estão com baixa abundância nos tratamentos sem N e em maiores nos tratamentos com maiores concentrações de N. Deve-se salientar que nos tratamentos que possuem baixa concentração de N (5 mM) a abundância relativa dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) na cepa BR006 foi maior do que a encontrada nas células cultivadas em meio com 107 mM de N (Figura 7).

No eixo LV2 é possível ver uma separação dentre as fases de crescimento LOG e STA da cepa BR022 e a formação de um grupo das fases Lag que ficaram na parte negativa do eixo.



**Figura 7.** Abundância relativa dos aminoácidos (A) Isoleucina, (B) Leucina e (C) Valina apresentada na fase LOG no cultivo das cepas BR006 e BR022 em diferentes concentrações de N 0, 5, 26 e 107 mM. Os dados foram normalizados pela mediana da fase LAG. Os asteriscos (\*) representam diferença significativa (5 %) entre o tratamento em relação ao controle (107 mM de N) pelo teste t. As barras de erro referem-se ao erro padrão da média.

No grupo formado pelos tratamentos com 0 mM de N em fases LOG pode-se observar um aumento em alguns intermediários da glicólise, como glicose, glicose-6-fosfato, fosfoenolpiruvato e piruvato para a cepa BR006 (Figura 8). Enquanto isso, os tratamentos com presença de N (5, 26 e 107 mM de N) apresentaram baixas abundância destes metabólitos.



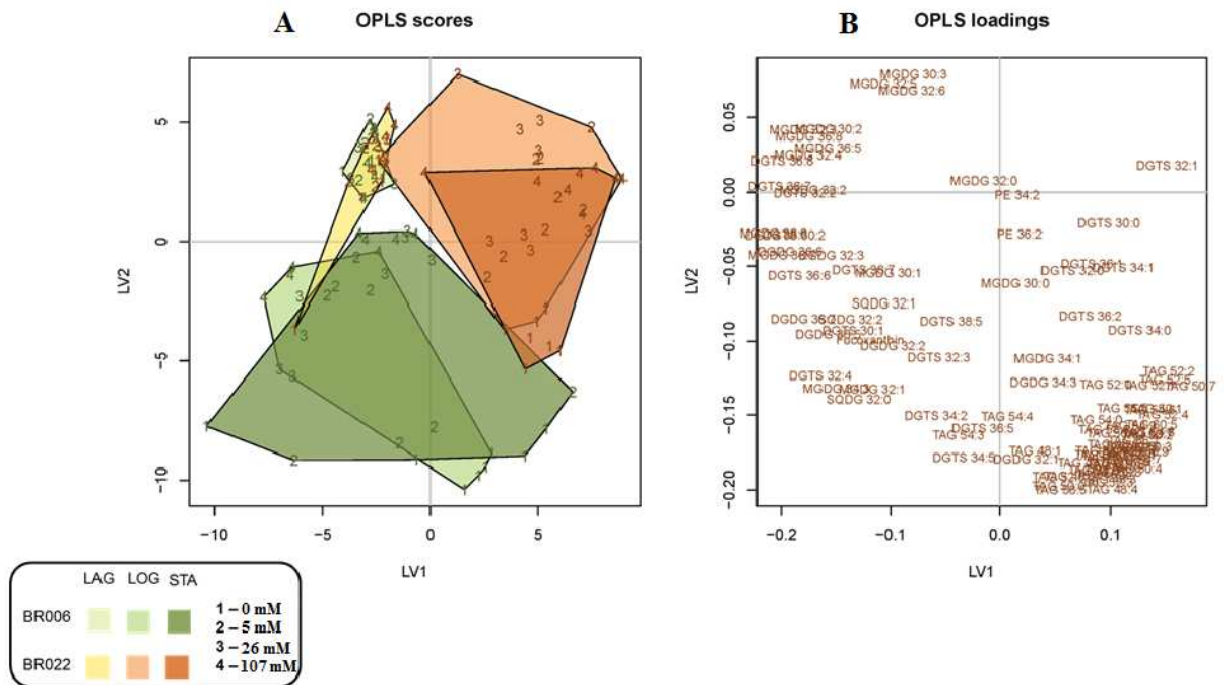
**Figura 8.** Abundância relativa dos intermediários da glicólise (A) glicose, (B) glicose-6-fosfato, (C) Fosfoenolpiruvato (D) piruvato apresentada na fase LOG no cultivo das cepas BR006 e BR022 em diferentes concentrações de N 0, 5, 26 e 107 mM. Os dados foram normalizados pela mediana da fase LAG. Os asteriscos (\*) representam diferença significativa (5 %) entre o tratamento em relação ao controle (107 mM de N) pelo teste t. As barras de erro referem-se ao erro padrão da média.

### 3.4. Análise do perfil de lipídeos

O método por CL-EM detectou 80 lipídeos pertencentes as classes de triacilgliceróis (36 TAG), monogalactosildiácilglicerol (16 MGDG), digalactosildiácilglicerol (6 DGDG), diácilgliceriltrimetilhomoserina (20 DGTS) e fosfaditiletonamina (2 PE).

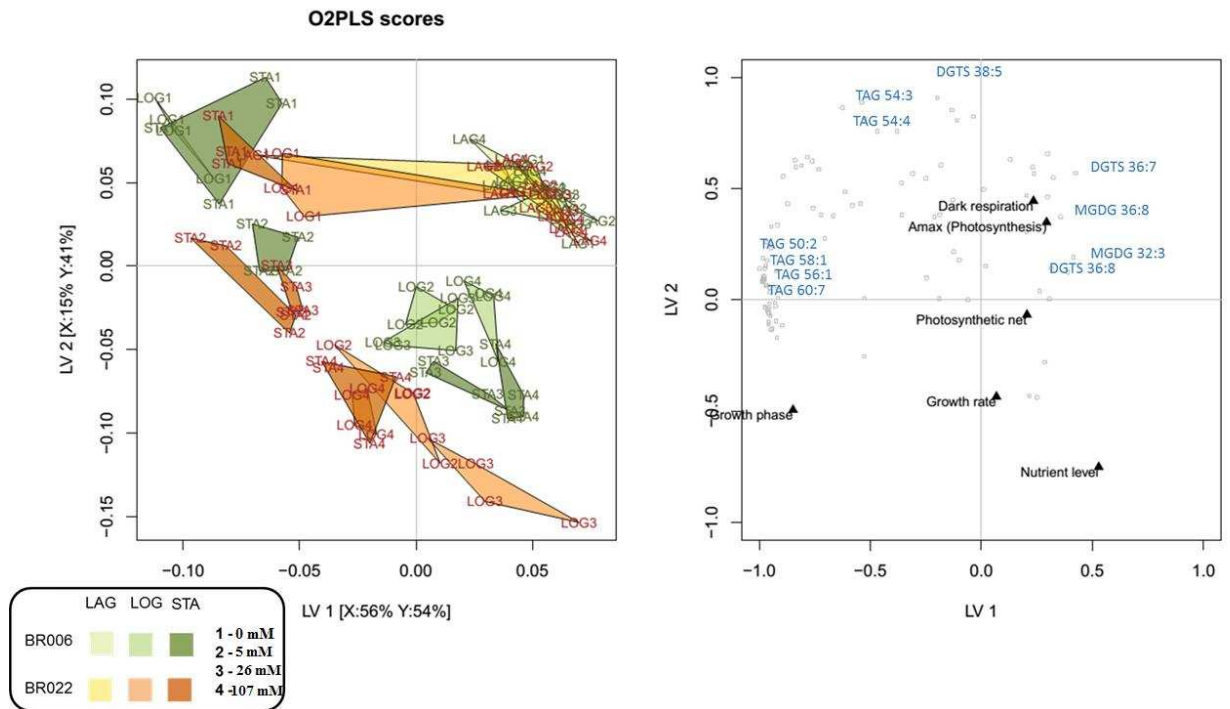
Assim como nos dados de metabólitos primários análise de OPLS para lipídeos permitiu a separação das duas espécies nas fases LOG e STA, sendo que a fase LOG e STA de cada cepa se sobrepuseram (Figura 9). Apesar de haver evidências de que as duas cepas diferem no perfil de lipídeos os tratamentos com 0 mM de N tanto em BR006 quanto em BR022 estão agrupados numa mesma região do gráfico (Figura 9A), podendo observar na área correspondente ao este tratamento a alta concentração de TAG (Figura 9B). Este fato sugere que a baixa disponibilidade de N, independente da cepa, acarreta o aumento de TAG na célula. Em adição, também se observa alta concentração do lípido de membrana do tilacóide monogalactosilmonocilglicerol (MGDG) (Figura 9B).

Observando o eixo LV1 (Figura 9A), além dos diácilgliceriltrimetilhomoserina (DGTS), e MGDG que estão dispostos pela porção negativa do eixo, pode-se observar uma região com alta concentração em que se concentraram metabólitos do grupo de glicerolipídeos diácilgalactosilglicerol (DGDG) que também é um componente da membrana do tilacóide. Este cenário evidencia que DGDG está envolvido na separação das cepas BR006 e BR022.



**Figura 9.** Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes (OPLS) utilizando uma matriz de dados de lipídeos obtidos por CL-EM. As duas cepas BR006 e BR022 estão representadas na figura pelas cores verde e marrom, respectivamente. As diferentes fases de crescimento estão em cores degrade de sua respectiva cepa (verde ou marrom, conforme legenda de cores). Os números representam as concentrações de N (1, 2, 3 e 4 equivalem a 0, 5, 26 e 107 mM de N).  $r^2X=0.63$ ;  $r^2Y=0.77$ .

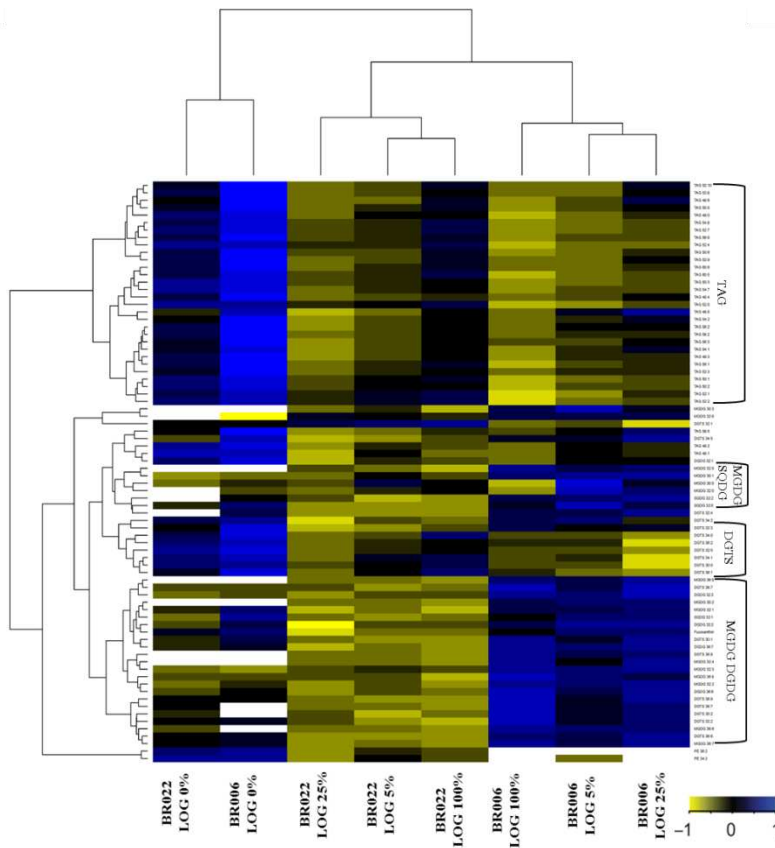
Ao se analisar todos os tratamentos em um gráfico de O2PLS em que foram utilizados dados lipídicos e alguns parâmetros fisiológicos percebe-se que os fatores mais importantes na separação de grupos foram nível de nutrientes e fases de crescimento das diatomáceas, da mesma forma que aconteceu para metabólitos primários. Observando a Figura 10A, verifica-se a maioria dos tratamentos em fase estacionária foram agrupados à esquerda do gráfico e os tratamentos em fase logarítmica à direita do gráfico. No eixo LV2 é possível ver a separação entre tratamentos com baixa concentração de N (quadrante positivo) e aqueles repletos ou com quantidade considerável de N (quadrante negativo).



**Figura 10.** Projeções Ortogonais de Estruturas Latentes (O2PLS) utilizando duas matrizes de dados de origem diferentes, uma matriz de dados fisiológicos e outra matriz de dados de metabólitos primários obtidos por CL-MS. As duas cepas BR006 e BR022 estão representadas na figura pelas cores verde e marrom, respectivamente. As diferentes fases de crescimento estão em cores degrade de sua respectiva cepa (verde ou marrom, conforme legenda de cores). Os números representam as concentrações de N (1, 2, 3 e 4 equivalem a 0, 5, 26 e 107 mM de N). Os pontos cinza na figura a esquerda estão representando lipídeos.  $r^2X=0,71$ ;  $r^2Y=0,95$ .

Os grupos formados por causa do nível nutricional foram separados devido a limitação e a presença de N em ambas as cepas (eixo LV1). Os tratamentos que se enquadraram neste perfil foram aqueles com 0 mM de N em todas as fases de crescimento e 5 mM de N em fase estacionária, sendo que para BR022 o tratamento 26 mM N na fase STA também foi incluído. É possível distinguir um grupo que separa as fases de crescimento LOG e STA da cepa BR022 e LOG e STA da cepa BR006 (eixo LV2).

Como as melhores separações de grupos foram encontradas na fase LOG de cada uma das cepas optou-se por realizar uma análise para observar como as classes de lipídeos estavam sendo agrupadas. A análise da fase LOG das duas diatomáceas, em todos os níveis nutricionais para os dados de lipídeos expõe grupos formados com compostos de mesma natureza. O mapa de calor (Figura 11) indica também, o agrupamento claro dos tratamentos com N para cada cepa. Os tratamentos sem N (0 mM de N) para as duas cepas foram agrupados, enquanto os demais tratamentos foram agrupados com as demais concentrações de N.



