

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

RINAMARA MARTINS ROSA

**ASPECTOS METABÓLICOS E CRESCIMENTO EM *Nitzschia palea* SOB
DIFERENTES FONTES DE SILICATO**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2016**

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

T

Rosa, Rinamara Martins, 1992-
R788a Aspectos metabólicos e crescimento em *Nitzschia palea* sob
2016 diferentes fontes de silicato / Rinamara Martins Rosa. – Viçosa,
MG, 2016.
viii, 63f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Diatomáceas - Cultivo. 2. Silício . I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 579.85

RINAMARA MARTINS ROSA

**ASPECTOS METABÓLICOS E CRESCIMENTO EM *Nitzschia palea* SOB
DIFERENTES FONTES DE SILICATO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e

Classificação da Biblioteca Central da UFV

RINAMARA MARTINS ROSA

**ASPECTOS METABÓLICOS E CRESCIMENTO EM *Nitzschia palea* SOB
DIFERENTES FONTES DE SILICATO**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2016

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Wagner L. Araújo

Adriano Nunes Nesi
(Orientador)

*Dedico este trabalho,
Aos meus pais, Carmem e Mário
O incentivo e a razão de tudo.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela estrutura cedida desde o período de graduação;

Ao CNPq, pela concessão das bolsas durante o período do mestrado;

Ao Prof. Adriano Nunes Nesi, que confiou e apoiou o meu trabalho subsidiando o meu desenvolvimento enquanto acadêmica;

Ao Prof. Marcio Arêdes, que além de ceder o espaço de seu laboratório contribuiu academicamente com este trabalho;

Aos funcionários da UCP e demais colegas de trabalho, pela convivência proximidade que fizeram o decorrer desta etapa mais agradável;

Aos amigos que trabalharam na Ficologia durante estes mais de 6 anos que me encontro na área, cada um de vocês é responsável por uma parte da formação que culmina neste trabalho. Em especial Mariana, Dora e Marcelo, que principalmente durante o mestrado, foram a minha companhia e apoio diretos, há (literalmente) uma parte de vocês nesta realização;

À Aline, minha mais fiel companhia, que além da amizade sempre compartilhou incentivo, conhecimento e motivação. Que venham muito mais frutos da nossa parceria que vai muito além das 4 pilastras;

Aos meus amigos e familiares, que compreenderam as ausências e suportaram o estresse da minha rotina, vocês sempre são essenciais;

Aos meus pais, Carmem e Mário, que são o combustível infindo da minha motivação e confiança. Muito obrigada por acreditarem e apoiarem as minhas escolhas. Sem esse incondicional amor, nenhuma conquista valeria a pena.

BIOGRAFIA

Rinamara Martins Rosa, filha de Mário Lúcio Rosa e Carmem Silva Martins Rosa, nasceu em 27 de fevereiro de 1992, na cidade de Timóteo, Minas Gerais. Completou o ensino médio em sua cidade de nascimento em 2008.

Ingressou em 2009 no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, cursando-o nas modalidades de Licenciatura e Bacharelado. Concluiu o curso em março de 2014.

Ainda no ano de 2014 iniciou o mestrado no programa de pós graduação em Botânica, também na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2016.

RESUMO

ROSA, Rinamara Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Aspectos metabólicos e crescimento em *Nitzschia palea* sob diferentes fontes de silicato.** Orientador: Adriano Nunes Nesi.

A interrelação entre a produtividade de diatomáceas e sua demanda por silicato tem sido frequentemente foco de pesquisas. O cultivo em larga escala com finalidade econômica é o principal foco dos estudos. O alto preço dos cultivos, principalmente em função da demanda de silicato nos meios, é um entrave para o uso de diatomáceas em escalas comerciais. A utilização de fontes alternativas, ricas em silicato como suplementação de meios pode ser uma alternativa para redução de custos. O gênero *Nitzschia* representa um grupo dulcícola dessas algas com grande potencial de produção de lipídeos e elevada demanda de silício para seu cultivo. Assim, foram cultivadas duas cepas da diatomácea *Nitzschia palea* (BR006 e BR022), fornecendo diferentes dosagens de silicato a partir das fontes alternativas casca de arroz carbonizada e agregado siderúrgico. Os experimentos demonstraram que ambas as fontes alternativas são capazes de fornecer silicato aos cultivos, promovendo incremento de produtividade em relação ao meio controle de acordo com a dosagem de silicato fornecida. Os maiores valores de biomassa foram obtidos nos tratamentos com casca de arroz carbonizada. Os cultivos com agregado siderúrgico, apesar de não ser observado aumento no acúmulo de biomassa, apresentaram elevados percentuais de lipídeos. O acúmulo de compostos variou bastante entre as fontes e dosagens de silicato aplicadas, indicando impacto das fonte alternativa e diferentes dosagens de silicato. Os resultados obtidos indicam a suplementação de silício utilizando as duas fontes testadas pode ser utilizada para o cultivo de *Nitzschia palea*. Adicionalmente verificou-se que a utilização dessa fonte de silício pode ser utilizada para modular o acúmulo de compostos de interesse nestes organismos.

ABSTRACT

ROSA, Rinamara Martins, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2016.
Metabolic and growth aspects in *Nitzschia palea* under different silicate sources.
Adviser: Adriano Nunes Nesi.

Interrelationship between the diatomaceous silicate productivity and their demand has frequently been the focus of research. Large-scale cultivation with economic purpose is the main focus of the studies. The high price of crops, mainly due to the silicate in the media demand, is an obstacle to the use of diatoms in commercial scales. The use of alternative sources rich in silicate as media supplementation can be an alternative for cost reduction. The *Nitzschia* genre represents a freshwater group with high lipid production potential and high silicon demand for its cultivation. So two strains were grown diatom *Nitzschia palea* (BR006 and BR022), providing different silicate dosages from alternative sources carbonized rice husk and steel aggregate. The experiments demonstrated that both alternative sources are capable of providing silicate to crops by promoting increased productivity in relation to the control according to the provided silicate dosing. The highest biomass values were obtained in the treatments with carbonized rice husk. Crops with siderurgic aggregate, although not observed increase in biomass accumulation, showed high percentage of lipids. The accumulation of compounds varied widely between sources and silicate dosages applied, indicating the impact of alternative sources and different silicate dosages. . The results obtained indicate that supplementation silicon tested using both sources may be used for the cultivation of *Nitzschia palea*. Additionally it was found that the use of a silicon source can be used to modulate the accumulation of compounds of interest in these organisms.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL - BIOMINERALIZAÇÃO E METABOLISMO DO SILÍCIO EM DIATOMÁCEAS: UMA INTER-RELAÇÃO QUE VAI ALÉM DO PAPEL ESTRUTURAL.	1
Sílica, ambiente, ciclo biogeoquímico e disponibilidade	2
Sílica e organismos vivos	4
Sílica em diatomáceas	5
Evolução de diatomáceas	6
Frústula e biomineralização do silicato	13
Sílica no metabolismo	29
Impacto estrutural do silício: biologia e tecnologia	18
Perspectivas.....	19
Referências Bibliográficas	21
ARTIGO – ASPECTOS METABÓLICOS E CRESCIMENTO EM <i>Nitzschia</i> palea SOB DIFERENTES FONTES DE SILICATO	34
Resumo.....	34
Abstract	35
Introdução	35
Métodos.....	38
Seleção das cepas	38
Produção de inóculos e condições de cultivo	39
Meios alternativos e tratamentos aplicados	39
Análises de crescimento	40
Análises bioquímicas	40
Análises estatísticas	41
Resultados e discussão	42
Análise dos nutrientes do meio alternativo	42
Produtividade sob diferentes concentrações	43
Interferência de demais nutrientes na produtividade	47
Características do meio a base de agregado siderúrgico	48
Produtividade sob diferentes concentrações	49

Conclusões	55
Referências bibliográficas	56
MATERIAL SUPLEMENTAR	62

INTRODUÇÃO GERAL

BIOMINERALIZAÇÃO E METABOLISMO DO SILÍCIO EM DIATOMÁCEAS: UMA INTER-RELAÇÃO QUE VAI ALÉM DO PAPEL ESTRUTURAL

O silício enquanto elemento químico possui impacto em escala global, principalmente por ser um componente de elevada abundância na terra. Ele se encontra associado em estruturas inorgânicas, como composição de rochas e solo e também em estruturas orgânicas, sendo encontrado em plantas e animais ¹. Dentre suas formas de associação em organismos vivos, o silício é citado principalmente como constituinte estrutural em paredes celulares, espículas ou estruturas de proteção². O maior consumo de silício entre os organismos vivos é feito pelas diatomáceas. Estes organismos fotoautotróficos, responsáveis por cerca de 40 % da produtividade primária dos oceanos, estão presentes em ambientes dulcícolas e marinhos, possuem parede celular constituída de sílica³.

A relação das diatomáceas com o ciclo biogeoquímico do silício acontece desde o surgimento das mesmas na terra ⁴. A ecologia e diversidade destas possui inter-relação direta com a abundância e disponibilidade do silício, uma vez que é um elemento essencial à sobrevivência desses organismos ³. Por outro lado, o consumo e ciclização do silício na biosfera é enormemente dependente da abundância de espécies de diatomáceas. Essa interligação entre processos teria sido responsável, em escala geológica, pela mudança da composição da atmosfera e do perfil de nutrientes dos ambientes aquáticos. A alta disponibilidade de silício no ambiente primitivo proporcionou elevadas taxas reprodutivas de diatomáceas; estes organismos fotoautotróficos consumiam juntamente com o silício disponível na água, gás carbônico atmosférico, por meio do processo fotossintético. Numa longa escala de tempo, a produtividade de diatomáceas representou um grande impacto na composição atmosférica e geológica global ^{1,4}.