**Figura 11.** Mapa de calor dos diferentes lipídeos que foram detectados pela técnica de CL-EM nas cepas de diatomáceas BR006 e BR022 na fase logarítmica (LOG) de crescimento. Na figura são indicadas as quatro concentrações de nitrato de sódio utilizadas (0, 5, 26 e 107 mM). Os valores variam de um degrade de amarelo a azul, sendo preto a cor central. Na lateral da figura são destacados tipos lipídicos que foram agrupados: digalactosildiacilglicerol (DGDG); diacilgliceriltrimetilhomoserina (DGTS);

monogalactosildiacilglicerol (MGDG); sulfoquinosildiacilglicerol (SQDG), triacilglicerol (TAG).

Por meio do mapa de calor fica evidente o comportamento das duas cepas para biossíntese de lipídeos é diferente (Figura 11). Assim como o comportamento do metabolismo ao serem submetidas a estresse nutricional por N. A cepa BR006 apresentou elevado teor de lipídeos de membrana dos tilacóides (MGDG, DGDG) ao comparar com BR022 em tratamentos com N. No entanto, quando submetidas a uma situação de limitação deste elemento (tratamento de 0 mM) ambas cepas diminuem a biossíntese destes glicolipídeos. Ambas cepas deixaram de biossintetizar compostos do grupo dos MGDGs, como por exemplo, MGDG 30:2, MGDG 30:3, MGDG 32:5, MGDG 32:4 e MGDG 36:5. Além desses compostos, outros não foram detectados nos tratamentos de 0% de N, mas específicos para cada cepa.

A diferença de tonalidade no mapa de calor entre os tratamentos com N em relação ao sem N das duas cepas também evidencia as diferenças entre elas. Em BR006 os lipídeos de membrana passam de alta abundância (em azul) nos tratamentos com N para baixa abundância (amarelo) no tratamento sem N. Por outro lado, BR022 não teve uma grande diferença de coloração dos tratamentos com N para aquele sem N, evidenciando poucas alterações.

Quanto a outros composto lipídicos encontrados, TAG se destacam também. Ambas cepas acumularam TAGs em limitação a N, sendo que BR006 apresentou maior abundância deste tipo lipídico (tonalidade azul mais forte).

Um agrupamento também foi realizado com compostos DGTS, que apresentaram baixa abundância nos tratamentos com N para as duas diatomáceas e nos

tratamentos sem N apresentaram elevada abundância. Deve-se salientar que a presença de DGTS é um tipo de betalaína e não está presente em plantas mais derivadas, mas é encontrado em plantas mais basais e algas. No entanto sua rota de biossíntese ainda não foi estabelecida para diatomáceas.

### **3.5. Correlação entre metabólitos e parâmetros fisiológicos**

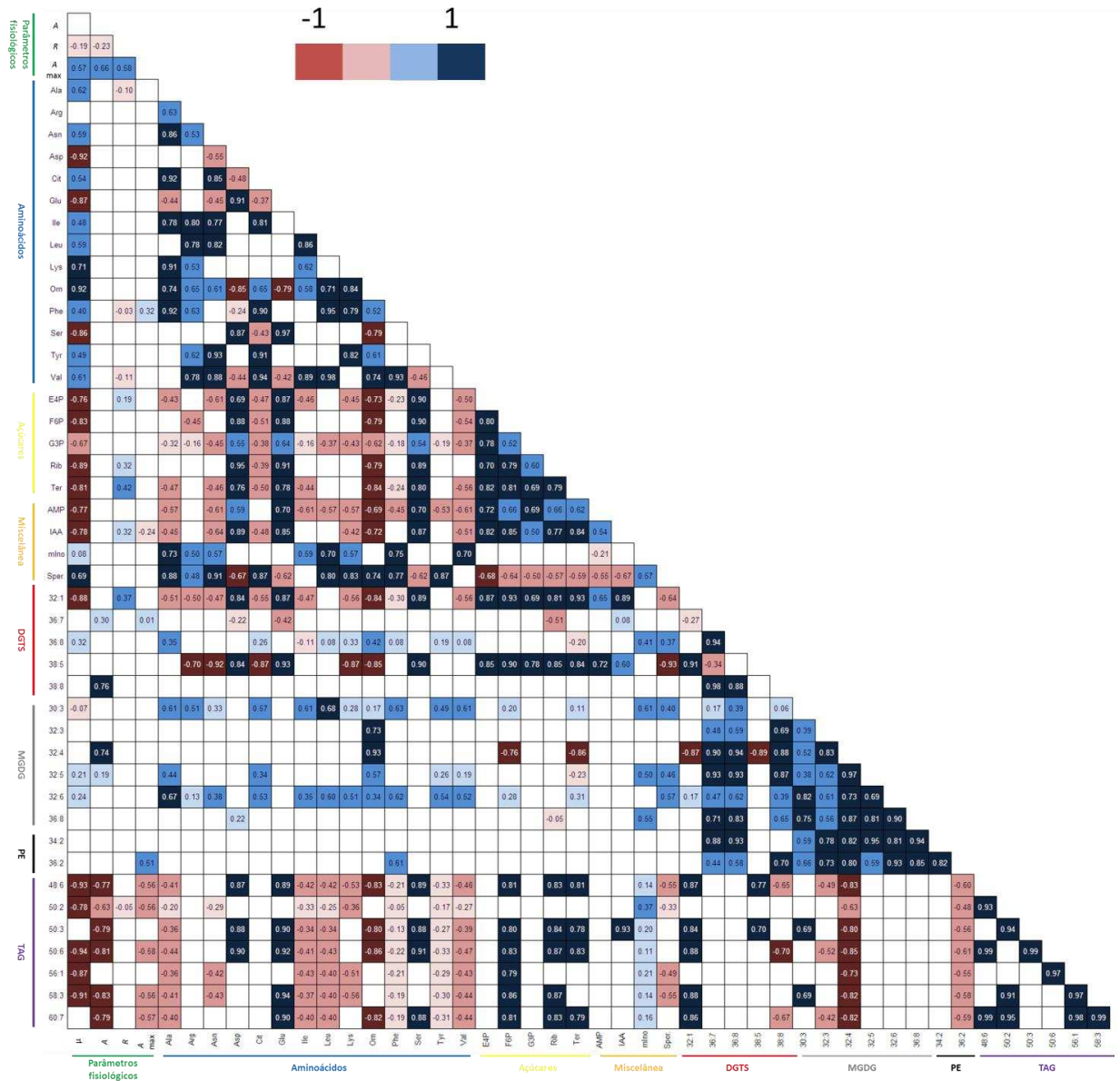
Os dados gerados pelas análises até então foram apresentados separadamente como parâmetros fisiológicos, metabólitos primários e lipídeos. Para compreender a relação existente entre estes dados foram realizadas matrizes de correlação de Pearson (Dai et al., 2013). As matrizes em fase LOG apresentaram maior número de correlações significativas, por isso as interpretações realizadas serão a partir de dados desta fase.

Uma vez que o número de metabólitos gerados pelas análises de CG-EM e CL-EM é muito elevado, a montagem de uma matriz de correlação para estes dados é inviável. Desta forma, foram utilizados os metabólitos apontados pelas análises de OPLS para grupo de metabólitos (primários e lipídeos) como mais relevantes para separação entre de grupos, mais os dados fisiológicos disponíveis. Para não perder a conexão entre metabólitos que não entraram nestas matrizes, foram realizadas matrizes para cada alga com dados de fase LOG correlacionando dados de metabólitos primários e parâmetros fisiológicos, assim como dados de lipídeos e parâmetros fisiológicos (dados não mostrados).

Uma característica que se nota na matriz de correlação da cepa BR006 é que os dados de fotossíntese líquida e taxa de crescimento ( $\mu$ ) se correlacionam negativamente

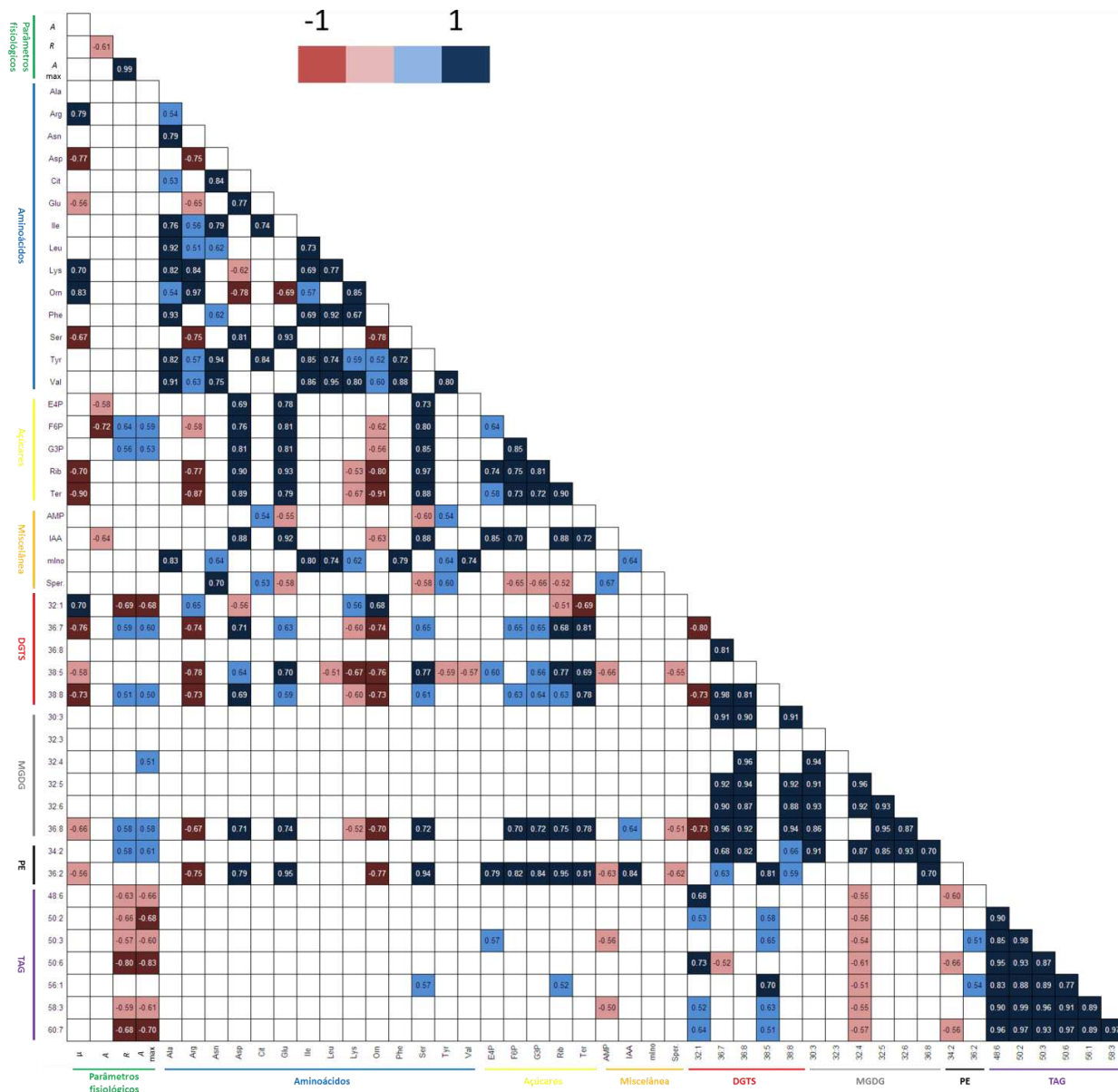
com quase todos os outros parâmetros da matriz (Figura 12). O mesmo acontece com o aminoácido ornitina, que se correlaciona negativamente com a maioria dos metabólitos, mas que se correlaciona positivamente com  $\mu$  ( $r = 0,92$ ) e fotossíntese ( $r = 0,83$ ) e espermidina ( $r = 0,69$ ). Correlações negativas com a maioria dos TAGs são observadas para a maioria dos aminoácidos, MGDG, fotossíntese e  $\mu$  (Figura 12).

Na matriz que apresenta os dados da cepa BR022 existem menos correlações significativas que as encontradas na matriz de BR006. Para BR022 os dados de  $\mu$  se correlacionam negativamente com a maioria dos demais elementos da matriz, no entanto não existe correlação significativa com fotossíntese. Na verdade, a fotossíntese apresentou correlação significativa com poucos parâmetros, principalmente açúcares e ácidos orgânicos, correlacionando-se negativamente. Também é observada a correlação negativa entre MGDG e TAG e positiva entre MGDG e aminoácidos em geral (Figura 13).



**Figura 12.** Matriz de correlação de Pearson com dados fisiológicos (grupo em verde), dados de CG-EM (em azul - aminoácidos, amarelo - açúcares e laranja - miscelânea) e dados de CL-EM (vermelho - DGTS, cinza – MGDG, preto - PE e roxo - TAG) da cepa BR006 em fase logarítmica de crescimento. Os metabólitos selecionados para essa matriz foram apontados como os mais importantes para diferenciar as duas espécies. Os quadros que estão representados em cores são significativamente correlacionados enquanto os em branco não tiveram correlação significativa. Os quadros em vermelho bordô são negativamente correlacionados e os azuis positivamente correlacionados, sendo que quanto mais intensa a cor mais correlacionados são os parâmetros ou metabólitos.

Abreviaturas: DGTS=diacilgliceriltrimetilhomoserina; MGDG=monogalactosildiácilglicerol; PE=fosfaditiletonamina; TAG=triacilglicerol; A= fotossíntese líquida;  $\mu$ =taxa de crescimento; R=respiração; Amax=fotossíntese máxima.