O principal emprego do silício em diatomáceas é a composição da frústula. Mecanismos bastante específicos conseguem realizar influxo de silício para a célula,

concentrar e agregar componentes ao silicato e formar as complexas ornamentações da frústula ⁵. Entretanto, o elevado grau de especialização tanto do processo de entrada de silício como de formação da frústula e a relação direta entre a disponibilidade de silício no meio e a produtividade de diatomáceas, levam a entender que o papel do silício não seja apenas estrutural ⁶.

A proposta desta revisão é discutir a inter-relação que existe entre a presença e consumo do silício no ambiente e o papel das diatomáceas neste ciclo biogeoquímico. Além disto, compreender o impacto e a relação da disponibilidade do silício com a ecologia e metabolismo de diatomáceas. Sob estes pontos de vista é possível analisar as alternativas biotecnológicas para as quais o metabolismo de silício em diatomáceas tem sido estudadas atualmente.

Sílica, ambiente, ciclo biogeoquímico e disponibilidade

Sílica, palavra do latim *silicis*, que significa pedra, constitui o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, sendo apenas superado pelo oxigênio ². Dadas suas características moleculares, pode ser encontrada em formas combinadas com cerca de 90 % dos materiais conhecidos, tais como; alumínio, cálcio, ouro, magnésio, zinco, etc. ^{7,8}. Está presente em todos os organismos vivos e é requerida, principalmente, dando estabilidade estrutural aos materiais ⁹. Sua abundância nos seres vivos, inclusive, varia de acordo com essa implicação estrutural, característica espécie-específica ¹⁰. Costumeiramente encontrada na forma de sílica hidratada, também chamada de opala em sua associação a materiais orgânicos, somente é superada em distribuição e abundância pelos minerais de carbonato ¹¹.

A molécula básica em que a sílica é amplamente encontrada é em sua associação com oxigênio, formando o silicato (SiO_4), molécula estruturalmente rígida ¹². No entanto, para permitir a sua disponibilização aos organismos vivos é necessária a solubilização do elemento ¹³. A solubilização da sílica ocorre de forma natural ou pode ser estimulada por ação antrópica. Após a solubilização o silício passa a estar disponível para ser disperso no solo ou em corpos de água ¹. Sua forma solúvel e biodisponível, por sua vez, é como ácido ortossilícico [$\text{Si}(\text{O}_4)$], onde o átomo de silício é coordenado tetraedricamente com 4 grupos hidroxila ^{14,15}.

O intemperismo de silicatos tem um grande impacto, em escala geológica, para o consumo de CO₂; pelo fato de a conversão molecular desse elemento em seres vivos ocasionar o consumo da molécula. Dessa forma, as variações ambientais promovidas temporalmente por seu ciclo biogeoquímico têm grande importância no clima global e distribuição de elementos na biosfera ^{3,10}. A concentração de CO₂ atmosférico tem influência sobre o intemperismo de silicatos, e essas taxas de intemperismo se alteraram significativamente durante o desenvolvimento da biosfera ⁸. Assim há uma intrínseca relação entre a reciclagem de CO₂ e SiO₄ ¹⁶.

Neste contexto, o fitoplâncton atuou concomitantemente nos ciclos dessas moléculas. As diatomáceas, que representam cerca de 40% da produtividade primária dos oceanos, são as responsáveis primárias pela incorporação de SiO₄, na forma de Si(OH)₄, e este processo ocasiona o consumo de CO₂ ¹⁷. O consumo de Si por diatomáceas ocorre por sua característica estrutural de composição de parede celular a base de silício, as chamadas frústulas ^{18,19}. Adicionalmente ao consumo de silicatos e carbono para papéis estruturais, o organismo consome CO₂ atmosférico no processo fotossintético, impactando ainda mais na disponibilização destes elementos no ambiente onde estão contidos ³.

O ciclo global do silício é uma interação complexa de processos químicos, biológicos e geológicos, com atuação ampla de processos espaciais e temporais ²⁰. Em ambientes aquáticos o silício é disponibilizado pelo intemperismo de silicatos minerais e entra em ciclos orgânicos, principalmente, através do consumo por diatomáceas ²¹. Em ambientes terrestres sua disponibilização, ocorrida de forma semelhante, atua como formadora dos solos compondo e regulando o perfil da vegetação ²². Os modelos mais comuns que teorizam o ciclo reconhecem pools de disponibilização e consumo do silicato que tem grande impacto ecológico e geológico em ampla escala temporal ^{23,24}.

Além do papel biológico, tem sido cada vez mais recorrente a demanda por sílica para usos industriais e tecnológicos; como abrasivos, filtros, elementos estruturais e micromecânica ²⁵. Por suas características de resistência, principalmente, e variada possibilidade de associação e organização estrutural, têm-se estudado

bastante tanto o processo de biossilicificação quanto de manipulação do elemento com implicações biotecnológicas ²⁶.

Atualmente, reconhece-se que os estudos acerca do ciclo biogeoquímico do silício ainda não recebem atenção suficiente ^{1,4}. Porém, os efeitos apontados sobre as implicações do seu uso na terra, têm sido valiosos, incentivando maiores avanços em relação a abordagens interdisciplinares para compreensão sobre o elemento e suas aplicações, principalmente em organismos vivos. A importância do ciclo do silício para o consumo de carbono atmosférico, o impacto na biodiversidade e a possibilidade de aplicação comercial e industrial estão entre estas abordagens. ^{26,27}

Sílica e organismos vivos

A presença de sílica em diversos organismos vivos tem dois aspectos primordiais: suas características estruturais e a evolução orgânica dos seres vivos ¹. Seu átomo, da mesma família química do carbono (elemento químico base dos compostos orgânicos), apresenta elevada estabilidade quando inserido em substituição ao carbono, conferindo um elevado potencial de associação em seres vivos. Conjuntamente, durante a evolução orgânica, esses átomos foram associadas aos organismos, estando presente essencialmente, por exemplo, nas paredes celulares de diatomáceas, organismos muito impactantes tanto em relação à produtividade primária dos oceanos, desde períodos primitivos, quanto em relação à mudança da disponibilização de elementos na crosta e atmosfera pelo impacto da fixação de carbono atmosférico ^{3,4}.

A maioria dos organismos vivos do ambiente oceânico possui sílica amorfa em sua constituição estrutural (LEE et al., 2000). Protozoários, esponjas, diatomáceas e plantas superiores teriam evoluído de forma divergente nos mecanismos de incorporação do silício, seja por vias diretas de consumo a partir de ácido ortossilícico, ou de moléculas minerais onde esse elemento está associado ²⁸.

Pouco se sabe sobre como esse elemento age bioquimicamente nos organismos, apesar de ser reconhecida a sua ampla associação dentre as espécies ²⁹. Apesar de comprovados os seus benefícios como atenuadores de impactos de estresse em plantas ainda não se sabe se o seu papel está relacionado à sinalização ou à

própria constituição de moléculas ³⁰⁻³². Essa característica que vem chamando bastante atenção nas pesquisas, principalmente relacionadas à produtividade de lavouras, aumenta de adaptabilidade e resistência a fatores de estresse ^{31,33}.

Entre as funções apontadas para o silício, pesquisadas em plantas superiores, estão: a estimulação da fotossíntese, por meio da facilitação da transmissão de luz, por exemplo³⁴; o aumento da resistência tecidual a patógenos e outras injúrias ³⁵ e a redução da transpiração por deposição de silício ^{36,37}. Os principais grupos vegetais onde essas características são estudadas são aqueles que apresentam maior deposição tecidual de sílica, Gramíneas e Ciperáceas, que possuem culturas de elevado impacto econômico como arroz ³⁸⁻⁴⁰.

Apesar de também estar presente em animais, a maior parte dos estudos sobre os papéis da molécula são feitos em organismos fotoautotróficos, nos quais sua ocorrência é mais abundante, tanto em volume de Si assimilado, quanto em percentual de constituição ¹⁰.

Sílica em diatomáceas

Os organismos vivo majoritariamente citados para o metabolismo de silício são as diatomáceas ⁴¹. Tanto em relação ao ciclo biogeoquímico do elemento quanto sobre os processos possíveis de agregação do silício em organismos vivos. Sua série de mecanismos específicos e a intrínseca dependência desses seres vivos em relação ao silício os tornam organismos modelo nos estudos ^{25,42}. Uma série de características particulares desses organismos unicelulares fotoautotróficos é relacionada comumente ao metabolismo do silício e, apesar de amplamente estudado, ainda há muitas lacunas para a completa compreensão dos mecanismos metabólicos que envolvem o silício, estrutura e crescimento desses organismos ²⁶.

Evolução de diatomáceas

Diatomáceas são organismos fotoautótrofos, eucarióticos e unicelulares, amplamente distribuídos no planeta estão presentes em ambientes dulcícolas e marinhos e sob diversas condições de pH, temperatura e salinidades, indicando uma elevada adaptabilidade evolutiva^{5,43}. São os mais abundantes organismos do

fitoplâncton, possuindo um número estimado superior a 100000 espécies ⁴. Essencialmente importantes, principalmente no ambiente marinho, as diatomáceas são as maiores responsáveis pela fixação de CO₂ e produção de carboidratos que sustentam o zooplâncton desses ambientes ⁴⁴. Além do papel na cadeia alimentar, realizam aproximadamente 20% da fixação biológica de carbono atmosférico global, tendo sido fundamentais na mudança do perfil de disponibilidade de elementos no ciclo geológico terrestre ⁴.

Possuem a particularidade de uma parede celular silicosa, chamada de frústula. Esta carapaça é formada por moléculas de dióxido de silício (SiO₂), nanometricamente organizadas ⁵. Essa estrutura altamente especializada é formada a partir de um processo coordenado de assimilação de Si(OH₄) do ambiente, complexificação molecular e organização estrutural ^{45,46}. Por serem estruturas rígidas e possuírem ornamentação característica são importante instrumento de estudo paleontológico, sendo encontradas com elevado grau de preservação ^{43,47}. Estudos geológicos e paleontológicos indicam que o grupo Bacillariophyta teria surgido antes ou durante o período Jurássico, há aproximadamente 210 – 144 milhões de anos atrás⁴⁸.