**Figura 13.** Matriz de correlação de Pearson com dados fisiológicos (grupo em verde), dados de CG-EM (dados em azul - aminoácidos, amarelo - açúcares e laranja - miscelânea) e dados de LC-MS (vermelho - DGTS, cinza – MGDG, preto - PE e roxo - TAG) da cepa BR022 em fase logarítmica de crescimento. Os metabólitos seleccionados para essa matriz foram apontados como metabólitos mais importantes para diferenciar as duas espécies. Os quadros que estão representados em cores são significativamente correlacionados enquanto os em branco não tiveram correlação significativa. Os quadros em vermelho bordô são negativamente correlacionados e os azuis positivamente correlacionados, sendo que quanto mais intensa a cor mais correlacionados são os parâmetros ou metabólitos. DGTS=diacilgliceriltrimetilhomoserina; MGDG=monogalactosildiacilglicerol; PE=fosfatidiletalonamina; TAG=triacilglicerol; A= fotossíntese líquida;  $\mu$ =taxa de crescimento; R=respiração; Amax=fotossíntese máxima.

#### 4. Discussão

A metabolômica tem como objetivo identificar algumas características químicas diante de um grande e complexo conjunto de dados metabólicos que definem certo sistema (Worley e Powers, 2013). Um conjunto de alguma moléculas podem definir características únicas desse sistema. Infelizmente, os sistemas podem ser perturbados por um número de fatores como pH e temperatura, por exemplo. Uma ferramenta para se determinar características únicas de dois ou mais sistemas são as análises multivariadas que identificam as características do sistema que são biologicamente relevantes. Uma das mais populares ferramentas utilizadas é a análise de componentes principais (PCA) e projeções de estruturas latentes (PLS) e projeções ortogonais de estruturas latentes (OPLS) (Szymanski et al., 2014; Tapp e Kemsley, 2009; Mahadevan et al., 2008). Neste trabalho foram utilizadas algumas destas técnicas de análises multivariadas que permitiram identificar metabólitos importantes na separação dos tratamentos.

No presente estudo foram caracterizados diferentes parâmetros fisiológicos e metabólicos de duas cepas de diatomáceas, BR006 e BR022. Estas cepas foram cultivadas sob quatro níveis distintos de N. Independente das condições as quais foram submetidos, esses organismos apresentaram diferentes comportamentos fisiológicos que foram refletidos pelo seu metabolismo.

A fotossíntese líquida verificada na cepa BR006 foi superior aos valores apresentados pela BR022 a 100 mM de N, nível utilizado no meio BG11. Em adição, verificou-se maior taxa de crescimento na cepa BR006 (Figura 2). Quando em meio sem N a queda da taxa fotossintética em BR006 foi de 24 vezes na fase LOG. Esse valor é

maior do que o observado para BR022 cultivada em meio sem N, que teve uma redução de 8 vezes a fotossíntese líquida em relação ao tratamento com 107 mM de N.

Em relação a limitação de N (na forma de  $\text{NaNO}_3$ ) em que as cepas de diatomáceas foram submetidas, ambas apresentaram diminuição das taxas fotossintéticas, que é uma resposta comum a limitação nitrogenada em organismos fotossintéticos (Jiang et al., 2012; Shelly et al., 2012; Yang et al., 2013). Uma vez que a fotossíntese requer N para síntese de pigmentos e para síntese de proteínas envolvidas no transporte de elétrons e em reações da etapa bioquímica da fotossíntese como a Rubisco, a baixa disponibilidade de N pode reduzir o conteúdo de proteínas, limitando o fluxo de elétrons entre os fotossistemas, podendo causar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, levando ao estresse oxidativo (Hockin et al., 2012).

Além da fotossíntese, a taxa de crescimento foi bastante afetada em meio sem N para as duas cepas. A ausência de N no meio alterou rotas metabólicas ligadas a síntese de aminoácidos (Figura 6), conseqüentemente a produção de proteínas responsáveis por grande parte do funcionamento das células. Nas análises de correlação foi possível observar correlação positiva entre taxa de crescimento e fotossíntese e também entre taxa de crescimento e produção de aminoácidos (a maioria deles). De fato, o resultado mostra que se as taxas fotossintéticas foram alteradas, a taxa de crescimento também será. Deve-se salientar também, que a produção de ornitona, espermidina e espermina foram correlacionadas positivamente com a taxa de crescimento em BR006. Esses metabólitos estão diretamente relacionados a síntese de parede celular das diatomáceas (Frigeri et al., 2006).

O aumento de intermediários da via glicolítica (Figura 8) em tratamentos com 0 mM de N sugere que o material de reserva (como crisolaminarina, por exemplo) esteja sendo mobilizado para o metabolismo do carbono central. A mesma interpretação foi realizada para *Talassiosira pseudonana*, que a partir de resultados de proteômica foi sugerido que tenha aumentado a atividade de metabólitos da via glicolítica em células cultivadas em meio com deficiência de N (Hockin et al., 2012).

Além dos intermediários da glicólise, ácidos orgânicos envolvidos no ciclo TCA aumentaram na ausência de N em cultivos com as duas cepas. Este resultado tem sido relatado na literatura para diatomáceas (Ge et al., 2014; Yang et al., 2013). De forma oposta, em *Arabidopsis thaliana* (Peng et al., 2007) e *Chlamydomonas reinhardtii* (Miller et al., 2007) transcritos de genes associados ao ciclo TCA tiveram sua abundância reduzida ou inalterada quando submetidos ao estresse por deficiência de N. No entanto, Hockin et al. (2012) relatou que a abundância de transcritos de genes relacionados ao ciclo TCA aumentaram quando *Thalassiosira pseudonana* foi submetida a este tipo de estresse, sugerindo que o catabolismo de proteínas produza intermediários do ciclo TCA. Estas informações corroboram com os dados encontrados no presente trabalho. Assim, tomados em conjunto estes resultados sugerem diferenças que existe entre metabolismo de diatomáceas, algas verde e plantas.

Neste contexto, em que as taxas fotossintéticas se encontram baixas devido à ausência de N, a maior abundância de metabólitos da via glicolítica e ciclo TCA são intrigantes. Diante de uma situação em que a cianobactéria *Prochlorococcus marinus* foi submetida a limitação nitrogenada Tolonen e colaboradores (2006) sugeriram que a quebra de reservas intracelulares é a forma mais eficiente de assimilação de carbono que

produza intermediários para o reaproveitamento de N, do que a realização da fotossíntese, uma vez que este processo demanda N.

As diatomáceas possuem o ciclo da uréia completo, o que permite o uso mais eficiente de fontes de N absorvidas do meio e produzidas por processos celulares, sendo assim uma função anabólica ao contrário de metazoários que possuem o ciclo da ureia com função catabólica (Allen et al., 2011). Uma conexão entre ciclo da uréia e ciclo TCA pode ser feita uma vez que ambos compartilham metabólitos precursores para os dois ciclos.

A degradação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), como Leucina, Valina e Isoleucina gera metabólitos diretamente ligados ao TCA, como acetil-CoA e succinil-CoA. Uma forte regulação positiva em proteínas, como metilmalonil-CoA mutase, que estão relacionadas a degradação de aminoácidos pertencentes a BCAA durante o acúmulo de TAGs sugere que enzimas envolvidas na degradação destes aminoácido estejam relacionadas com esse processo em *Phaeodactylum tricornutum* (Ge et al., 2014). Em adição, a degradação de aminoácidos de cadeia ramificada com geração de substratos para o ciclo TCA e também provimento de elétrons para cadeia transportadora de elétrons é encontrado em plantas (Araújo et al., 2011; Caldana et al., 2013). Observando a matriz de correlação observa-se correlação negativa entre esses aminoácidos e TAGs para BR006, no entanto a mesma observação não foi verificada para a cepa BR022 (Figuras 12 e 13; Anexo II). Além disso, dois aminoácidos de cadeia ramificada, Valina e Isoleucina foram apontados pelo OPLS como importantes para distinguir as duas cepas metabolicamente (Tabela 2). Desta forma, sugere-se que o

redirecionamento de carbono e energia para a síntese de TAGs como resultado da degradação de BCAA possa ser um mecanismo de suporte para o acúmulo de TAGs.

O acúmulo de lipídeos de reserva, TAGs em sua grande parte, foi diferente em cada uma das diatomáceas estudadas. Observou-se um acúmulo mais pronunciado em BR006 do que BR022. Algumas diatomáceas apresentam maior reserva de carboidratos enquanto outras tendem a acumular mais lipídeos em situações de estresse nutricional. Palmucci et al. (2011) relataram o cultivo de várias diatomáceas sob condições limitantes de nitrato, revelando comportamentos distintos entre as espécies estudadas. No mesmo estudo, em algumas espécies não foram observadas alterações no metabolismo em ambiente com baixa disponibilidade de N, sendo seu metabolismo denominado homeostático. Por outro lado, outras espécies alocaram reservas de carboidratos para a biossíntese de lipídeos. A hipótese de mobilização de açúcares de reserva para transformá-los em lipídeos de reserva é possível, uma vez que ácidos graxos são mais energéticos, sendo assim mais propício o seu acúmulo. E um terceiro grupo, as células direcionaram o excesso de carbono para biossíntese de lipídeos, sem alterar a reserva de carboidratos (Palmucci et al., 2011). O aumento da biossíntese de novo de ácidos graxos em BR006 e BR022 pode ocorrer uma vez que o metabolismo central do carbono está ativado na ausência de N. Ao mesmo tempo verifica-se que a síntese de aminoácidos diminuiu, sendo desta forma esqueletos de carbonos direcionados para outras vias.

Nos cloroplastos de plantas, os lipídeos de membrana que se encontram em maior abundância são MGDG e DGDG, sendo essenciais para a biossíntese das membranas do aparato fotossintético (Burgos et al.,2011). Esses galactolipídeos são

sintetizados pelas enzimas MGD e DGD galactosiltransferase/sintase, as quais também mediam o remodelamento das membranas lipídicas (Yang et al., 2013). Os níveis de MGDG e DGDG reduziram, enquanto que a abundância de TAGs aumentou (Figura 9) nos experimentos em que tanto BR006 quanto BR022 foram cultivadas sem N. Os TAGs são lipídeos de armazenamento que são acumulados em grande quantidade nas células quando elas são cultivadas sob limitação de nutrientes, principalmente N (Yang et al., 2013; Gong et al., 2013), P (Yang et al., 2014; Gong et al., 2013), e Si (Chaffin et al., 2011) no caso das diatomáceas. Esse resultado sugere uma remodelação do metabolismo de biossíntese de membranas do cloroplasto, que são degradadas, liberando ácidos graxos livres que são direcionados para síntese de TAGs. No entanto, BR006 mostrou mais acúmulo de TAG e menor degradação de MGDG e DGDG sugerindo que a cepa BR022 é menos atingida pelo estresse por limitação de N.

## 5. Conclusões

A deficiência de N promoveu alterações metabólicas principalmente na produção de intermediários e energia para a síntese de lipídeos de reserva. Sob-baixa disponibilidade de N verificou-se uma redução na concentração de lipídeos de membrana do tilacóide (MGDG, DGDG). Concomitantemente, observou-se um aumento na quantidade dos lipídeos de reserva em ambas as cepas.

A diminuição de aminoácidos de cadeia ramificada em tratamentos sem N sugerem que esteja ocorrendo a degradação destes aminoácidos que irão gerar compostos intermediários do ciclo TCA, como malato, que poderão ser convertidos a piruvato no cloroplasto e subsequentemente acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos.

Por outro lado, sugere-se nos tratamentos limitados por N a mobilização de reservas, como a crisolaminarina, esteja ocorrendo para a manutenção do metabolismo central, via glicólise e ciclo TCA.

Pelas respostas metabólicas e fisiológicas obtidas, é possível concluir que a cepa BR022 apesar de ser afetada pelo estresse nitrogenado, tem respostas mais amenas sobre a fotossíntese, redução dos aminoácidos de cadeia ramificada, e abundância de lipídeos de membrana do tilacóide, assim como menores acúmulos de TAG. Isto evidencia que as cepas se comportam de forma diferente quanto ao uso do N disponível, sendo que BR022 é menos afetada devido o melhor reaproveitamento deste elemento.

De modo geral, é possível concluir que existe uma reprogramação metabólica em células das duas cepas quando submetidas ao estresse por N, envolvendo o metabolismo central e acumulando reservas para que as células consigam sobreviver o maior tempo possível na ausência deste nutriente.

## 6. Referências citadas

- Adams C, Bugbee B (2013) Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. **Journal of Applied Phycology** 26:1351-1357. doi: 10.1007/s10811-013-0156-7.
- Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC, Lim JK (2011) Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 15:584-593. doi:10.1016/j.rser.2010.09.018.
- Andersen RA (2005) **Algal culturing techniques**, 1th ed. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA. 578 pp.
- Allen AE, LaRoche J, Maheswari U, Lommer M, Schauer N, Lopez PJ, Finazzi G, Fernie AR, Bowler C (2008) Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105:10438-10443. doi:10.1073/pnas.0711370105
- Allen AE, Dupont CL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR, Bowler C (2011) Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. **Nature** 473:203-207. doi:10.1038/nature10074.
- Bromke MA, Giavalisco P, Willmitzer L, Hesse H (2013) Metabolic Analysis of Adaptation to Short-Term Changes in Culture Conditions of the Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Plos One** 8 (6) e67340. doi: 10.1371/journal.pone.0067340.
- Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 73: 897–909. doi:10.1111/tpj.12080
- Chaffin JD, Mishra S, Kuhaneck RM, Heckathorn SA, Bridgeman TB (2011) Environmental controls on growth and lipid content for the freshwater diatom, *Fragilaria capucina*: A candidate for biofuel production. **Journal of Applied Phycology** 24:1045-1051. doi 10.1007/s10811-011-9732-x.
- Chen YC (2012) The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. **Food Chemistry** 131:211-219. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.062.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** 25:294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

Feng Y, Li C, Zhang D (2011) Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology** 102:101-105. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.01.

Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere, integrating terrestrial and oceanic components. **Science** 281:237-240.

Frada MJ, Burrows EH, Wyman KD, Falkowski PG (2013) Quantum requirements for growth and fatty acid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) in nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Phycology**. 49:381-388. doi:10.1111/jpy.12046

Ge F, Huang W, Chen Z, Zhang C, Xiong Q, Bowler C, Yang J, Xu J, HU H (2014) Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **The Plant Cell**. doi/10.1105/tpc.114.124982

Giavalisco P, Li Y, Matthes A, Eckhardt A, Hubberten HM, Hesse H, Segu S, Hummel J, Köhl K, Willmitzer L (2011) Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{34}\text{S}$  isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. **The Plant Journal** 68:364-376. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04682.x.

Graham JM, Graham LM; ZulkiXy SB, Pflieger BF, Hoover SW, Yoshitani J (2011) Freshwater diatoms as a source of lipids for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 39:419- 428. doi 10.1007/s10295-011-1041-5.

Guerra LT, Levitan O, Frada MJ, Sun JS, Falkowski PG, Dismukes GC (2013) Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Biomass and Bioenergy** 59:306-315. http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.007.

Guschina I, Harwood J (2013) Algal lipids and their metabolism. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) **Algae for biofuels and energy**. Springer, Dordrecht, pp 17–36

Henley WJ (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. **Journal of Phycology** 29:729-739. doi:10.1111/j.0022-3646.1993.00729.x.

Hildebrand M, Davis AK, Smith SR, Traller JC, Abbriano R (2012) The place of diatoms in the biofuels industry. **Biofuels** 3:221-240. doi: 10.4155/BFS.11.157.

Hockin NL, Mock T, Mulholland F, Kopriva S, Malin G (2012) The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. **Plant Physiology** 158:299-312. doi/10.1104/pp.111.184333

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal** 54:621–63. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

Jiang Y, Yoshida T, Quigg A (2012) Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry** 54:70-77. doi:10.1016/j.plaphy.2012.02.012.

Knothe G, Gerpen JV e Krahl J (2005) **The Biodiesel Handbook**. AOCS Press, Champaign, Illinois.

Li Q, Du W, Li D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology** 80:749-756.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature protocols** 1:387-396. doi:10.1038/nprot.2006.59.

Liu Y, Song X, Cao X, Yu Z (2013) Responses of photosynthetic characters of *Skeletonema costatum* to different nutrient conditions. **Journal of Plankton Research** 35: 165-176. doi:10.1093/plankt/fbs080.

Lombardi T, Wangersky PJ (1991) Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series** 77:39-47.

Mahadevan S, Shah SL, Marrie TJ, Slupsky CM (2008). Analysis of metabolomic data using support vector machines. **Analytical Chemistry** 80:7562-757. doi: 10.1021/ac800954c

Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 14:217-232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.

Miller R, Wu GX, Deshpande RR, Vieler A, Gartner K, Li XB, Moellering ER, ZaunerS, Cornish AJ, Liu BS, et al. (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. **Plant Physiology** 154:1737–1752. doi: 10.1104/pp.110.165159.

Monod J (1949) The growth of bacterial culture. **Annual Review of Microbiology** 9:371-394

Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Quéguiner B. (1995) Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. **Global Biogeochemical Cycle** 9: 359-372.

Nurachman Z, Hartati Anita S, Anward EE, Novirani G, Mangindaan B, Gandasasmita S, Syah YM, Panggabean LMG, Suantika G (2012) Oil productivity of the tropical marine diatom *Thalassiosira* sp. **Bioresource Technology** 108:240-244. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.082

Obata T, Fernie AR, Nunes-Nesi A (2013) The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. **Metabolites** 3:325-346. doi:10.3390/metabo3020325.

Palmucci M, Ratti S, Giordano M (2011) Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: A fourier transform infrared spectroscopy approach. **Journal of Phycology** 47:313-323. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x

Peng MS, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ(2007) Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. **Plant Molecular Biology** 65:775-797. doi: 10.1007/s11103-007-9241-0

Popovich CA, Damiani C, Constenla D, Leonardi PI (2012) Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. **Journal of Applied Phycology** 24:1-10. doi 10.1007/s10811-010-9639-y.

Schuchardt U, Sercheli R, Vargas RM (1998) Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal of The Brazilian Chemical Society** 9:199-210.

Shelly K, Higgins T, Beardall J, Wood B, McNaughton D, Heraud P (2007) Characterizing nutrient-induced fluorescence transients (NIFTs) in nitrogen-stressed *Chlorella emersonii* (Chlorophyta). **Phycologia** 46:503–512.

Su X, Xu J, Yan X, Zhao P, Chen J, Zhou C, Zhao F, Li S (2013) Lipidomic changes during different growth stages of *Nitzschia closterium* f. *minutissima*. **Metabolomics** 9:300-310. doi: 10.1007/s11306-012-0445-1.

Szymanski J, Brotman Y, Willmitzer L, Cuadros-Inostroza A (2014) Linking gene expression and membrane lipid composition of Arabidopsis. **The Plant Cell** 26:915-928. /doi/10.1105/tpc.113.118919

Tapp HS, Kemsley EK (2009) Notes on the practical utility of OPLS. **Trends in Analytical Chemistry** 28:1322-1327. doi:10.1016/j.trac.2009.08.006

Tolonen AC, Aach J, Lindell D, Johnson ZI, Rector T, Steen R, Church GM, Chisholm SW (2006) Global gene expression of *Prochlorococcus* ecotypes in response to changes in nitrogen availability. **Molecular Systems Biology** 2:53. doi: 10.1038/msb4100087

## **Capítulo II - Efeitos da limitação nutricional por ureia e silicato de sódio em diatomáceas cultivadas em meios a base de água residuária**

### **Resumo**

As diatomáceas são um grupo de microalgas que produzem óleo como material de reserva e têm ganhado atenção como uma possível fonte de óleo para produção de biocombustível. Algumas espécies quando submetidas a estresse nutricional alteram o metabolismo aumentando a produção de lipídeos. No entanto, ainda existem barreiras que inviabilizam a produção de microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel, como o elevado custo dos cultivos. Uma forma de ter cultivos mais baratos é reciclando nutrientes que estão presentes em água residuária. Diante disso, este trabalho teve como principal objetivo cultivar duas espécies de diatomáceas *Cyclotella* sp. BR021 e *Nitzschia* sp. BR022, variando concentrações de ureia (200 a 400 mg L<sup>-1</sup>) e de silicato de sódio (200 a 600 mg L<sup>-1</sup>) em água de efluente petroquímico como meio de cultura alternativo. As duas cepas produziram biomassa semelhante ou melhor do que quando cultivadas em meio sintético com água destilada, sendo as maiores quantidades de biomassa encontradas nos tratamentos com elevada concentração de silicato de sódio. A cepa BR022 produziu mais biomassa do que BR021 (1,4 e 0,78 g L<sup>-1</sup> respectivamente) em um mesmo tempo de cultivo. No cultivo de BR022 verificou-se que nas maiores concentrações de ureia e silicato de sódio foram encontrados maiores teores de carboidratos e proteínas (37 e 33 % respectivamente), sendo o contrário observado para lipídeos (42 %), que acumulou nas células cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio e de silicato de sódio. Enquanto isso, a cepa BR021 apresentou comportamento diferente. O teor de proteína total quantificado para esta cepa

não sofreu alteração nas diferentes concentrações de ureia e silicato de sódio testadas. Entretanto, essa cepa obteve os maiores percentuais de lipídeos (12 %) e quantidade de biomassa seca ( $0,78 \text{ g L}^{-1}$ ) em tratamentos com altas doses de silicato de sódio e baixas de ureia. Estes resultados sugerem que águas residuárias podem substituir o uso de meios sintéticos, para cultivos de diatomáceas. Além disso, em meios com doses elevadas de silicato de sódio e baixas de nitrogênio permitem uma elevada produção de lipídeos por biomassa para a cepa BR022. Já, a cepa BR021, apesar de alterar a produção de lipídeos em baixa concentração de ureia, não produziu grande quantidade de lipídeos.

Palavras-chave: diatomáceas, água residuária, ureia, silicato.

## **Chapter II - Effects of nutrient limitation by urea and sodium silicate in diatoms cultivated in wastewater**

### **Abstract**

Diatoms are a microalgae group that produce oil as a storage material, and have gained attention as a possible source of oil for biofuel production. Some species when exposed to stress alter their metabolism by increasing lipids production. However, there are still obstacles that make unfeasible the production of microalgae as feedstock for biodiesel production, as the high cost of cultivation. One way to have less expensive cultivation is recycling nutrients that are present in wastewater. Therefore, this study aimed to cultivate two diatom species *Cyclotella* sp. BR021 and *Nitzschia* sp. BR022, ranging urea concentrations (200 to 400 mg L<sup>-1</sup>) and sodium silicate (200 to 600 mg L<sup>-1</sup>) using petrochemical wastewater as alternative medium culture. The two strains produce similar or better biomass than when grown in synthetic medium with the largest biomass amount found in treatments with high concentrations of sodium silicate. BR022 strain produced more biomass than BR021 at a similar cultivation time (1,4 and ,78 g L<sup>-1</sup>, respectively). In BR022 cultivation notices that highest urea concentrations and higher sodium silicate carbohydrates percentages and protein ( 37 and 33%, respectively) were found. Otherwise found for lipids (42%), which accumulated in the cells cultured with low nitrogen and sodium silicate concentrations. Meantime, BR021 strain showed a different behavior. Proteins amount for this strain showed no significant change in different urea and sodium silicate concentrations tested. However, this strain had the highest percentages of lipids (12%) and greater amount of dry biomass (0,78 g L<sup>-1</sup>) in treatment with high sodium silicate and low urea concentration. These experiments results suggest that wastewater can replace synthetic medium for viable diatom

cultivation. Furthermore, in medium with high sodium silicate and low nitrogen it was observed increased of lipids by biomass production concentration for BR022 strain. Diatom BR021 despite altering lipids production in low urea concentrations did not produce large amounts of lipids.

Keywords: diatoms, wastewater, urea, silicon.

## 1. Introdução

As microalgas têm sido apontadas como fonte de matéria prima promissora para o fornecimento de óleo para produção de biodiesel (Hossain et al., 2008). Alguns desses microorganismos possuem elevado teor lipídico e eficiência fotossintética superior às plantas vasculares, podendo gerar grande quantidade de biomassa em curto espaço de tempo, sem demandar grandes áreas de produção (Fieldas et al., 2014; Huang et al., 2009; Li et al., 2008b).

Dentre os diferentes grupos de microalgas, as diatomáceas são apontadas como fonte de óleo para produção de biocombustível, uma vez que acumulam, naturalmente, carbono na forma de lipídeos (Nurachman et al., 2012). O interesse nesse grupo de microorganismos vai além da cadeia produtiva de biocombustíveis. A composição estrutural da parede celular formada de sílica das diatomáceas tem sido estudada para fins nanotecnológicos como a fabricação de componentes de computadores e cápsulas de liberação controlada de medicamentos (Gordon et al., 2008). Estes microorganismos produzem também substâncias importantes para indústria alimentícia e indústria farmacêutica (Bozarth et al., 2009). Dentre as diatomáceas já estudadas, duas têm seu genoma sequenciado, *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004) e *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler et al., 2008). Esse fato foi importante para a compreensão das rotas metabólicas existentes nas diatomáceas.

O metabolismo das diatomáceas pode sofrer alterações devido a mudanças ambientais (Mettler et al., 2014; Mekhalfi et al., 2013; An et al., 2013). O conteúdo de lipídeos pode ser modificado por alterações em condições de cultivo relacionadas com a pH (Hervé et al., 2012), temperatura (Chalifour e Juneau, 2011; Fukao et al., 2012),

salinidade (Cheng et al., 2013), concentração de nutrientes (Yang et al., 2014; Cheng et al., 2013; Yang et al., 2013) e intensidade luminosa (Devi et al., 2012).

A produção de biocombustíveis a partir de algas é dependente da produção de biomassa e do conteúdo lipídico. No entanto, tanto a biomassa quanto o acúmulo de lipídeos são limitados por vários fatores, sendo a demanda de nutrientes essencial nesse processo (Devi et al., 2012). Os efeitos de estresses causados por deficiência de nitrogênio (N), fósforo (P) e silício (Si) na produção de lipídeos têm sido estudados em diatomáceas (Lombardi e Wangersky, 1991; Chaffin et al., 2011; Chen, 2012). Quando a cultura é limitada por Si no meio ela pode cessar o crescimento, acumulando assim carbono na forma de triacilglicerol (TAG) em algumas espécies (Chaffin et al., 2011). Ao contrário do N, as reservas de Si dentro da célula são baixas (Traller e Hildebrand, 2013). A deficiência por outros nutrientes, como N, tem mostrado promover o acúmulo de lipídeos nessas microalgas, reprogramando todo metabolismo central e acumulando TAG (Obata et al., 2013). Apesar de vários estudos mostrarem a eficiência da limitação por N para acúmulos de TAG, alguns autores apontam o estresse por limitação de Si mais eficiente, levando as células a acumular lipídeos mais rapidamente (Adams e Bugbee, 2013; Lombardi and Wangersky, 1991).

O acúmulo de lipídeos pelas células é apenas uma parte que deve ser otimizada no cultivo de microalgas. Os meios de cultura sintéticos utilizados são onerosos e precisam ter o custo reduzido para viabilizar o cultivo em escala industrial. Assim, o uso de águas de efluentes industriais, agrícolas e águas de esgotos domésticos têm sido indicados como meios de cultura alternativos, capazes de diminuir o custo dos cultivos (Pittman et al., 2011). Assim, a combinação de meios de cultura a partir de águas

residuárias suplementadas com fertilizantes oferece vários benefícios tanto em termos de produção de biomassa quanto na minimização de impactos ambientais (Bhatnagar et al., 2010; Chinnasamy et al., 2010; Graham et al., 2011). Além disso, o uso dos nutrientes das águas residuárias nos meios de cultivo é um modo barato de produção de lipídeos por meio das microalgas permitindo a viabilização econômica do cultivo em larga escala (Valenzuela -Espinoza et al., 1999; Devi et al., 2012). Uma outra possibilidade para viabilização dos meios de cultura para produção de biomassa algal na indústria de biocombustíveis é a utilização de fertilizantes agrícolas no lugar de reagente agrícolas (Valenzuela -Espinoza et al., 1999; Raouf et al., 2006).