A história evolutiva desses organismos indica um desenvolvimento diferente das plantas superiores, que conquistaram o ambiente terrestre. Diferentemente das plantas superiores, em que os cloroplastos têm origem primária, no filo Heteokontophyta (ao qual as diatomáceas pertencem), os cloroplastos evoluíram a partir de um evento de endossimbiose secundária, pelo engolfamento de uma alga vermelha por um heterótrofo unicelular ^{49,50}. Cada evento de endossimbiose teria gerado diferentes combinações genéticas, que são as responsáveis por todo um padrão metabólico peculiar desses organismos e tem sido mais bem elucidados nos últimos anos através dos dados obtidos com o sequenciamento de espécies ^{51,52}.

Frústula e biomineralização do silicato

A formação da parede silicosa das diatomáceas, desde as primeiras observações microscópicas desses organismos, são objeto de curiosidade e estudos ^{3,21,53}. A frústula, como é chamada, limita e protege o protoplasto, tendo elevada

especialização tanto em sua ornamentação quanto estrutural e funcionalmente ⁵. A estrutura, que é didaticamente comparada a uma placa de Petri (Figura 1), possui duas valvas que se encaixam, delimitando o protoplasto ⁵⁴. A valva maior é chamada de epiteca e a menor hipoteca, transversalmente às duas, forma-se o cingulo, um adensamento do revestimento que se assemelha a um cinto contornando a estrutura ⁵⁵. A morfologia da frústula possui variados formatos e padrões, sendo formados por diferentes adensamentos de silicato e arranjos de poros (ocelos). Esses nanoporos dos ocelos garantem a comunicação celular com o ambiente, permitindo o fluxo de nutrientes, gases e produtos de secreção celular como polissacarídeos ^{56,57}. Os variados padrões observados são espécie-específicos e constituem um caráter taxonômico amplamente utilizado que vem sendo mantido, juntamente com as identificações moleculares ^{43,58}.

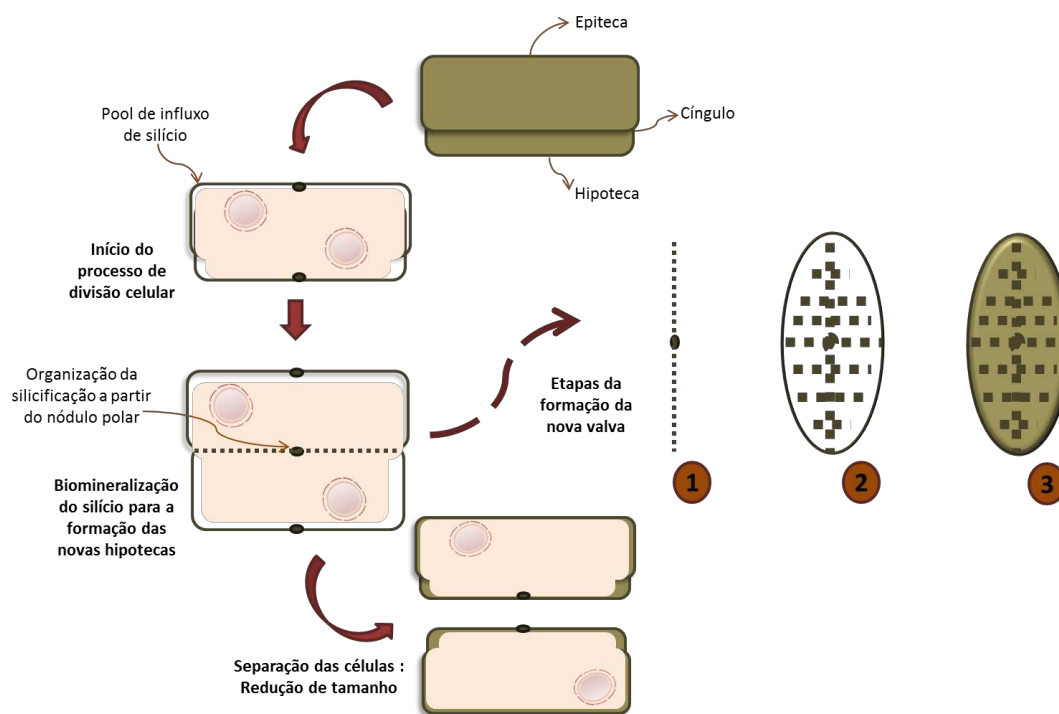


Figura 1 – Estrutura e morfogênese da frústula. A frústula é dividida, basicamente, em duas valvas chamadas de epiteca (valva maior) e hipoteca (valva menor) que estão interconectadas pelo cingulo. O cingulo possui espessamento de silício que é aumentado durante todo o tempo de vida da célula. Dada a sua estrutura silicosa rígida, uma vez formadas as valvas as mesmas não sofrem alongação como em paredes celulares de outros fotoautótrofos. A sinalização para a o início da morfogênese de uma nova frústula ocorre assim que se inicia o processo de divisão celular. O primeiro estímulo é o aumento do influxo de silício para a célula, o “pool” de entrada de ácido silício Si(OH)_4

na célula, através de simporte por proteínas de membrana específicas (Transportadores Internos de Silício – SIT) permite a organização da célula para a formação de nova valva. O silício é concentrado internamente em vesículas depositoras de silício (SDV), nas quais proteínas como poliaminas e silifinas são ligadas ao silício formando um material amorfo facilmente polimerizável. O direcionamento das SDV para a formação da nova valva possui interferência dos nódulos polares das células. A partir do nódulo central é organizado um “esqueleto primário” (1) que se posiciona paralelamente à região intermembrana dos novos protoplasto formados. Desse “esqueleto primário” surgem ramificações (2) que se desenvolvem perpendicularmente ao nódulo polar, iniciando a expansão da nova valva no chamado “esqueleto secundário”. É durante a formação desse esqueleto secundário que as características espécie-específicas da ornamentação da frústula começam a ser direcionadas. Os mecanismos específicos que promovem o direcionamento das SDV na formação das ornamentações ainda não são bem elucidados. Após da formação completa da estrutura secundária, é promovido o adensamento do revestimento silícico (3), preenchendo os espaços e organizando-se os poros e desenvolvimento da estrutura tridimensional da valva. Por se iniciar ao centro da célula, a nova valva formada sempre será uma hipoteca (ou hipovalva). Este processo, ao longo do tempo é o responsável pela redução do tamanho da população de diatomáceas, que só é revertido a partir de um processo sexuado específico do grupo.

O processo de formação das frústulas é chamado de silicificação e consiste na biomineralização da sílica^{3,59}. Biomineralização é a formação de materiais inorgânicos a partir de processos de uma célula viva. A maior parte dos exemplos em que este processo ocorre estão relacionados à formação de elementos estruturais, como paredes celulares⁴⁵. Algumas espécies produzem estruturas a base de CaCO_3 , enquanto a sílica é muito menos abundante na biomineralização de organismos^{60,61}. A sílica, no entanto, pode ser aplicada em muitos papéis biotecnológicos e estruturais, por exemplo, catálise e separação ótica^{5,62}. Dessa forma, enquanto se compreendem os mecanismos que permitem a biomineralização da sílica, uma série de outras implicações do processo são desenvolvidas, concomitantemente. Para tanto, os mecanismos de controle molecular devem ser compreendidos com minúcia para permitir que o processo seja biotecnologicamente aplicado^{26,63,64}.

A primeira comprovação do influxo de silício em diatomáceas foi feita por Lewin e colaboradores^{53,65}. No trabalho é discutido apenas o consumo de silício disponibilizado em meio de cultivo, não compreendendo o mecanismo específico da sua entrada. Numerosos estudos desenvolvidos posteriormente indicam que se trata

de um processo ativo, saturável e mediado por transportadores específicos^{12,66}. Diversas técnicas têm sido aplicadas e desenvolvidas para comprovar de que forma exata esse influxo ocorre. Já foram identificados alguns transportadores específicos, chamados de Transportadores Internos de Silício (SIT em inglês)⁶⁷. Esses transportadores já foram caracterizados molecularmente e testados através de mutantes^{68,69}. Por hora, foi demonstrado que a forma não ionizada do ácido ortosilícico [Si(OH)₄] é transportada, em pH ambiente médio de 8; ocorrendo raras exceções a estas condições^{18,70}. Foram também apontados que o mecanismo de transporte é através de simporte, sendo observada relação com o íon sódio (Na⁺) em marinhas e com os íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) em dulcícolas^{41,71,72}.

Na maioria das espécies de diatomáceas, o transporte de [Si(OH)₄] é acoplado à deposição de parede, em espécies onde isso ocorre, o controle é interno, ou seja, a taxa de absorção independe da concentração externa de Si e está relacionada à capacidade interna de aproveitamento da molécula^{13,73}. Foi apontado que a entrada de silício ocorre em abundância imediatamente antes do início da divisão celular e que a atividade de transporte dos SITs é induzida com rapidez, concomitantemente ao início do processo^{62,74}. Além dessa alteração de intensidade de atividade dos SITs, o número de transportadores presentes na membrana também se altera durante o ciclo celular, bem como são regulados de acordo com as características da frústula de cada espécie, sendo mais abundantes ou ativos de acordo com a quantidade de sílica comumente acumulada na frústula^{3,41,75}. Todos os resultados obtidos nestes trabalhos sugerem a ocorrência de um mecanismo de *feedback*. Trabalhos com carência e abundância de Si comprovaram que a regulação ocorre internamente, bloqueando a entrada de Si antes que ocorra a saturação^{18,19}. Ficou claro que para que ocorram pools de influxo não é necessária a abundância ou estresse por Si, levando à proposta que a regulação não ocorreria pelos níveis de ácido silícico disponível e sim pela capacidade de concentração e transformação da molécula intracelularmente^{3,19,76}.