Assim, com o objetivo de potencializar o cultivo de diatomáceas para a produção de biomassa e lipídeos, fontes de nutrientes alternativas e de baixo custo foram avaliadas. Neste trabalho foram avaliadas diferentes doses de silicato de sódio e de ureia no cultivo de BR021 e BR022 em água de efluente residuário sobre a produção de biomassa e lipídeos totais utilizando DCCR.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Água de efluente residuário utilizada no experimento**

A água residuária utilizada neste estudo foi cedida pela Refinaria Gabriel Passos – Petrobrás, localizada na cidade de Betim (Minas Gerais, Brasil). O rejeito é composto de cerca de 99 % de água provinda do processo de refino do petróleo e 1 % de esgoto sanitário da refinaria. Esta água residuária foi proveniente de um processo de eletrólise reversa realizado pela própria refinaria. Entretanto, mesmo após este tratamento, a água ainda continha vários macronutrientes em concentrações conforme descrito na Tabela 1.

Para evitar o desenvolvimento de microorganismos a água foi armazenada a 4 °C até a realização dos experimentos.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da água residuária proveniente de efluente pré-tratado da Refinaria Gabriel Passos (Petrobrás), Betim/MG.

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Cálcio	724
Magnésio	273
Sódio	2.869
Potássio	642
Estrôncio	21,7
Bário	1,06
Amônia	3,75
Bicarbonato	1.482
Sulfato	1.265
Cloreto	5.291
Fluoreto	4,81
Nitrato	51,1
Fosfato	3,16
Sílica	29

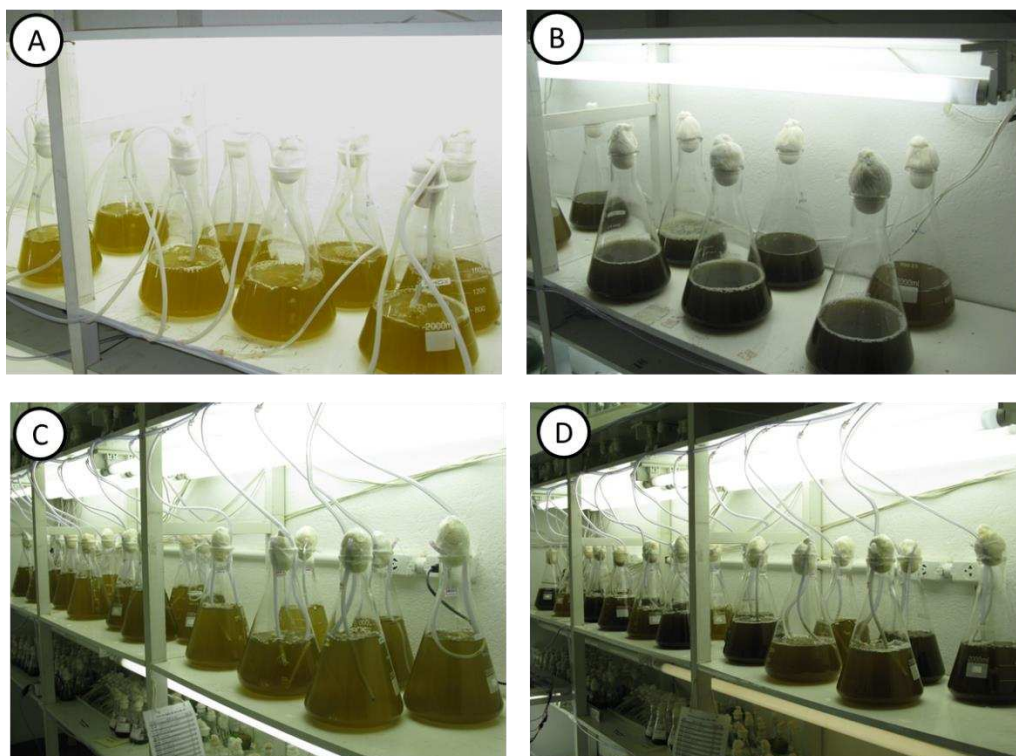
<b>Variáveis</b>	<b>Valor</b>
pH	8,14
TDS (*)	12.660 mg L <sup>-1</sup>
Condutividade	17.728 µS cm <sup>-1</sup>

\* Sólidos totais dissolvidos.

Durante o preparo do meio de cultivo, a água residuária foi suplementada com os nutrientes ausentes em sua composição, como Fe (20 mg FeCl<sub>3</sub>) e N (1,5 g de NaNO<sub>3</sub>). Em adição, diferentes doses de ureia fertilizante e silicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) foram adicionados conforme descrito na Tabela 2, sendo o pH do meio ajustado para 8 e o mesmo foi mantido durante o experimento.

## 2.2. Preparo do inóculo e condições de crescimento da cultura

As cepas de diatomáceas de água doce BR021 e BR022 foram obtidas da coleção de microalgas e cianobactérias do laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. A identificação das cepas foi baseada em caracteres morfológicos (Bicudo e Menezes, 2006). Estas cepas apresentam melhor adaptação crescendo em água residuária, por isso foram selecionadas. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de borosilicato com capacidade de 2000 mL, sendo utilizados 1200 mL de volume do frasco. Os frascos estéreis foram inoculados com 300 mL de cultura unialgal e incubados a  $24 \pm 2$  °C. O cultivo foi realizado em sala de crescimento composta por luzes fluorescentes com intensidade luminosa  $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com fotoper\u00edodo 16:8 (luz:claro). Inje\u00e7\u00f5es de ar comprimido contendo 0,5 % de  $\text{CO}_2$  (99 % de pureza) foram utilizadas no cultivo com um fluxo de 0,3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). O experimento teve dura\u00e7\u00e3o de 10 dias (Figura 1).



**Figura 1.** Cultivo da cepa de diatomácea (A e B) BR021 e (C e D) BR022 em água de efluente residuário (ARP) com diferentes doses de ureia e silicato de sódio. Em (A e C) refere-se ao primeiro dia de cultivo e (B e D) ao décimo dia.

### 2.3. Delineamento Experimental

Para a realização deste trabalho utilizou-se um esquema fatorial com ureia e silicato de sódio em diferentes níveis como fatores e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O DCCR é caracterizado como um fatorial  $2k$  com combinações de tratamentos  $2k$  adicionais denominadas pontos axiais e  $n_0$  de replicatas no centro do delineamento. O principal motivo de usar este desenho experimental foi prover o máximo de informações com o menor número de combinações. A propriedade de rotacionalidade desenvolvida para delineamento composto central requer a variância de valores estimados para serem constantes em pontos igualmente distantes do centro do delineamento (Dragone et al., 2011; Djoudi et al., 2007). Foram utilizados como fatores concentração de ureia (4 níveis) e concentração de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (6 níveis) (Tabela 2). No ponto central foram utilizadas 4 repetições para se estimar o erro. No planejamento foi utilizado um nível de significância de 0,05 (Penteado, 2010). Para determinar as combinações das concentrações de nitrato de sódio e de silicato de sódio a serem utilizadas foi utilizado o software Minitab 15 (Ryan et al., 2005) a partir de uma faixa de concentrações de ureia (200 a 400  $\text{mg L}^{-1}$ ) e silicato de sódio (200 a 600  $\text{mg L}^{-1}$ ) estabelecidas em experimentos prévios.

**Tabela 2.** Concentrações de ureia e de silicato de sódio utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Fator	Níveis (Valores codificados)				
	-2	-1	0	1	2
Ureia (mg L <sup>-1</sup> )	200	295	300	305	400
Silicato de Sódio (mg L <sup>-1</sup> )	200	390	400	410	600

Os resultados dos experimentos foram ajustados por uma equação polinomial de primeiro grau (equação 1) e também equações polinomiais de segundo grau (equação 2), conforme segue abaixo:

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_{ii} x_{ii} + \dots + \beta_{ij} x_{ij} + \varepsilon \quad (1)$$

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

em que,

$\hat{y}_i$  representa a variável resposta,  $\beta_0$  é o ponto de interseção,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são os coeficientes da regressão,  $n$  é o número de variáveis estudadas, e  $x_i$  e  $x_j$  representam as variáveis independentes.

O ajuste realizado teve sua qualidade expressa pela não significância da falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a significância estatística checada pelo teste F. O planejamento experimental e as análises estatísticas foram realizadas pelo software Minitab 15 (Ryan et al., 2005).

#### **2.4. Determinação das taxas de crescimento e produção de biomassa**

Durante os 3 primeiros dias de cultivo foram realizadas amostragens para avaliar a produção de massa seca a fim de representar a fase lag da curva de crescimento. A partir do quarto dia as amostragens foram realizadas de 2 em 2 dias até o final do experimento. A biomassa seca foi estimada por meio da absorbância no comprimento de onda de 750 nm (Chaffin et al., 2011) utilizando a curva de calibração pré-estabelecida (anexos 2 e 3).

Para quantificação de biomassa foram amostrados 30 mL de cultura ao término do experimento, sendo centrifugados a 11000 rpm por 10 minutos a 25 °C em tubos do tipo Falcon cujas massas foram previamente determinadas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram lavados duas vezes com mesmo volume de água deionizada. Posteriormente, os tubos com a biomassa fresca foram secos em estufa à 75 °C até atingir peso seco constante (cerca de 24 h) e pesados para obtenção da massa seca.

#### **2.5. Extração e quantificação de proteínas totais**

A extração de proteínas totais foi realizada conforme Meijer & Wijffels (1998). A quantificação foi realizada pelo método de Lowry adaptado por Lucarini & Kilikian (1999). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 750 nm. Utilizou-se albumina do soro bovino para construir a curva padrão. Os resultados foram expressos em porcentagem de proteínas totais em relação peso seco.

#### **2.6. Extração e quantificação de carboidratos neutros totais**

A quantificação de carboidratos neutros compreendeu duas etapas: (1) a extração de carboidratos intracelulares conforme Teoh et al. (2004), substituindo-se o HCl por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (2) Quantificação pelo método de Dubois adaptado por Masuko et al. (2005), utilizando-se glicose como padrão. Foi utilizado o comprimento de onda de 490 nm em leitora de microplacas. Os resultados foram expressos em porcentagem de carboidratos neutros totais em relação ao peso seco.

### **2.7. Extração e quantificação de lipídeos totais**

Os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Bligh & Dyer, utilizando metanol, clorofórmio e água na proporção de 2:2:0,8 (Smedes & Thomasen, 1996). Para rompimento das células foi utilizado um sonicador, com frequência de 19 kHz, durante 30 minutos (Ranjan et al., 2010). Durante a sonicação as amostras foram mantidas imersas em banho de gelo. Logo após, foi adicionado o 0,8 mL de água, necessária para a separação de fases e levou-se ao vortex para homogeneização por um minuto. Os frascos foram centrifugados e a fase apolar (clorofórmio e lipídeos) foi separada.

Na biomassa do pellet foi adicionada uma mistura de água e clorofórmio (1:1) para que quantidades residuais de lipídeos fossem recuperados. O material foi levado ao vortex por um minuto e logo após centrifugado. Novamente a fase apolar foi recuperada e foi realizada a evaporação do clorofórmio. Após a evaporação, o material foi mantido em estufa a 60 °C por até atingir peso constante e deixado em dessecador. O conteúdo de lipídeos foi determinado gravimetricamente.

### **2.8. Análise de Perfil de Ácidos Graxos**

Para avaliar a produção de ácidos graxos nas culturas foram realizadas extrações de esteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) e sua quantificação relativa. Para isso, foram pesados 10 mg de biomassa seca em tubos de ensaio com tampa. Adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de solução de HCl 5 % em metanol. Logo após foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  de solução metanol clorofórmio (1:3). A mistura foi aquecida a 85 °C por 1 hora. Após esfriar, foram adicionados 2 mL de hexano. Levou-se ao vortex e deixou-se separar as duas fases (fase superior: hexano; fase inferior: metanol). A fase superior foi retirada e reservada em vials para serem analisados.

Os FAMES foram analisados usando um cromatógrafo a gás (CG) (Shimadzu GC-2010) equipado com uma coluna HT-5 (25 m, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) (SGE, Texas, USA). Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  da amostra de FAME de modo direto com temperatura de 270 °C, 3 mL  $\text{min}^{-1}$  de fluxo de purga e fluxo inicial da coluna de 6,57 mL  $\text{min}^{-1}$  (85,7 cm  $\text{s}^{-1}$ , com pressão constante), utilizando He como gás de arraste. A temperatura do forno foi mantida constante a 80 °C por 3 minutos, aumentando a 12 °C por  $\text{min}^{-1}$  até alcançar 330 °C e então mantida por 2 min. A detecção conduziu-se usando um detector de chama ionizante (FID). A abundância relativa das diferentes classes de FAMES representou mais que 90 % do total das áreas integradas do pico para cada amostra (Laurens et al., 2012). Os padrões utilizados foram: ácido butírico (C4:0); ácido caprílico (C8:0); ácido undecanóico (C11:0); ácido laurico (C12:0); ácido mirístico (C14:0); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oléico (C18:1); ácido elaidico (C18:1 trans); ácido linoléico (C18:2); ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3); ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3); ácido araquídico (C20:0); ácido araquidônico (C20:4); ácido nervônico (C24:1 $\omega$ 9).

### 3. Resultados

Os resultados experimentais obtidos pela cultivo de BR021 e BR022 sob diferentes condições nutricionais baseado em um DCCR para dois fatores são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os resultados das regressões ajustadas podem ser visualizados por gráficos de curva de contorno (Figura 2 e 3).

Os modelos foram verificados quanto ao ajuste, a significância dos parâmetros da regressão e o coeficiente de determinação  $R^2$ . Os efeitos de segundo grau e a interação para as variáveis dependentes biomassa seca e lipídeos não foram significativos ( $p > 0,05$ ).

De uma maneira geral, observou-se uma elevada produção de biomassa nas concentrações mais altas de silicato de sódio combinadas com baixas concentrações de ureia (Figura 2 e 3).