A proposta mais consensual em relação ao controle e mecanismos de entrada de silício nas células aponta que, quando a taxa de ácido silícico interna é superior a de agentes ligantes, ocorre a sinalização para que o influxo ocorra³. A natureza dos SITs permitiria a ocorrência deste mecanismo, segundo as pesquisas realizadas⁷¹.

Assim, da mesma forma que a deposição da sílica em paredes é controlada, a entrada e permanência do silício na célula, também ocorreria em um processo acoplado³. Em um trabalho que mediu o efluxo de silício, foi apontada a possibilidade de transporte bidirecional, indicando a ocorrência de um controle de níveis intracelulares de silício^{72,77}. Assim, o mecanismo de controle ocorreria em três níveis: (a) a expressão de genes, medida na acumulação de mRNA, interferiria na produção e atividade das SIT a nível de ciclo celular e espécie-específico⁷⁸; (b) proteínas que interagem diretamente com SIT exerceriam o papel de sinalizadoras, indicando a saturação dos níveis de silício internos e regulando a intensidade de entrada e saída de ácido silícico⁶⁸; (c) O processo de direcionamento intracelular e acomodação de Si, por meio da complexificação em moléculas, seria o regulador da intensidade de consumo e por conseguinte da necessidade de demanda de silício internamente⁷⁹. As múltiplas formas de SITs encontradas e a capacidade de influxo de cada uma dessas formas seriam a resposta à condição ambiental de carência ou abundância de Si disponível e, apesar de a disponibilidade de Si limitar o crescimento, seus níveis intracelulares não se apresentam oscilantes graças a uma série de mecanismos de regulação⁷¹. Todos estes mecanismos apontados teriam como objetivo evitar que o ácido silícico pudesse se polimerizar de forma não direcionada em muitas moléculas dentro da célula, impactando no seu metabolismo.

Após a entrada do silício, na forma de ácido ortossilícico, suas moléculas são concentradas em estruturas específicas, chamadas de Vesículas Depositoras de Silício (no inglês SDV)⁷⁹. Estas estruturas foram similarmente encontradas em poríferos, radiolários, sianurófitos e coanoflagelados^{4,80}. Nestas vesículas o ácido ortossilícico pode ser concentrado em até 1000x, através de atividades de polimerização²⁵. Trabalhos que realizaram a copurificação de organelas conseguiram encontrar o silício associado a uma grande variedade delas, indicando que, apesar da existência de vesículas depositoras específicas, o ácido silícico circularia livremente dentro da célula⁴¹. Em outro trabalho⁸¹, foi observado que o silício era encontrado por todo o citoplasma e não apenas em SDV, conforme sugerido, além de indicar que as proteínas que polimerizam o ácido silícico poderiam agir sem a presença de vesículas específicas. O ácido silícico é facilmente polimerizável e pode se complexificar em diversas estruturas citoplasmáticas, gerando danos celulares¹⁸. Apesar de não

haverem dados que comprovem diretamente a associação de Si em moléculas metabolicamente ativas, esta possibilidade é considerada, uma vez que quimicamente o silício poderia substituir o carbono sem alterações estruturais drásticas por serem elementos da mesma família química⁸². A não associação do silício com outros componentes celulares já foi apontada como estratégia para a manutenção de níveis supersaturados do elemento para a sua atividade essencial, a formação de paredes^{3,83}.

Os componentes de parede em diatomáceas são esculpidos, precisamente, por dois mecanismos: micromorfogênese e macromorfogênese². A micromorfogênese define-se como os processos que desenvolvem nanoestruturas distintas, a partir da polimerização da sílica nas SDV, e a partir da autocondensação de moléculas resultam em nanoestruturas aplicáveis estruturalmente. A macromorfogênese, por sua vez, consiste em uma etapa posterior onde os polímeros desenvolvidos via micromorfogênese são aplicados, estruturalmente, a partir da interação de moléculas sendo formados polímeros de sílica e proteínas em larga escala para a formação de paredes. O estudo desses dois processos permite compreender detalhadamente, de que forma são construídas as paredes celulares em diatomáceas (Figura 1).

O processo de micromorfogênese permite a biossilificação das nanoestruturas de frústula em diatomáceas⁸⁴. A forma solúvel da sílica [Si(OH₄)], é encontrada em condições de pH e concentrações limítrofes, acima de 2mM e em pH diferente do neutro o processo de polimerização é energeticamente favorável^{79,84}. Em meios ácidos ou muito concentrados a polimerização forma uma solução coloidal de sílica, espontaneamente, formando nanoesferas de silício que se organizam numa espécie de “rede” de sílica fundida⁵⁵. Pesquisas que identificaram exclusivamente os mecanismos de polimerização da sílica apontaram dois principais processos de formação de polímeros de sílica⁸⁴: (a) em intervalo de pH de 7,0 a 10, na ausência de sal, a repulsão de partículas de carga negativa favorece a formação de esferas coloidais de Si, (b) em pH ácido, abaixo de 7, ou na presença de sais, a carga de superfície das moléculas de Si(OH₄) torna-se neutra, proporcionando a fusão de moléculas de Si quando ocorre a colisão entre elas. Em ambos os casos é favorecida a formação de uma rede tridimensional de silício⁷⁹. A deposição de sílica nas SDV seria, portanto, um evento de nucleação de silício para o favorecimento químico do

processo de polimerização⁷⁴. O pH interno das vesículas seria ácido e a modelagem favorecida por moléculas proteicas que catalisariam a polimerização⁷⁹. Estudos estruturais das diferentes morfologias da frústula apontam a presença de proteínas, que atuariam como elementos associativos, sendo responsáveis tanto pela modelagem da sílica como pelo direcionamento da formação das estruturas durante a organização da frústula na macromorfogênese⁸⁵. Um conjunto de polipeptídeos policatiônicos, chamados de silifinas, foram identificados por Kröger e colaboradores⁸⁶; com a descoberta das ORFs relacionadas à essas proteínas, foi possível purificá-las e testar sua funcionalidade, apontando que estas moléculas possuíam elevado potencial de polimerização de $\text{Si}(\text{OH})_4$ ^{87,88}. Além das silifinas, foi descoberto no mesmo período o potencial de polimerização de silício por poliaminas sintéticas, a partir de $\text{Si}(\text{OH})_4$, sugerindo que estas moléculas também pudessem estar associadas ao processo⁸⁹. A partir de então, diversos estudos foram realizados a fim de compreender de que forma essas proteínas impactariam na modelagem das frústulas, levando à conclusão de que a modelagem do silicato era realizada a partir da alteração do pH e agregação de poliaminas e silifinas após a concentração de $\text{Si}(\text{OH})_4$ a partir de um pool de influxo da molécula^{59,90}.

Como apontado anteriormente, o controle para a entrada da silício na célula seria realizado internamente. O processo de micromorfogênese seria o ponto essencial da realização desse controle^{3,84}. Baseado nos mecanismos de precipitação da sílica, a regulação ocorreria através do controle de síntese de poliaminas e silifinas e, a partir da demanda de concentração de polímeros de silício, seria feita a sinalização que controla o influxo de ácido ortossilícico. Desse modo, atuariam coordenadamente os controles transcricionais e pós transcricionais do processo responderiam respondendo ao ciclo celular do organismo, controlando a diversificação morfológica espécie-específica, a transição de fases do ciclo celular e a produção de poliaminas e silifinas^{59,90,91}.

O processo de macromorfogênese, responsável pelo direcionamento da deposição de sílica em paredes, tem sido estudado de forma mais aprofundada nos últimos anos³. Os mecanismos de incorporação da sílica e modo como ocorre tem sido estudadas por diversas técnicas, microscopia de força atômica e análises de

polimerização *in vivo* obtiveram resultados bastante elucidativos para o processo^{46,92,93}. Já se identificaram algumas bases genéticas e moleculares que são responsáveis por parte do direcionamento do processo, permitindo compreender em parte a forma como atua o controle espécie-específico de organização da frústula e como a organização da ornamentação de parede é conservada^{46,71}. Sabe-se que o processo ocorre em etapas coordenadas onde, a partir do nódulo central das células em divisão é formado um esqueleto primário fino e homogêneo de silício, de onde partem ramificações de microfibrilas silicosas, que organizam o direcionamento do preenchimento da estrutura que é feito a partir do preenchimento de colunas hexagonais com nanoestruturas de silício e proteínas associativas^{94,95}.

A policondensação da sílica, ocorrida nas SDV, é utilizada de forma organizada num processo de montagem do tipo *bottom-up*, que acumula os blocos de nanopartículas de sílica durante a formação da frústula⁸⁶. As vesículas são exocitadas a partir da membrana das células-filha recém formadas e, acredita-se que, silifinas e poliaminas de cadeia longa que catalisam o processo dentro da célula, sejam responsáveis pela organização do formato das nanopartículas quando submetidas a condição externa à vesícula, permitindo o enrijecimento e organização estrutural^{74,79,96}. Apesar de todas as conclusões já reveladas pelas pesquisas, o exato mecanismo que permite controlar a ornamentação das frústulas ainda não é bem elucidado apesar de ser recorrentemente citado como o maior interesse biotecnológico no estudo de diatomáceas⁴⁶. No futuro, pretende-se manipular *in vitro* os processos que permitam obter componentes como a parede silicosa, aplicando o processo para a produção de nanoestruturas interessantes para a indústria de tecnologia, mecânica e médica, principalmente^{26,45}.

Sílica no metabolismo

Como explicado anteriormente, os fatores que regulam e influenciam a entrada e transporte de silício em diatomáceas são amplamente estudados e, apesar de ainda haverem lacunas, os mecanismos de influxo de $\text{Si}(\text{OH})_4$ são bem compreendidos³. As diatomáceas, por sua ampla distribuição pelo mundo, tem clara a sua elevada adaptabilidade aos ecossistemas atuais. Essa adaptabilidade é garantida por robustos processos bioquímicos e moleculares que as mantêm vivas nessas

diversas condições⁴. Uma vez que praticamente todas as diatomáceas caracterizadas são dependentes de sílica disponível para se manterem, sugere-se que este elemento ocupe uma posição central no metabolismo deste organismo. Algumas características de ambientes marinhos e dulcícolas onde essas espécies são encontradas interferem em suas taxas intrínsecas de crescimento. A taxa máxima de ácido ortossilícico encontrada em ambientes marinhos é de 0,1 mM enquanto este valor é de 1,0 mM em água doce⁹⁷. O que reflete no fato de espécies marinhas crescerem mais lentamente do que outras em água doce. Outros aspectos ambientais interferentes são o pH dos ambientes naturais, em geral 8,0, no qual apenas cerca de 3% das moléculas de silício encontram-se na forma biodisponível [Si(OH)₄]; e a disponibilidade dos carreadores específicos (Na⁺ e K⁺) que são utilizados no simporte realizado pelos transportadores específicos (SIT)⁹⁸.

As taxas de absorção de silício e de divisão da célula dependente de silício já foram utilizadas para propor um modelo que mensuraria a dependência de uma dada cepa ao silício³. Segundo esta proposta, a constante de semi-saturação para a dependência de Silício é menor para o crescimento do que para a absorção, o que indica que as taxas de divisão podem ser mantidas muito próximas do máximo mesmo sob condições de limitação de silício, graças a mecanismos controladores do simporte. Além disso, o acoplamento de diferentes etapas do ciclo celular e a incorporação do silício tem implicações importantes para avaliar parâmetros cinéticos de absorção. Essas taxas de absorção, por sua vez, são variáveis de acordo com a cepa, uma vez que possuem relação com o tamanho da célula e a densidade de silício presente na ornamentação da frústula³. As espécies marinhas, por exemplo, possuem de modo geral menores taxas de assimilação de silício, devido as suas bases genéticas selecionadas na condição de salinidade do ambiente marinho⁹⁹. Outras características que afetam a absorção são fatores como luz, concentração de nutrientes como nitrogênio ou fósforo, que impactam no crescimento e por consequência na divisão celular e demanda por silício^{18,66,100,101}. O pool de entrada de silício, quando a única condição de estresse é a limitação da disponibilidade no ambiente, pode ser controlado durante bastante tempo³.

Para permitir essa flexibilidade na adaptação às condições ambientais, o controle do influxo e efluxo de silício devem ser muito bem coordenados (Figura 2). Três modelos de controle são os principais aceitos: (1) Durante períodos de alta demanda de captação são observadas taxas máximas de influxo de Si(OH)_4 , (2) Internamente, a demanda por influxo de silício é coordenada pela utilização de silício para a constituição de paredes, (3) Quando as taxas de disponibilidade externa de silício são muito elevadas ou baixas, na carência o número de transportadores de membrana (SIT), bem como a sua atividade são aumentados, enquanto na ocorrência de excesso de silício é promovido o efluxo de moléculas a fim de evitar um excesso de saturação de silício que permitiria sua associação a outros elementos intracelulares³.

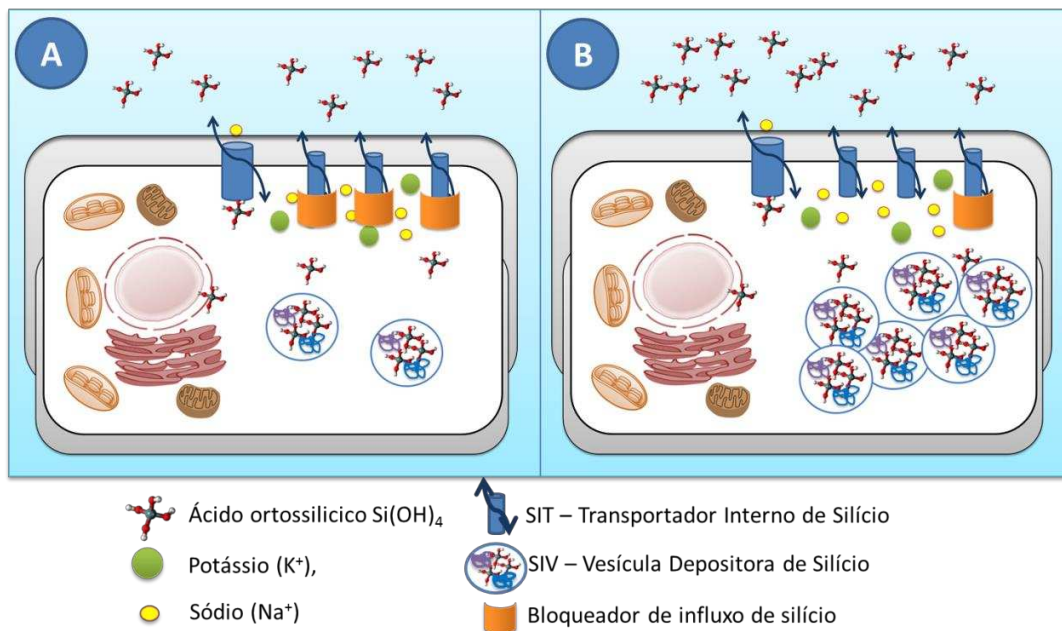


Figura 2 – Mecanismos de controle de influxo de silício em diatomáceas. Etapa do ciclo celular e disponibilidade de potássio e sódio para a atividade dos transportadores internos de silício (SIT). O controle do simporte de silício em diatomáceas é regulado por fatores internos e externos. Externamente pela disponibilidade de silício em forma assimilável – ácido ortossilícico [Si(OH)_4] – e internamente pela abundância de silício no citoplasma (livremente ou acumulado em vesículas depositadoras de silício (SDV). Estes aspectos atuam conjuntamente no metabolismo do silício em diatomáceas e exercem seu impacto através de moléculas sinalizadoras que vem sendo melhor estudadas nos últimos anos. Em (A) observa-se a condição de reduzida atividade de influxo de Si(OH)_4 . A chamada “condição basal” de assimilação do silício ocorre quando não há estímulo para a divisão celular. Esta condição pode ser motivada simplesmente pelo momento no ciclo de vida ou por

fatores como a baixa disponibilidade de Si(OH)_4 no meio externo. Neste caso a entrada de Si(OH)_4 ocorre a pequenos níveis, somente para manter reservas internas de silício que mantém o espessamento do cingulo ou respostas breves a injúrias na frústula. Os SIT encontram-se majoritariamente bloqueados e há pouca abundância de SDV no citoplasma. Em (B) observa-se a condição de elevado influxo de Si(OH)_4 para a célula, este processo é observado imediatamente antes do início da divisão celular, quando o organismo necessitará de muita reserva de sílica para a formação de novas valvas. Esta intensificação do fluxo pode ser motivada somente pelo ciclo celular regular ou incentivada pela abundância de Si(OH)_4 no meio externo, que é capaz de acelerar o processo de divisão. Quando essa sinalização ocorre, o bloqueio dos SIT é removido, e sua atividade de simporte acelerada. A elevada atividade de influxo proporciona o aumento da abundância de SDV no citoplasma. Esta intensa atividade de entrada de Si(OH)_4 é controlada em função capacidade de formação de SDV, que evitam a associação do silício em outras estruturas intracelulares, e consumo do silício internamente. Quando o volume de entrada é superior à demanda ou capacidade de consumo da célula, os SIT podem ser novamente bloqueados ou permitirem o efluxo de Si(OH)_4 . Este controle ocorre pois, apesar de o Si(OH)_4 poder ser encontrado livremente no interior da célula, níveis elevados podem ocasionar a biomineralização em organelas, afetando os processos metabólicos da célula.

Os processos de entrada e utilização interna do silício, apesar de ativos, apresentam baixos requisitos energéticos¹⁰². Vias de baixa energia podem explicar porque a divisão celular não é estritamente luz-dependente e porque é possível a formação de paredes utilizando-se de reservas de carbono¹³. A energia para o transporte e biomineralização da sílica são provenientes da respiração aeróbia e fosforilação oxidativa, e não da atividade fotossintética em curso^{41,72,77}. No entanto, taxas de absorção do silício são mais altas na presença de luz, comparativamente ao período de escuro⁷⁵. Adicionalmente, a atividade respiratória no período de influxo de silício é superior¹³. A relação entre o ciclo celular, o metabolismo do silício e a forma como esses mecanismos ocorrem parece ser particular de cada cepa, refletindo nas diferentes capacidades de adaptação ambiental, bem como taxas de crescimento e demanda por silício.

Além da relação entre a disponibilidade do silício no ambiente, outros fatores afetam a entrada do elemento na célula. O aumento da temperatura afeta a polimerização do silício e, indiretamente, a entrada do elemento. Assim, em temperaturas superiores ao ótimo, os mecanismos de entrada de silício são estimulados e ocorre aumento do influxo de silicato como meio de contrapor o efeito

da temperatura ^{41,103}. Outros aspectos identificados, mas não bem compreendidos são: disponibilidade de nutrientes, como N e P, que reduzem o pool de entrada de silício ^{66,101,104}; alteração da disponibilidade de luz, que quando reduzida promove o aumento da absorção de silício e quando muito aumentada promove a redução da absorção de silício ¹⁰⁵. O impacto de todos esses fatores possui também relação com o metabolismo durante o crescimento e a divisão celular e o metabolismo do silício em diatomáceas.