**Tabela 3.** Valores das variáveis dependentes Massa Seca ( $\text{g L}^{-1}$ ), Lipídeos Totais (%), Proteínas Totais (%) e Carboidratos Totais (%) gerados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) apresentando como variáveis independentes Ureia e Silicato de Sódio no cultivo da diatomácea BR022. O valores codificados para ureia e silicato de sódio podem ser visualizados em valor absoluto na tabela 2.

Ordem	Variáveis Independentes		Variáveis dependentes			
	Ureia	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	Massa Seca ( $\text{g L}^{-1}$ )	Lipídeos Totais (%)	Proteínas Totais (%)	Carboidratos Totais (%)
1	0	0	0,71	35,22	17,66	27,52
2	2	-2	0,46	37,42	20,15	23,33
3	0	1	0,71	35,97	17,31	26,19
4	-2	-2	0,72	42,46	12,06	19,71
5	0	0	0,71	34,37	17,37	25,49
6	0	0	0,96	31,90	14,97	23,39
7	1	0	0,73	27,63	15,23	26,46
8	0	0	0,74	35,98	19,49	25,57
9	-1	0	0,81	41,32	17,63	27,18
10	-2	2	1,41	28,96	12,57	20,52
11	2	2	0,77	18,13	33,02	37,61
12	0	-1	0,67	30,26	20,37	31,83

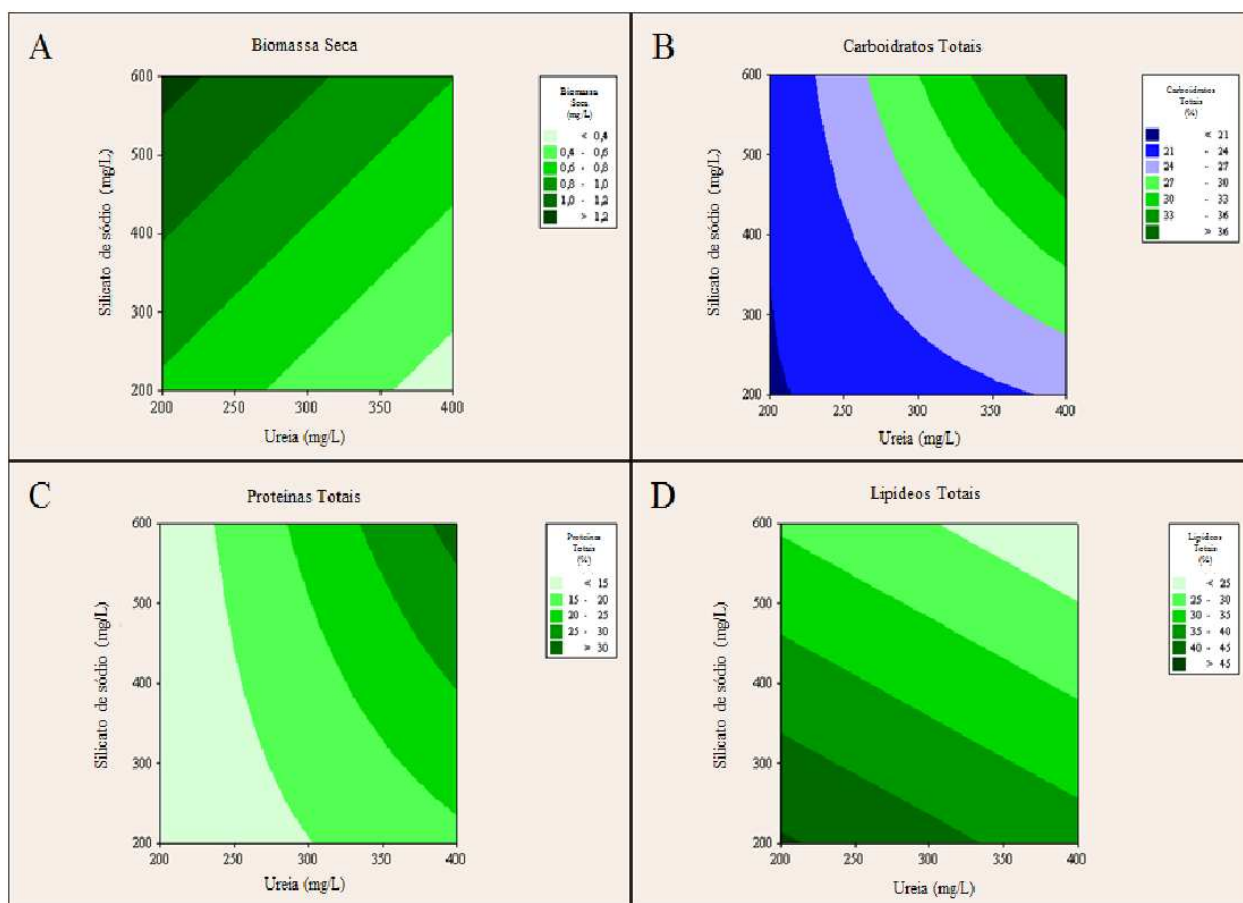
De acordo com a análise estatística realizada, ambos nutrientes são importantes na produção de biomassa, não apresentando interação significativa entre os dois nutrientes. Verifica-se que a produção de biomassa é diretamente proporcional a concentração de silicato de sódio e inversamente proporcional a concentração de ureia. A maior produção de biomassa seca foi observada no tratamento com 200 e 600  $\text{mg L}^{-1}$  de ureia e silicato de sódio, respectivamente, alcançando 786  $\text{mg L}^{-1}$  1.414  $\text{mg L}^{-1}$  (Tabelas 3 e 4) para BR021 e BR022 de biomassa produzida. Já no tratamento com 400 e 200  $\text{mg L}^{-1}$  de ureia e silicato de sódio, respectivamente, foi observada a menor produção de biomassa 359  $\text{mg.L}^{-1}$  e 458  $\text{mg L}^{-1}$  (Tabelas 3 e 4) para as cepas BR021 e BR022, respectivamente.

**Table 4.** Valores das variáveis dependentes Massa Seca ( $\text{g L}^{-1}$ ), Lipídeos Totais (%), Proteínas Totais (%) e Carboidratos Totais (%) gerados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) apresentando como variáveis independentes Ureia e Silicato de Sódio no cultivo da diatomácea BR021. O valores codificados para ureia e silicato de sódio podem ser visualizados em valor absoluto na tabela 2.

Ordem	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes			
	Ureia	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	Massa Seca ( $\text{g L}^{-1}$ )	Lipídeos Totais (%)	Proteínas Totais (%)	Carboidratos Totais (%)
1	0	0	0,55	9,96	33,16	42,26
2	0	0	0,54	11,77	33,52	42,02
3	0	1	0,60	9,17	33,36	39,21
4	0	-1	0,50	11,50	34,85	41,23
5	0	0	0,52	8,96	33,85	43,62
6	-2	2	0,79	12,77	30,96	39,07
7	1	0	0,59	10,64	32,77	46,26
8	-1	0	0,60	10,68	33,14	48,05
9	0	0	0,58	9,13	33,56	40,19
10	2	-2	0,36	8,71	33,91	44,30
11	-2	-2	0,53	11,39	33,89	52,53
12	2	2	0,60	9,88	34,22	50,27

O modelo de regressão linear para biomassa seca, segundo os resultados da análise de variância, se ajustou aos dados experimentais com um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,89$  e  $R^2 = 76,1$  para BR021 e para BR022, respectivamente.

Os resultados obtidos a partir da quantificação dos componentes celulares estão descritos na Tabela 3 e 4. Nela são indicadas as porcentagens de carboidratos totais, proteínas totais e lipídeos totais que foram utilizados para montar os gráficos de contorno (Figuras 2 e 3).

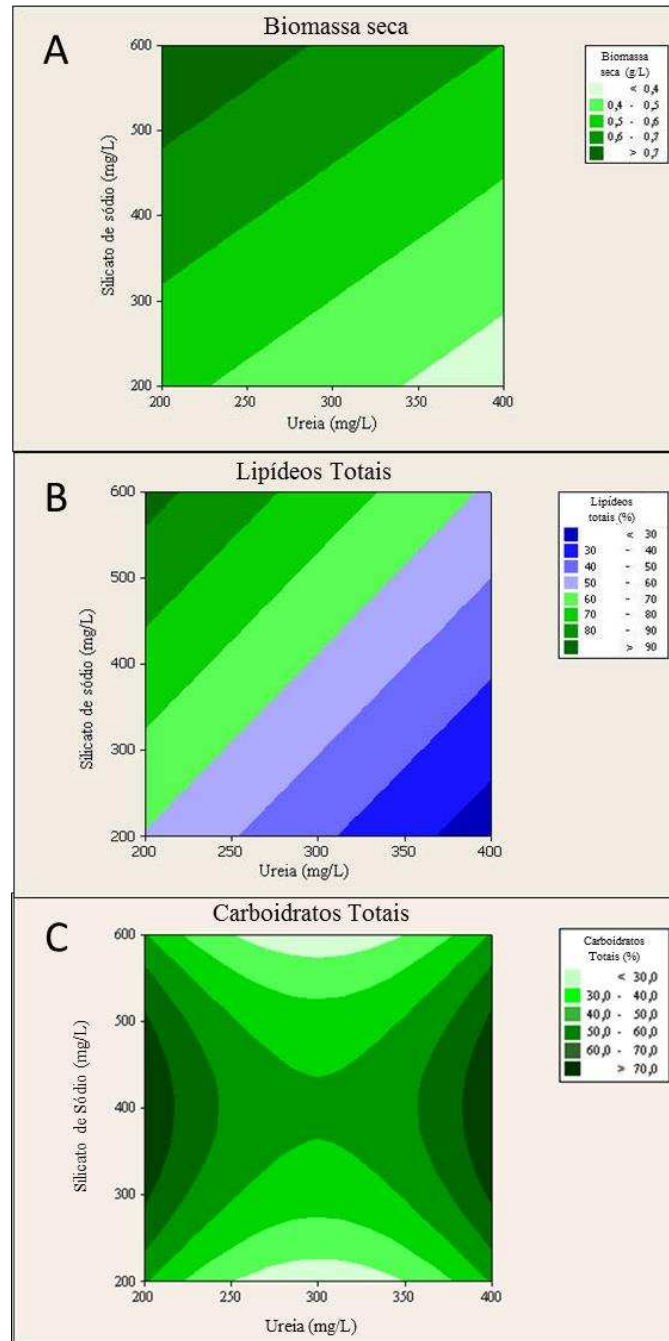


**Figura 2.** Curva de contorno para as variáveis dependentes (A) - Biomassa Seca ( $g L^{-1}$ ), (B) - Carboidratos Totais (%), (C) – Proteínas Totais (%) e (D) Lipídeos Totais (%) quantificados no final de 10 dias de cultivo de BR022 em diferentes doses de silicato e ureia em DCCR. Os valores representados na legenda indicam a porcentagem de carboidratos por massa seca. As faixas coloridas representam intervalos de valores especificados conforme cada legenda.

Uma vez que as duas cepas de microalgas podem apresentar características fisiológicas e metabólicas diferentes uma da outra, optou-se por realizar um estudo inicial de triagem das variáveis selecionadas. Assim verificou-se a existência de efeito significativo na produção de lipídios nas duas microalgas associadas a diferentes combinações de doses de ureia e silicato de sódio (Figura 2D e 3B). Desta forma, o DCCR permite indicar a concentração de silicato de sódio e ureia que proporcionariam os melhores resultados das variáveis desejadas.

Na análise para determinação de carboidratos totais, observou-se interação significativa entre os nutrientes ureia e silicato de sódio no material amostrado para a cepa BR021. O modelo de regressão ajustado aos dados teve como resposta uma parábola. Desta forma, deve-se observar as regiões com maiores e menores concentrações de ureia. Tomando como exemplo a Figura 2B, maiores percentuais de carboidratos estão na região mediana da faixa de concentrações (200 a 600 mg L<sup>-1</sup> de silicato de sódio) selecionada para o experimento. Assim, com o uso de maiores e menores doses de silicato de sódio no meio de cultura pode-se observar menor produção de carboidratos. De acordo com os resultados da análise de variância, o modelo de regressão linear quadrática se ajustou aos dados experimentais com um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,87$ . Para se obter o ponto ótimo de produção de carboidratos em uma situação como esta, deveria se buscar novas faixas de concentrações de ureia e silicato de sódio para saber em que região o percentual de carboidratos é maior.

Para a cepa BR022, observou-se que a quantidade de carboidratos tende a ser mais elevada nas concentrações altas de uréia combinadas com altas concentrações de silicato de sódio (Figura 2B). O maior valor observado, próximo a 38 % da massa seca, foi no tratamento de 400 e 600 mg L<sup>-1</sup> de ureia e silicato de sódio, respectivamente. O modelo ajustado para esta variável de BR022 conseguiu explicar em torno de 73 % das respostas geradas pela análise.



**Figura 3.** Curva de contorno para as variáveis dependentes (A) - Biomassa Seca ( $\text{g L}^{-1}$ ), (B) Lipídeos Totais (%) e (C) Carboidratos Totais (%) quantificados no final de 10 dias de cultivo de BR021 em diferentes doses de silicato e ureia em DCCR. Os valores representados na legenda indicam a porcentagem de carboidratos por massa seca. As faixas coloridas representam intervalos de valores especificados conforme cada legenda.

Os dados que foram obtidos para proteínas em BR021 não se ajustaram significativamente a um modelo. No entanto, as respostas de proteínas totais para cepa BR022 foram ajustadas a um modelo polinomial quadrático ( $R^2 = 84,2$ ). Neste modelo foi observado que tanto nas maiores concentrações de silicato de sódio quanto nas maiores de ureia foram encontrados os maiores valores de proteínas (33 % da massa seca), coincidindo com a mesma tendência encontrado para carboidratos para esta mesma cepa.

Nas respostas observadas na cepa BR 022 para produção de lipídeos totais, não foram observadas diferenças entre as doses de ureia. No entanto, as concentrações de silicato de sódio diferiram na produção deste conteúdo celular (Figura 2D e Tabela 3). Nos meios em que as doses de silicato de sódio foram menores, o conteúdo de lipídeos totais foi maior, como acontece no tratamento com 200 e 200 mg L<sup>-1</sup> e 200 e 600 mg L<sup>-1</sup>, de ureia e silicato de sódio respectivamente, em que se observou 42 % e 37 % de lipídeos por massa seca (Tabela 2 e Figura 2D).