A ligação entre a disponibilidade de silício e o ciclo celular foi estudada em culturas sincronizadas, onde foram variados os regimes de luz-escuro, além de disponibilidade de silício. Sabe-se que os metabolismos do silício e do crescimento celular são acoplados, e que as diatomáceas mantem um nível interno de silício concentrado, seja para iniciar a divisão, seja para as demandas relacionadas a estresses ambientais durante o período de vida ⁴². O elevado fluxo de entrada de silício na célula ocorre com o início da mitose e se mantem até a separação das células filhas. O fato de os eventos ocorrerem sequencialmente, faz com que pareça que a taxa de crescimento tenha influência sobre o grau de silicificação da célula. O tempo que cada espécie demanda durante as diferentes fases do ciclo são reflexo de características de crescimento intrínsecas, geneticamente reguladas, e a série de condições ambientais relacionadas ^{3,106}. Para explicar como a concentração de sílica rege o crescimento celular, podemos prever um mecanismo limitante, onde a síntese de DNA é bloqueada abaixo de uma certa concentração. Já foi provado que acumulação ou ativação de componentes celulares chave durante o ciclo celular, quando em níveis críticos, alteram as concentrações de ciclinas e cinases que responderiam a essa regulação metabólica ^{42,107}. Podemos supor que a sílica regule diretamente a atividade de proteínas envolvidas no ciclo celular e que a inibição dessas atividades bloqueie as fases do ciclo. De acordo com essa hipótese, a sílica operaria como um mensageiro controlando a progressão do ciclo celular. Adicionalmente, seria possível explicar o estímulo ao crescimento em condições de maior disponibilidade de silício no ambiente; o aumento da concentração de silicato no ambiente promoveria uma maior taxa interna de silício, em função desse aumento, o processo de mitose seria estimulado refletindo no aumento da taxa de crescimento. Em contrapartida a esse processo, quando a concentração externa causa um acúmulo

excessivo de silício internamente, um processo inibitório ao crescimento é desencadeado, provavelmente pela necessidade da célula em exercer o controle desses níveis, demandando energia para realizar o efluxo de parte desse silício. 21,59,108

Impacto estrutural do silício: biologia e tecnologia

A combinação química da frústula, em moléculas hidratadas de óxido silícico, é semelhante a um vidro com grupos hidroxila livres na superfície⁷⁴. Essas hidroxilas livres na superfície estão relacionadas tanto às mudanças químicas, quanto à funcionalidade da parede¹². Esta combinação química permite que a frústula mantenha uma elevada área de superfície e faz com que a mesma seja ideal para a fixação de moléculas bioativas³. A estrutura intrincada da frústula fornece uma área de superfície bem maior que superfícies planares, estas características tornam a estrutura biopolimerizada por diatomáceas ainda mais atraente industrialmente. A manipulação do processo de formação de frústulas originaria materiais de baixo custo, e alto desempenho em aplicações biotecnológicas, como na fabricação de nanoestruturas para a indústria de informática ou farmacêutica².

Alguns estudos que vem de encontro com as implicações biotecnológicas da estrutura das frústulas já testaram as propriedades mecânicas da sílica^{25,27,46,88}. Em relação à resistência das mesmas, a partir dos parâmetros utilizados em vidro, indicam uma elevada resistência mecânica e grande variação deste fator em relação as diferentes densidades de silicificação e padrões de organização²⁹, o que indica que a partir da manipulação desses aspectos é possível criar estruturas de variadas características mecânicas.

Sobre sua química de superfície uma espécie de mucilagem está presente entre a frústula e a membrana celular, se aglomerando também entre poros e na face exterior da parede celular, interagindo com os grupos hidroxila livres da sílica amorfa na parte externa. Trata-se de uma camada hidratada, que in vivo apresenta diversas substâncias como compostos primários de polissacarídeos, proteínas e alguns lipídeos. Os mais abundantes elementos dessa camada são os silanos, agentes de superfície que se juntam com grupos orgânicos formando uma espécie de superfície

oxidante^{109,110}. A interação de diversas moléculas forma uma camada de propriedade bioadesiva que permitiria a aglomeração de células na ocorrência de condições de estresse ambiental e a adesão a superfícies, por exemplo^{57,111}. Sua característica de elevada interação com outras moléculas, por sua vez, seria capaz de manter partículas de interesse, como nutrientes retidos otimizando a sua disponibilização para o metabolismo celular⁶. Todas estas características que garantem funções estruturais e bioquímicas importantes e tem impacto em aspectos ecológicos e estruturais, atraem diversos estudos sobre as propriedades e funções dessa mucilagem^{6,112-114}.

A produção de nanoestruturas, de forma natural, por diatomáceas faz com que os organismos sejam modelos de estudo para a fabricação de nanoproductos. Crescentes estudos sobre a conversão molecular de elementos orgânicos em diatomáceas⁴⁵, vem abrindo possibilidades pra que testes *in vitro* sejam realizados com silício, na tentativa de reproduzir os mecanismos naturalmente realizados por esses organismos. Estes estudos tentam a geração *in vivo* de nanocompostos a partir de manipulação, agregando outros elementos além do silício¹¹⁵; uso de nanoestruturas de sílica de diatomáceas para propriedades ópticas, tais como difração e interferência²⁷; propriedades de fotoluminescência, como semicondutores de luz UV¹¹⁶; além do aumento da eficiência do direcionamento da luz, como amplificador da capacidade de aproveitamento da luz pelos complexos antena em condições de carência ou refletores de luz em condições de excesso^{117,118}.

Com todas essas características de impacto biotecnológico, que relacionam diretamente a capacidade de aproveitamento do silício e a estrutura da frústula, uma parte representativa dos estudos tem se voltado para os mecanismos de silicificação e formação das nanoestruturas por processos biológicos, manipulação dos padrões de silicificação e ornamentação da parede celular, além do aumento da produtividade a partir do aproveitamento do silício^{5,25,26,119,120}.

Perspectivas

As características estruturais do silício e sua abundância no ambiente fomentam o desenvolvimento de pesquisas relacionadas às implicações

biotecnológicas deste elemento¹¹. Diversos empregos já foram pesquisados para o mesmo, tais como o uso na composição estrutural de materiais, desenvolvimento de nanoestruturas ou como suplementação nutricional de culturas agrícolas^{20,31}. Estes estudos levam em consideração tanto a disponibilidade do elemento, quanto seu ciclo biogeoquímico e impacto no ambiente¹.

Apesar do silício ser encontrado em estruturas de diversos organismos, o mais importante grupo em que o elemento está associado são as diatomáceas³. Uma vez que suas paredes celulares são formadas basicamente pelo elemento, e a disponibilidade do mesmo no meio representa uma limitação para a sobrevivência destes microrganismos, as diatomáceas tornam-se um organismo perfeito para compreender as interações do silício com moléculas orgânicas⁹⁴.

Todo o processo evolutivo de diatomáceas esteve relacionado com a disponibilidade e abundância de silício em formas assimiláveis no ambiente¹⁰². Por outro lado, o sucesso evolutivo da espécie e sua abundância foram essenciais, em escala geológica, para o ciclo biogeoquímico do silício. Assim, estudos sobre o impacto do silício no ambiente e o impacto da presença de diatomáceas sempre estiveram intimamente ligados^{1,49}.

O processo de biomineralização do silício por diatomáceas evoluiu com elevada especificidade, permitindo tanto que diversas espécies evoluíssem como que estas espécies apresentassem mecanismos diferenciados de resposta as concentrações de silício no meio^{2,61}. Estima-se que mais de 100000 espécies de diatomáceas estejam distribuídas no planeta, nos mais diversos ambientes²¹. O impacto do silício no metabolismo de diferentes espécies de diatomáceas é estudado principalmente objetivando compreender como a alteração dos níveis de silício impacta na célula e interfere na produtividade de diatomáceas, já que a abundância do elemento é bastante variável em ambientes naturais.³

Além do emprego industrial do silício, as diatomáceas também tem sido foco de interesse comercial^{6,25}. Diversos microrganismos tem sido estudados com objetivo de produção em larga escala para a produção de biocombustíveis, principalmente. Neste aspecto as microalgas tem importante impacto dadas as suas características de

elevada produtividade e diversidade de espécies^{121,122}. Dentre as microalgas, as diatomáceas são especialmente promissoras por apresentarem, na maioria de suas espécies, taxas de acúmulo de lipídeos superiores a 30%, característica de interesse para produção de biodiesel¹²³.

Diante disso, diversas aplicabilidades impulsionam os estudos do envolvimento entre diatomáceas e o silício. Os resultados já obtidos nas pesquisas mostram que a relação entre o nutriente e o microrganismo abrange muito mais do que as características estruturais de formação da frústula que foram o primeiro foco dos estudos^{5,110}. A inter-relação do silício com diatomáceas envolve a constituição estrutural, regulação metabólica do ciclo celular e ecologia destes organismos; ao mesmo tempo que interferem na disponibilidade do silício no ambiente e o impacto do seu ciclo biogeoquímico^{18,76,124}.

O potencial emprego tanto das diatomáceas, enquanto fornecedores de biomassa, quanto do silício, como matéria prima para produtos biotecnológicos, direcionam os investimentos futuros nos estudos da relação entre o nutriente e o microrganismo^{7,19,27,125}. A diversidade de emprego de ambas as finalidades tem proporcionado vários avanços nos últimos anos, colocando as diatomáceas como potenciais organismos para a indústria de biocombustíveis e nano estruturas^{88,126}. Para tanto, estudos relacionados ao aumento de produtividade e viabilização dos cultivos em larga escala de diatomáceas e compreensão da regulação metabólica na formação de frústulas devem ser os principais focos nos próximos anos^{71,127,128}.

Referências Bibliográficas

1. Struyf, E., Smis, A., van Damme, S., Meire, P. & Conley, D. J. The global biogeochemical silicon cycle. *Silicon* **1**, 207–213 (2010).
2. Werner E. G. Müller. *Progress in Molecular and Subcellular Biology - Silicon Biomineralization*. (Springer-Verlag, 2003). doi:101007/978-3-642-55486-5
3. Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M. & Brzezinski, M. a. Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth. *J. Phycol.* **36**, 821–840 (2000).
4. Seckbach, J. & Kociolek, P. The diatom world. (2011). at

<[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Va35Mtn9VGYC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Seckbach,+J.,+%26+Kociolek,+J.+P.+\(2011\).+The+Diatom+World.+London/New+York:+Springer+Dordrecht+Heidelberg+.&ots=g7gKdKXuyf&sig=8EwbmVwWCkjvdb_onPWqyCcz2Lk](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Va35Mtn9VGYC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Seckbach,+J.,+%26+Kociolek,+J.+P.+(2011).+The+Diatom+World.+London/New+York:+Springer+Dordrecht+Heidelberg+.&ots=g7gKdKXuyf&sig=8EwbmVwWCkjvdb_onPWqyCcz2Lk)>

5. Townley, H. E. *Diatom Frustules: Physical, Optical and Biotechnical Applications. The Diatom World* (2011).
6. Leonardo, S., Prieto-Simón, B. & Campàs, M. Past, present and future of diatoms in biosensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* (2015). doi:10.1016/j.trac.2015.11.022
7. O'Mara, W., Herring, R. B. & Hunt, L. P. Handbook of Semiconductor Silicon Technology. (2007). at <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1536773>>
8. Kolbesen, B. O. & Mühlbauer, A. Carbon in silicon: Properties and impact on devices. *Solid. State. Electron.* **25**, 759–775 (1982).
9. Schoelynck, J. & Müller, F. Silicon–vegetation interaction in multiple ecosystems: a review. *J. ...* (2014). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvs.12055/full>>
10. Struyf, E., Smis, A., Damme, S. Van, Meire, P. & Conley, D. The global biogeochemical silicon cycle. *Silicon* (2009). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12633-010-9035-x>>
11. Servalli, G. & Colombo, L. Simulation of the amorphous-silicon properties and their dependence on sample preparation. *EPL (Europhysics Lett.* (1993). at <<http://iopscience.iop.org/article/10.1209/0295-5075/22/2/006/meta>>
12. Tesson, B. & Hildebrand, M. Characterization and localization of insoluble organic matrices associated with diatom cell walls: insight into their roles during cell wall formation. *PLoS One* **8**, e61675 (2013).
13. Coombs, J., Spanis, C. & Volcani, B. E. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. Photosynthesis and respiration in silicon-starvation synchrony of *Navicula pelliculosa*. *Plant Physiol.* **42**, 1607–1611 (1967).
14. Graham, T. XXXV.—On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances. *J. Chem. Soc.* (1864). at

- <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1864/js/js8641700318>>
15. Bechtold, M. Silicic acid from tetraethyl silicate hydrolysis. Polymerization and properties. *J. Am. ...* (1968). at <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01019a015>>
 16. Hopkinson, B. M., Dupont, C. L., Allen, A. E. & Morel, F. M. M. Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 3830–3837 (2011).
 17. Fields, M. W. *et al.* Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4805–16 (2014).
 18. Milligan, A. J., Varela, D. E., Brzezinski, M. a. & Morel, F. M. M. Dynamics of silicon metabolism and silicon isotopic discrimination in a marine diatom as a function of pCO₂. *Limnol. Oceanogr.* **49**, 322–329 (2004).
 19. Wang, Y., Cai, J., Jiang, Y., Jiang, X. & Zhang, D. Preparation of biosilica structures from frustules of diatoms and their applications: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 453–60 (2013).
 20. Struyf, E., Smis, A., Van Damme, S., Meire, P. & Conley, D. J. The Global Biogeochemical Silicon Cycle. *Silicon* **1**, 207–213 (2009).
 21. Paasche, E. Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. I. *Thalassiosira pseudonana* (*Cyclotella nana*) grown in a chemostat with silicate as limiting nutrient. *Mar. Biol.* **19**, 117–126 (1973).
 22. Alexandre, A., Meunier, J., Colin, F. & Koud, J. Plant impact on the biogeochemical cycle of silicon and related weathering processes. *Geochim. Cosmochim. ...* (1997). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001670379700001X>>
 23. Grant, F. The geological significance of variations in the abundances of the isotopes of silicon in rocks. *Geochim. Cosmochim. Acta* (1954). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0016703754900460>>
 24. Tiping, D., Defang, W. & Jincheng, L. THE ANALYTIC METHOD OF SILICON ISOTOPES AND ITS GEOLOGICAL APPLICATION. *Miner. ...* (1988). at <http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-KCDZ198804011.htm>

25. Lopez, P. J., Desclés, J., Allen, A. E. & Bowler, C. Prospects in diatom research. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 180–186 (2005).
26. Vinayak, V. *et al.* Diatom Milking: A Review and New Approaches. *Mar. Drugs* **13**, 2629–2665 (2015).
27. Chandrasekaran, S., Nann, T. & Voelcker, N. H. Nanostructured silicon photoelectrodes for solar water electrolysis. *Nano Energy* **17**, 308–322 (2015).
28. Bailleul, B. *et al.* Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature14599
29. Almqvist, N. *et al.* Micromechanical and structural properties of a pennate diatom investigated by atomic force microscopy. *J. Microsc.* **202**, 518–532 (2001).
30. Lombardi, A. & Wangersky, P. Influence of phosphorus and silicon on lipia class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**, 39–47 (1991).
31. Ma, J. F. & Yamaji, N. Functions and transport of silicon in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3049–3057 (2008).
32. Demarest, M. S., Brzezinski, M. A. & Beucher, C. P. Fractionation of silicon isotopes during biogenic silica dissolution. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 5572–5583 (2009).
33. Detmann, K. C. *et al.* Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytol.* **196**, 752–62 (2012).
34. Kaufman, P., Takeoka, Y. & Carlson, T. Studies on silica deposition in sugarcane (*Saccharum* spp.) using scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray analysis, neutron activation analysis, and. (1979). at <https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:12594701>
35. Chérif, M., Asselin, A. & Bélanger, R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* (1994). at <http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Articles/Phyto84n03_236.PDF>
36. Ma, J., Miyake, Y. & Takahashi, E. Silicon as a beneficial element for crop

- plants. *Stud. plant Sci.* (2001). at
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928342001800069>>
37. Ma, J. F. & Yamaji, N. Functions and transport of silicon in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3049–57 (2008).
 38. Lewin, J. & Reimann, B. Silicon and plant growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.* (1969). at
<<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pp.20.060169.001445>>
 39. Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y. & Christie, P. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environ. Pollut.* (2007). at
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974910600385X>>
 40. Bockhaven, J. Van. Primary metabolism plays a central role in moulding silicon-inducible brown spot resistance in rice. *Mol. plant* ... (2015). at
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12236/full>>
 41. Sullivan, C. & Volcani, B. Silicon in the cellular metabolism of diatoms. ... *siliceous Struct. Biol. Syst.* (1981). at
<http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-5944-2_2>
 42. Huysman, M. J. J., Vyverman, W. & De Veylder, L. Molecular regulation of the diatom cell cycle. *J. Exp. Bot.* **65**, 2573–2584 (2014).
 43. Sims, P. a., Mann, D. G. & Medlin, L. K. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* **45**, 361–402 (2006).
 44. Armbrust, E. V. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* **459**, 185–192 (2009).
 45. Lechner, C. C. & Becker, C. F. W. Silaffins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation. *Mar. Drugs* **13**, 5297–333 (2015).
 46. Hildebrand, M. & Lerch, S. J. L. Diatom silica biomineralization: Parallel development of approaches and understanding. *Semin. Cell Dev. Biol.* **46**, 27–35 (2015).
 47. Dura, T., Hemphill-Haley, E., Sawai, Y. & Horton, B. The application of diatoms to reconstruct the history of subduction zone earthquakes and tsunamis. *Earth-Science Rev.* (2016). at

- <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012825215300763>>
48. Medlin, L. K., Kooistra, W. H., Gersonde, R. & Wellbrock, U. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). II. Nuclear-encoded small-subunit rRNA sequence comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 67–75 (1996).
 49. Mann, D. & Droop, S. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Biogeogr. Freshw. algae* (1996). at <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-0908-8_2>
 50. Bedoshvili, Y., Popkova, T. & Likhoshway, Y. Chloroplast structure of diatoms of different classes. *Cell tissue biol.* (2009). at <<http://link.springer.com/article/10.1134/S1990519X09030122>>
 51. Daboussi, F. *et al.* Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
 52. Du, C. *et al.* iTRAQ-based proteomic analysis of the metabolism mechanism associated with silicon response in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Proteome Res.* **13**, 720–34 (2014).
 53. Lewin, J. Silicon Metabolism in Diatoms. II Sources of Silicon for Growth of *Navicula pelliculosa*. *Plant Physiol.* 129–134 (1954).
 54. Hasle, G. & Fryxell, G. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Trans. Am. Microsc. Soc.* (1970). at <<http://www.jstor.org/stable/3224555>>
 55. Pickett-Heaps, J., Schmid, A. & Edgar, L. The cell biology of diatom valve formation. *Prog. Phycol.* ... (1990). at <https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0,5&q=pickett+heaps+1990#0>
 56. Cox, E. Pore occlusions in raphid diatoms—a reassessment of their structure and terminology, with particular reference to members of the Cymbellales. *Diatom* (2004). at <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/diatom1985/20.0_33?from=Google>
 57. Lim, G. W., Lim, J. K., Ahmad, a. L. & Chan, D. J. C. Influences of diatom frustule morphologies on protein adsorption behavior. *J. Appl. Phycol.* (2014). doi:10.1007/s10811-014-0356-9