Nas respostas lipídicas encontradas nos tratamentos realizados na cepa BR021, os maiores percentuais foram encontrados nas menores doses de ureia e maiores de silicato de sódio (200 e 600 mg L<sup>-1</sup> de ureia e silicato de sódio, respectivamente), que apresentou em torno de 12 % de lipídeo por massa seca (Tabela 4 e Figura 2B). Ambas variáveis foram significativas na produção de lipídeos, sendo que o modelo explica 82 % das respostas geradas.

## Perfil de ácidos graxos

Alterações ecofisiológicas podem acarretar a alteração destas características. Neste trabalho foram observados os ácidos graxos com maior abundância relativa nas duas cepas BR021 e BR022 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Perfil dos ácidos graxos mais abundantes (% da abundância relativa) nas cepas de diatomáceas BR021 e BR022 nas diferentes combinações de ureia e silicato de sódio. Os tratamentos gerados pelo DCCR são descritos na tabela 2.

Ácido Graxo	Cepa	Tratamentos gerados pelo DCCR								
		0: 0	+2: - 2	0: +1	-2: -2	+1: 0	-1: 0	-2: +2	+2: +2	0: -1
C14:0	BR021	22,0	13,6	24,7 0	22,0	24,8	22,7	21,4	17,6	22,9
	BR022	6,3	6,4	6,14	6,67	5,22	6,0	5,7	5,6	6,7
C16:0	BR021	26,3	32,5	23,9	22,0	23,9	27,9	19,9	33,4	22,2
	BR022	47,5	46,6	43,8 0	43,41	43,86	34,0	43,8	40,2	40,5
C16:1	BR021	15,9	10,9	15,7 1	18,0	16,0	15,0	20,7	13,6	12,9
	BR022	43,6	43,2	44,6	44,49	42,59	45,0	40,4	39,3	40,9
C18:0	BR021	3,2	8,1	3,5	2,2	3,5	5,1	1,9	9,5	1,7
	BR022	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 cis	BR021	11,8	16,8	9,9	9,4	11,0	9,3	4,9	8,7	13,8
	BR022	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 trans	BR021	5,6	2,2	7,2	4,4	5,8	5,4	6,6	4,4	6,7
	BR022	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:X	BR021	6,8	3,2	8,3	5,9	7,2	6,3	7,0	6,2	8,8
	BR022	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*A letra X no ácido graxo C22:X, refere-se ao número de insaturações que é desconhecido.

De forma geral, os ácidos graxos mais abundantes nas duas cepas foram C14:0,

C16:0 e C16:1. Percebe-se que as duas cepas produzem quantidades distintas de certos ácidos graxos, como por exemplo, C14:0, presente nas duas mas em proporções diferentes. Além disso, C18:0, C18:1cis e C18:1trans que são incluídos no perfil da cepa BR021 não foram calculados para BR022 devido aos picos estarem abaixo do limite de detecção do aparelho (Figura 4A e 4B). A cepa BR022 apresentou maior abundância de ácidos graxos saturados (C14:0 e C16:0) em comparação ao encontrado em BR021 que apresentou um equilíbrio entre ácidos graxos saturados e insaturados (C16:0 e C16:1) (Tabela 5).

#### **4. Discussão**

Na busca por matérias-primas para a produção de biocombustíveis, o uso de microalgas ganha interesse quando seu cultivo é realizado de forma alternativa. O uso de águas residuárias como meio de cultura tem sido apontado como uma interessante alternativa, uma vez que algumas cepas de microalgas conseguem se desenvolver utilizando os nutrientes presentes nessa água (Cai et al., 2014). Adicionalmente, cultivo de microalgas em água de efluente residuário pode ser considerada uma maneira de tratar águas residuais. No presente trabalho, as duas cepas de diatomáceas BR021 e BR022 apresentaram resultados de crescimento satisfatórios em água proveniente de efluente de indústria petroquímica (Figuras 2A e 3A), uma vez que obtiveram produção de biomassa com valor superior (BR022) ou semelhante (BR021) ao obtido em meio de cultura BG11 (Anexo I) sob as mesmas condições. Graham et al. (2011) reportam resultados positivos no cultivo de quatro espécies de diatomáceas (Aulacoseira, Cyclotella, Fragilaria e Synedra) em meio eutrofizado associado a águas residuárias a fim de aumentar a concentração de biomassa algal e diminuir a concentração de P e N

na água, além de reduzir o custo do cultivo.

A alteração na produção de biomassa e também de componentes celulares em diatomáceas devido a fatores ecofisiológicos é específica para cada espécie, o que dificulta generalizações (Chen, 2012). Nas respostas encontradas em BR022, a produção de biomassa teve padrão semelhante ao de BR021. Uma vez que em menores doses de ureia e em maiores doses de silicato de sódio foram observados os maiores valores para essa variável.

Devido a parede celular das diatomáceas serem formadas por sílica amorfa a presença de silicato na divisão celular é imprescindível para a maioria das espécies. A ausência de Si no meio de cultura pode fazer com que a célula pare o crescimento, não realizando divisão celular até o momento em que a disponibilização de Si seja reestabelecida no meio (Shrestha et al., 2012; Gilpin et al., 2003). Em ambas as cepas utilizadas verificou-se que baixas doses de Si proporcionam baixo crescimento celular e como consequência baixa produção de biomassa seca.

Tem se observado que a manipulação das concentrações dos nutrientes nos meios de cultura permite modular respostas em termos de conteúdos celulares de microalgas (Devi et al., 2012). No cultivo de *Fragilaria capucina* com diferentes doses de N e Si o conteúdo de lipídeos foi afetado pelas concentrações dos dois nutrientes. Baixos conteúdos lipídicos foram observados em tratamentos com altas doses desses nutrientes, variando de 15 % a 18 % do peso seco. Baixas concentrações de N e Si levaram ao acúmulo de lipídeos, sendo encontrados 33 % em *F. capucina*. As respostas observadas no cultivo de BR022 foram semelhantes ao relatado na literatura quanto à limitação de Si e N. As diferentes concentrações de ureia afetaram a produção de lipídeos, mas os

tratamentos com doses mais baixas de Si (200 e 200 mg L<sup>-1</sup> de ureia e de silicato de sódio, respectivamente) proporcionaram culturas com maiores teores de lipídeos, chegando a produzir 42 % (Tabela 3).

As curvas de contorno da cepa BR021 (Figura 3), sugerem que as dosagens de ureia foram baixas o suficiente para surtir mudanças em seu metabolismo, produzindo maior porcentagem lipídica em menores concentrações de ureia. A produção de biomassa e de lipídeos foram maiores em altas doses de Si e baixas doses de N. No entanto, valores de proteínas totais não tiveram alterações significativas para esta mesma cepa (Tabela 3), não sendo possível ajustar um modelo para este parâmetro. Algumas diatomáceas tem a capacidade de não sofrer com as alterações no meio. Palmucci et al. (2011) puderam observar tal comportamento com *T. pseudonana* e *D. parva*, que não alteraram muito o seu metabolismo mesmo quando crescendo em meio pobre em N. Este fato levanta a hipótese de que exista uma alta plasticidade nessas diatomáceas, podendo especular que espécies com tal comportamento tenham um eficiente reaproveitamento de N via ciclo da ureia (Allen et al., 2011; Obata et al., 2013).

A partir dos resultados obtidos para a cepa BR022 fica mais claro como as alterações no metabolismo ocorreram. A baixa dose de N, foi a principal responsável pela baixa produção de proteínas (Figura 2C). A limitação de N pode desencadear nas células uma baixa síntese de aminoácidos, e conseqüentemente menor síntese proteica. Esta condição induz uma reprogramação metabólica que leva a redução no crescimento e maior acúmulo de reservas (Guerra et al., 2013). Algumas microalgas direcionam o metabolismo para acúmulo de açúcar, no caso das diatomáceas na forma de crisolaminarina (Bertozzin et al., 2013). No entanto outras acumulam lipídeos,

principalmente com triacilgliceróis (TAG) (Hu et al., 2008; Yang et al., 2013; Yang et al., 2014). Para a cepa BR022 verificou-se acúmulo lipídeos e menor reserva na forma de açúcares quando cultivada sob limitação de N (Figuras 2B e 2D).

As cepas BR021 e BR022 responderam a diferentes estímulos nutricionais na produção de lipídeos, sendo BR021 estimuladas por menores doses de N, chegando a produzir 12 % de lipídeos, e BR022 por menores doses de Si, chegando a produzir 42 % de lipídeos. Relatos na literatura para a cepa *Skeletonema marinoi* cultivada em diferentes concentrações de nitrato reportam que a concentração de lipídeos neutros para essa espécie somente alteraram quando ela foi cultivada sem fonte de N. Essa cepa chegou a produzir cerca de 25 % de lipídeos com 15 dias de cultivo, aos 10 dias de cultivo ela chegou a produzir 15-17% (Bertozzini et al., 2013). Para a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* a privação por N aumentou de 24 % para 53 % de lipídeos (Yang et al., 2013). *F. capucina* quando cultivada em meio limitante por Si e N teve aumento de cerca de 15 % para mais de 30 % na produção de lipídeos (Chaffin et al., 2011).

No entanto, não é apenas a porcentagem lipídica que dirá a viabilidade de uma espécie, é necessário checar se a concentração lipídica também é alta. Esta variável depende diretamente da biomassa produzida. Ao utilizar ureia como fonte nitrogenada para cultivo de *Chlorella vulgaris*, Hsieh e colaboradores (2009) verificaram que a dose de 100 mg L<sup>-1</sup> de ureia foi limitante para a geração de biomassa algal. No entanto, esta dosagem de ureia foi interessante no acúmulo de lipídeos, sendo que a alga apresentou maior concentração lipídica na dosagem de 100 mg L<sup>-1</sup> do que na de 200 mg L<sup>-1</sup>, sendo que esta última gerou mais biomassa. De maneira semelhante, em BR022 a maior

concentração lipídica foi registrada no tratamento que proporcionou maior quantidade de biomassa por litro de cultivo, ou seja, no tratamento de 200 e 600 mg L<sup>-1</sup> de ureia e silicato de sódio, respectivamente. No entanto, nesse tratamento foi observado rendimento de lipídeo intermediário (28,9%). Contudo, para o cultivo de BR021 as porcentagens de lipídeos e concentração lipídica seguiram a mesma tendência. O tratamento que proporcionou maiores teores lipídicos (200 e 600 mg L<sup>-1</sup> de ureia e silicato de sódio, respectivamente) para a microalga também proporcionou maior quantidade de biomassa (Tabelas 3 e 4).

## **5. Conclusões**

Dentre as dificuldades encontradas para a utilização de diatomáceas em escala industrial, destaca-se o valor de meios de cultura sintéticos. Além de valores reduzidos nos meios de cultura é necessário que a produtividade lipídica diária seja suficiente, para tornar o cultivo economicamente viável. Neste estudo verificou-se que as cepas BR021 e BR022 são capazes de produzir biomassa em meios de cultura elaborados a partir de água residuária provinda de efluente pretoquímico. Assim, este estudo demonstra que o uso de águas residuárias para o cultivo de diatomáceas pode ser uma alternativa como meio de cultura para diatomáceas. Por outro lado, observa-se o aumento na produção de lipídeos está muito associado baixa disponibilidade de nutrientes na fase estacionária do cultivo. Apesar da cepa BR021 demonstrar geração de biomassa equivalente a produzida em meio sintético BG11, a produção de lipídeos foi baixa (12 %) mesmo nos tratamentos com baixa concentração de ureia. Segundo Chisti (2008) a porcentagem que torna uma microalga viável para produção de biodiesel deve

ser acima de 30 %, enquanto que BR022 apresentou 42 % de lipídeos em baixas concentrações de silicato de sódio e ureia.

No entanto o acúmulo de biomassa ocorre em meio com maiores concentrações de nutrientes. Como foi verificado para as duas cepas, tanto N como Si influenciam a produção de lipídeos. Em adição, no presente trabalho observou-se que a cepa BR022 possui um maior potencial para a produção de biomassa e de lipídeos em relação a BR021. Sendo assim, a cepa BR022 pode ser indicada para trabalhos futuros visando produção de lipídeos para a produção de biodiesel.

## 6. Referências citadas

- Adams C, Bugbee B (2013) Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. **Journal of Applied Phycology** 26:1351-1357. doi: 10.1007/s10811-013-0156-7.
- Allen AE, Dupont CL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR, Bowler C (2011) Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. **Nature** 473:203-207. doi:10.1038/nature10074.
- An M, Mou S, Zhang X, Ye N, Zheng Z, Cao S, Xu D, Fan X, Wang Y, Miao J (2013) Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress **Bioresource Technology** 134:151-157. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.142.
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, et al. (2004) The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. **Science** 306:79-86. doi: 10.1126/science.1101156.
- Bertozzini E, Galluzzi L, Ricci F, Penna A, Magnani M (2013) Neutral lipid content and biomass production in *Skeletonema marinoi* culture in response to nitrate limitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 170:1624–1636. doi: 10.1007/s12010-013-0290-3
- Bhatnagar A, Bhatnagar M, Chinnasamy S, Das KC (2010) *Chlorella minutissima* — A promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 161:523-536. doi:10.1007/s12010-009-8771-0. 2010.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** 37:911-917.
- Bicudo CEM, Menezes M (2006) **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições**, 2ª ed. São Carlos, São Paulo.
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, et al. (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature** 456:239-244. doi:10.1038/nature07410.
- Bozarth A, Maier AG, Zauner S. (2009) Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 82:195–201. doi 10.1007/s00253-008-1804-8.
- Cai T, Park SY, Li Y (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 19:360-369. doi: org/10.1016/j.rser.2012.11.030

Chaffin JD, Mishra S, Kuhaneck RM, Heckathorn SA, Ridgeman TB (2012) Environmental controls on growth and lipid content for the freshwater diatom, *Fragilaria capucina*: A candidate for biofuel production. **Journal of Applied Phycology** 24:1045-1051. doi:10.1007/s10811-011-9732-x.