58. Taylor, J., Harding, W. & Archibald, C. *A methods manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples. Water Research Commission ...* (2007). at <[http://www.wrc.org.za/Knowledge Hub Documents/Research Reports/TT281-07.pdf](http://www.wrc.org.za/Knowledge_Hub_Documents/Research_Reports/TT281-07.pdf)>
59. Hildebrand, M. Diatoms, biomineralization processes, and genomics. *Chem. Rev.* **108**, 4855–4874 (2008).
60. Estroff, L. Introduction: biomineralization. *Chem. Rev.* (2008). at <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr8004789>>
61. Weiner, S. & Addadi, L. Crystallization pathways in biomineralization. *Annu. Rev. Mater. Res.* (2011). at <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-matsci-062910-095803>>
62. Schmid, a. M. M. & Schulz, D. Wall morphogenesis in diatoms: Deposition of silica by cytoplasmic vesicles. *Protoplasma* **100**, 267–288 (1979).
63. Bunker, B. C. Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **179**, 300–308 (1994).
64. Saade, A. & Bowler, C. Molecular Tools for Discovering the Secrets of Diatoms. *Bioscience* **59**, 757–765 (2009).
65. Lewin, J. SILICON METABOLISM IN DIATOMS I. EVIDENCE FOR THE ROLE OF REDUCED SULFUR COMPOUNDS IN SILICON UTILIZATION. *J. Gen. Physiol.* (1954). at <<http://jgp.rupress.org/content/37/5/589.abstract>>
66. Taylor, N. J. Silica incorporation in the diatom *Coscinodiscus granii* as affected by light intensity. *Br. Phycol. J.* **20**, 365–374 (1985).
67. Hildebrand, M., Volcani, B., Gassmann, W. & Schroeder, J. A gene family of silicon transporters. *Nature* (1997). at <<http://europepmc.org/abstract/med/9034185>>
68. Hildebrand, M., Dahlin, K. & Volcani, B. E. Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: Sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 480–486 (1998).
69. Marron, A. O. *et al.* A family of diatom-like silicon transporters in the

- siliceous loricate choanoflagellates. *Proc. Biol. Sci.* **280**, 20122543 (2013).
70. Thamtrakoln, K., Alverson, A. J. & Hildebrand, M. Comparative Sequence Analysis of Diatom Silicon Transporters: Toward a Mechanistic Model of Silicon Transport. *J. Phycol.* **42**, 822–834 (2006).
 71. Shrestha, R. P. & Hildebrand, M. Evidence for a regulatory role of diatom silicon transporters in cellular silicon responses. *Eukaryot. Cell* **14**, 29–40 (2015).
 72. Sullivan, C. DIATOM MINERALIZATION OF SILICIC ACID. I Si (OH)₄ TRANSPORT CHARACTERISTICS IN NAVICULA PELLICULOSA. *J. Phycol.* (1976). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.1976.tb02862.x/abstract>>
 73. Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P. & Harrison, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Methods* **85**, 119–23 (2011).
 74. Annenkov, V. V., Basharina, T. N., Danilovtseva, E. N. & Grachev, M. a. Putative silicon transport vesicles in the cytoplasm of the diatom *Synedra acus* during surge uptake of silicon. *Protoplasma* **250**, 1147–1155 (2013).
 75. Azam, F., Hemmingsen, B. B. & Volcani, B. E. Role of silicon in diatom metabolism. V. Silicic acid transport and metabolism in the heterotrophic diatom *Nitzschia alba*. *Arch. Microbiol.* **97**, 103–114 (1974).
 76. Science, A. Silicon Metabolism in Marine Diatoms : A Quantitative Proteomic and Genomic Analysis. **2**, 3–5 (2014).
 77. Sullivan, C. DIATOM MINERALIZATION OF SILICIC ACID. II. REGULATION OF Si (OH)₄ TRANSPORT RATES DURING THE CELL CYCLE OF NAVICULA PELLICULOSA1. *J. Phycol.* (1977). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.1977.tb02892.x/abstract>>
 78. Frigeri, L. G., Radabaugh, T. R., Haynes, P. A. & Hildebrand, M. Identification of Proteins from a Cell Wall Fraction of the Diatom *Thalassiosira pseudonana* Insights into Silica Structure Formation. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 182–193 (2006).
 79. Vrieling, E. G., Gieskes, W. W. C. & Beelen, T. P. M. Silicon deposition in

- diatoms: Control by the pH inside the silicon deposition vesicle. *J. Phycol.* **35**, 548–559 (1999).
80. Garrone, R., Simpson, T. & Pottu-Boumendil, J. Ultrastructure and deposition of silica in sponges. ... *Struct. Biol.* ... (1981). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-5944-2_17>
 81. Rogerson, A. Cytoplasmic silicon in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* localized by electron spectroscopic imaging. *Can. J.* ... (1987). at <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m87-022>>
 82. Fagan, S., Baierle, R., Mota, R., Silva, A. da & Fazzio, A. Ab initio calculations for a hypothetical material: Silicon nanotubes. *Phys. Rev. B* (2000). at <<http://journals.aps.org/prb/abstract/10.1103/PhysRevB.61.9994>>
 83. Jungandreas, A., Wagner, H. & Wilhelm, C. Simultaneous measurement of the silicon content and physiological parameters by FTIR spectroscopy in diatoms with siliceous cell walls. *Plant Cell Physiol.* **53**, 2153–2162 (2012).
 84. Iler, R. The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. (1979). at <<http://www.bcin.ca/Interface/openbcin.cgi?submit=submit&Chinkey=117554>>
 85. Li, C. & Volcani, B. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. *Protoplasma* (1985). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF01279720>>
 86. Kröger, N., Deutzmann, R. & Sumper, M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* (80-.). (1999). at <<http://science.sciencemag.org/content/286/5442/1129.short>>
 87. Poulsen, N. & Kröger, N. Silica morphogenesis by alternative processing of silaffins in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Biol. Chem.* (2004). at <<https://www.jbc.org/content/279/41/42993.full>>
 88. Kröger, N. & Poulsen, N. Diatoms—From Cell Wall Biogenesis to Nanotechnology. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 83–107 (2008).
 89. Mizutani, T. & Nagase, H. Silicic acid polymerization catalyzed by amines and polyamines. *Bull. Chem.* ... (1998). at <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JALC/00054587571?from=Google>>

90. Kröger, N. Prescribing diatom morphology: toward genetic engineering of biological nanomaterials. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 662–669 (2007).
91. Tabor, C. & Tabor, H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* (1984). at <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.53.070184.003533>>
92. Shimizu, K., Amo, Y. Del & Brzezinski, M. A novel fluorescent silica tracer for biological silicification studies. *Chem. Biol.* (2001). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552101000722>>
93. Patwardhan, S., Mukherjee, N. & Clarson, S. Formation of fiber-like amorphous silica structures by externally applied shear. *J. Inorg. ...* (2001). at <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1014403932692>>
94. Ehrlich, H. & Witkowski, A. Biomineralization in Diatoms: The Organic Templates. *Evol. Light. Struct.* (2015). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-9398-8_3>
95. Lu, J., Sun, C. & Wang, Q. J. Mechanical Simulation of a Diatom Frustule Structure. *J. Bionic Eng.* **12**, 98–108 (2015).
96. Kröger, N. Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. ...* (2000). at <<http://www.pnas.org/content/97/26/14133.short>>
97. Kuwata, A. & Jewson, D. Ecology and Evolution of Marine Diatoms and Parmales. *Mar. Protists* (2015). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55130-0_10>
98. Amo, Y. & Brzezinski, M. The chemical form of dissolved Si taken up by marine diatoms. *J. Phycol.* (1999). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.1999.3561162.x/full>>
99. Conley, D., Kilham, S. & Theriot, E. Differences in silica content between marine and freshwater diatoms. *Limnol. ...* (1989). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4319/lo.1989.34.1.0205/full>>
100. Torstensson, A., Chierici, M. & Wulff, A. The influence of increased temperature and carbon dioxide levels on the benthic/sea ice diatom *Navicula directa*. *Polar Biol.* **35**, 205–214 (2012).
101. Sun, X., Andersson, P. S., Humborg, C., Pastuszak, M. & Mörtz, C.-M. Silicon

- isotope enrichment in diatoms during nutrient-limited blooms in a eutrophied river system. *J. Geochemical Explor.* **132**, 173–180 (2013).
102. Raven, J. & Waite, A. The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytol.* (2004). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01022.x/full>>
 103. Fukao, T., Kimoto, K. & Kotani, Y. Effect of temperature on cell growth and production of transparent exopolymer particles by the diatom *Coscinodiscus granii* isolated from marine mucilage. *J. Appl. Phycol.* **24**, 181–186 (2011).
 104. Claquin, P. & Martin-Jézéquel, V. Regulation of the Si and C uptake and of the soluble free-silicon pool in a synchronised culture of *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): effects on the Si/C ratio. *Mar. Biol.* (2005). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00227-004-1493-5>>
 105. Rocha, C. D. La, Hutchins, D. A., Brzezinski, M. A. & Zhang, Y. Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**, 71–79 (2000).
 106. Brzezinski, M., Olson, R. & Chisholm, S. Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **67**, 83–96 (1990).
 107. Abraham, R. & Acquarone, M. Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol.* ... (1995). at <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0248-4900\(96\)81298-6/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0248-4900(96)81298-6/full)>
 108. Harrison, P., Conway, H., Holmes, R. & Davis, C. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema*. *Mar. Biol.* (1977). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00392568>>
 109. Nashat, A., Moronne, M. & Ferrari, M. Detection of functional groups and antibodies on microfabricated surfaces by confocal microscopy. *Biotechnol.* ... (1998). at <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981020\)60:2%3C137::AID-BIT1%3E3.0.CO;2-O/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0290(19981020)60:2%3C137::AID-BIT1%3E3.0.CO;2-O/full)>
 110. Townley, H. & Woon, K. Modification of the physical and optical properties of the frustule of the diatom *Coscinodiscus wailesii* by nickel sulfate. ... (2007). at <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/18/29/295101/meta>>

111. Véliz, D. S. *et al.* Diatom-inspired skeletonisation of insulin - Mechanistic insights into crystallisation and extracellular bioactivity. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **133**, 140–7 (2015).
112. Gebeshuber, I. & Kindt, J. Atomic force microscopy study of living diatoms in ambient conditions. *J. ...* (2003). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2818.2003.01275.x/full>>
113. Parida, S. K., Dash, S., Patel, S. & Mishra, B. K. Adsorption of organic molecules on silica surface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **121**, 77–110 (2006).
114. Townley, H. Exploitation of diatom frustules for nanotechnology: tethering active biomolecules. *Adv. Funct. ...* (2008). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.200700609/full>>
115