Chalifour A, Juneau P (2011) Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. **Aquatic Toxicology** 103:9-17. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.016

Chen YC (2012) The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. **Food Chemistry** 131:211-219. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.062.

Cheng RL, Feng J, Zhang BX, Huang Y, Cheng J, Zhang CX (2013) Transcriptome and gene expression analysis of an oleaginous diatom under different salinity conditions. **BioEnergy Research** 7:192-205. doi:10.1007/s12155-013-9360-1

Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt WH, Das KC (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology** 101:3097-3105. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.026.

Devi MP, Subhash GV, Mohan SV(2012) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy** 43: 276-283. doi:10.1016/j.renene.2011.11.021.

Djoudi W, Aissani-Benissad F, Bourouina-Bacha S (2007). Optimization of copper cementation process by iron using central composite design experiments. **Chemical Engineering Journal** 133:1-6. doi:10.1016/j.cej.2007.01.033

Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA (2011) Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy** 88:3331-3335. doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.012

Fields MW, Hise A, Lohman EJ, Bell T, Gardner RD, et al. (2014) Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation **Applied Microbiology and Biotechnology**. doi:10.1007/s00253-014-5694-7

Fukao T, Kimoto K, Kotani Y (2012) Effect of temperature on cell growth and production of transparent exopolymer particles by the diatom *Coscinodiscus granii* isolated from marine mucilage. **Journal of Applied Phycology** 24:181-186. doi:10.1007/s10811-011-9666-3

Gilpin LC, Davidson K, Roberts E (2004) The influence of changes in nitrogen: silicon ratios on diatom growth dynamics. **Journal of Sea Research** 51:21–35. doi:10.1016/j.seares.2003.05.005

Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS, Sterrenburg FAS (2009) The glass menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. **Trends in Biotechnology** 27:116-127. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.003

Graham JM, Graham LE, Zulkifly SB, Pflieger BF; Hoover SW, Yoshitani J (2012) Freshwater diatoms as a source of lipids for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 39:419-28. doi:10.1007/s10295-011-1041-5.

Guerra LT, Levitan O, Frada MJ, Sun JS, Falkowski PG, Dismukes GC (2013) Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Biomass and Bioenergy** 59:306-315. http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.007.

Hervé V, Derr J, Douady S, Quinet M, Moisan L, Lopez PJ (2012) Multiparametric analyses reveal the pH-dependence of silicon biomineralization in diatoms. **PLoS One** 7:e4672. doi:10.1371/journal.pone.0046722

Hossain ABMS, Salleh A, Boyce AN, Chowdhury P, Naquiuddin M (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** 4:250-254. doi:10.3844/ajbbbsp.2008.250.254

Hsieh CH, Wu WT (2009) Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology** 100:3921-3926. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.019.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal** 54:621–63. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

Huang G, Chen F, Weic D, Zhang X, Chen G (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy** 87:38-46. doi:10.1016/j.apenergy.2009.06.016

Laurens LM, Quinn M, Van Wychen S, Templeton DW, Wolfrum EJ (2012) Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 403:167-178. doi: 10.1007/s00216-012-5814-0

Li Q, Du W, Li D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology** 80:749-0756. doi: 10.1007/s00253-008-1625-9

Lombardi T, Wangersky PJ (1991) Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series** 77:39-47

Lucarini AC, Kilikian BV (1999) Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques** 13:149-154. doi: 10.1023/A:1008995609027

Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry** 339:69 -72. doi:10.1016/j.ab.2004.12.001.

Meijer EA, Wijffels RH (1998) Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of microalgae. **Biotechnology Techniques** 12:353-358. doi:10.1023/A:1008814128995.

Mekhalfi M, Amara S, Robert S, Carrière F, Gontero B (2014) Effect of environmental conditions on various enzyme activities and triacylglycerol contents in cultures of the freshwater diatom, *Asterionella formosa*(Bacillariophyceae). **Biochimie** 101:21-30. doi: 10.1016/j.biochi.2013.12.004.

Mettler T, Mühlhaus T, Hemme D, Schöttler MA, Rupprecht J (2014) Systems analysis of the response of photosynthesis, metabolism, and growth to an increase in irradiance in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Cell**. doi/10.1105/tpc.114.124537

Nurachman Z, Hartati, Anita S, Anward EE, Novirani G, Mangindaan B, Gandasasmita S, Syah YM, Panggabean LMG, Suantika G (2012) Oil productivity of the tropical marine diatom *Thalassiosira* sp. **Bioresource Technology** 108:240–244. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.082

Palmucci M, Ratti S, Giordano M (2011) Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: A fourier transform infrared spectroscopy approach. **Journal of Phycology** 47:313-323. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x

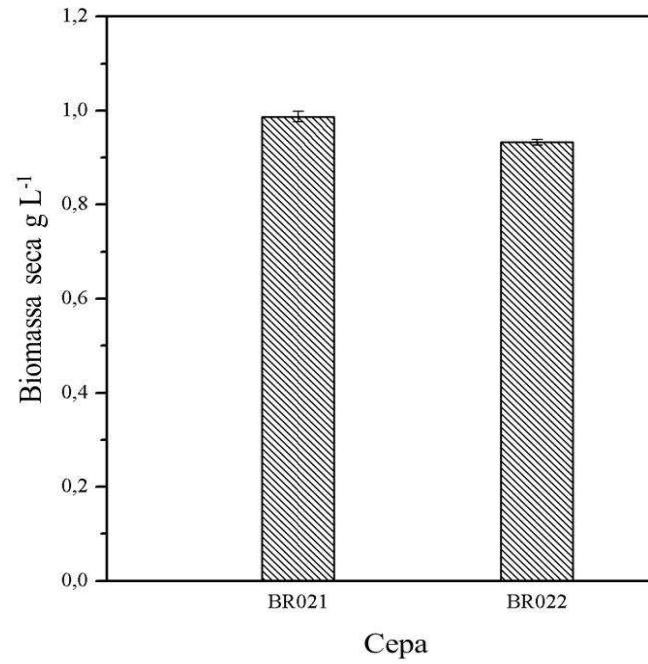
Pittman JK, Dean AD, Osundeko O (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology** 102:17–25. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.035. 2011.

Obata T, Fernie AR, Nunes-Nesi A (2013) The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. **Metabolites** 3:325-346. doi:10.3390/metabo3020325.

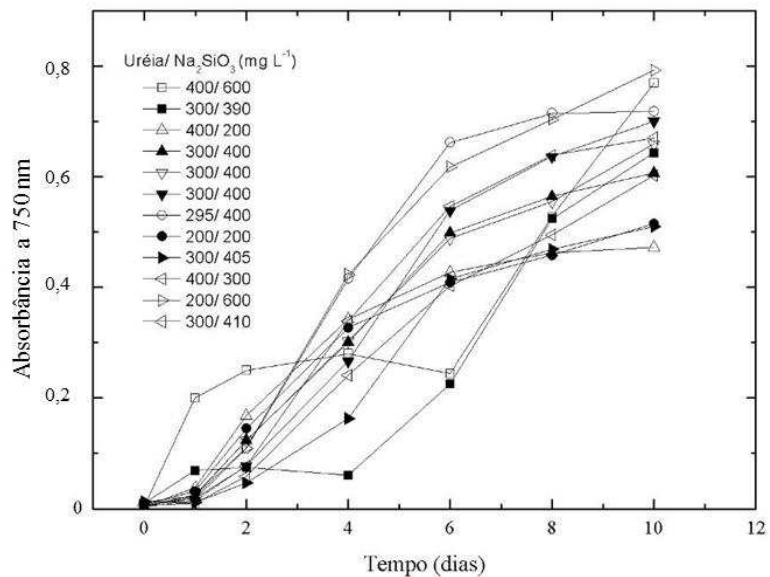
Ranjan A, Patil C, Moholkar SV (2010) Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research** 49:2979-2985. doi: 10.1021/ie9016557

- Raof B, Kaushik BD, Prasanna R (2006) Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass and Bioenergy** 30:537-542. doi:10.1016/j.biombioe.2005.09.006. 2006.
- Ryan B, Joiner B, Cryer J (2005) **Minitab Handbook**. Thomson Brooks/Cole. Australia New Zealand. 528p.
- Shrestha RP, Tesson B, Norden-Krichmar T, Federowicz S, Hildebrand M, Allen AE (2012) Whole transcriptome analysis of the silicon response of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **BMC Genomics** 13:499.
- Smedes F, Thomassen T K (1996) Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin** 32:681–688. doi:dx.doi.org/10.1016/0025-326X(96)00079-3.
- Teoh ML, Chu WL, Marchant H, Phang SM (2004) Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. **Journal of Applied Phycology** 16:421-430. doi:10.1007/s10811-004-5502-3.
- Traller JC, Hildebrand M (2013) High throughput imaging to the diatom *Cyclotella cryptica* demonstrates substantial cell-to-cell variability in the rate and extent of triacylglycerol accumulation. **Algal Research** 2:244-252. doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.003
- Valenzuela-Espinoza E, Millán-Núñez R, Cebrero-Núñez F (1999) Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**. 20:135-147. doi:10.1016/S0144-8609(99)00011-4.
- Yang ZK, Niu YF, Ma YH, Xue J, Zhang MH, Yang WD, Liu JS, Lu SH, Guan Y, Li H (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. **Biotechnology for Biofuels**, 6:67. doi:10.1186/1754-6834-6-67
- Yang ZK, Ma YH, Zheng JW, Yang WD, Liu JS, & Li HY (2014) Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Applied Phycology** 26:73-82. doi 10.1007/s10811-013-0050-3

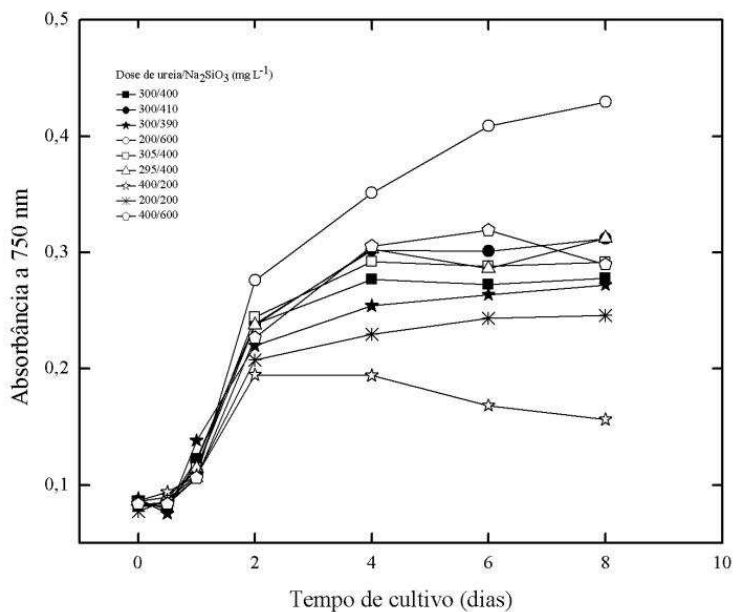
## 7. Anexos



**Anexo I.** Produção de biomassa nas cepas BR021 e BR022 cultivadas em meio de cultura sintético BG11, com aeração enriquecida de 0,5 % de CO<sub>2</sub>.



**Anexo 2.** Acompanhamento do crescimento de BR022 (biomassa seca) cultivada em ARP sob diferentes doses de ureia fertilizante e silicato de sódio, com suplementação de CO<sub>2</sub> a 0,5%, em função do tempo. O experimento foi montado em DCCR.



**Anexo 3.** Crescimento de BR021 cultivada em ARP sob diferentes doses de ureia fertilizante e silicato de sódio, com suplementação de CO<sub>2</sub> a 0,5%, em função do tempo. O experimento foi instalado como DCCR.

## CONCLUSÃO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi buscar informações metabólicas e fisiológicas para obter-se uma visão do comportamento de cepas de diatomáceas em limitação de N, e a capacidade delas de crescerem em água residuária utilizando uma fonte nitrogenada alternativa e com diferentes doses de silicato de sódio.

No primeiro experimento foi observado que em tratamentos com deficiência de N as taxas fotossintéticas assim como a abundância de lipídeos de membrana do tilacóide diminuíram (MGDG, DGDG) nas duas cepas. Concomitantemente, os lipídeos de reserva TAGs aumentaram em ambas cepas, acúmulo esse mais pronunciado na BR006. A menor abundância de aminoácidos de cadeia ramificado em tratamentos sem N sugerem que a degradação destes aminoácidos ocorra para gerar compostos reduzidos nas vias alternativas de fornecimento de elétrons para alimentar a cadeia de transporte de elétrons aumento o tempo de vida útil da célula. Ao mesmo tempo, a degradação de carboidratos está fornecendo intermediários para metabolismo central. Para todos os parâmetros avaliados a cepa BR022 apresentou menores alterações, sugerindo que esta cepa possui um sistema de reaproveitamento de N mais eficiente do que BR006.

No segundo experimento foi possível observar que o cultivo de diatomáceas em águas residuárias pode ser uma alternativa aos meios de cultura sintéticos. Dentre as duas cepas estudadas, BR021 mostrou maiores quantidades de biomassa e lipídeos em doses altas de silicato e baixas doses de ureia (600 e 200 mg L<sup>-1</sup>), sintetizando 12 % de lipídeos e 0,78 g de biomassa por litro de cultivo. Por outro lado, a cepa BR022 teve comportamento diferente, acumulando mais lipídeos (42 %) em doses mais baixas de

silicato ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e não tendo influência da ureia na produção lipídica. Apesar disso, deve-se levar em conta que baixa concentração de silicato acarreta baixa produção de biomassa. Desta forma, a melhor produção de lipídeo por biomassa são encontrados nos tratamentos com doses  $200$  e  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de ureia e silicato de sódio, respectivamente, sendo encontrados  $28 \%$  de lipídeos e  $1,4 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa.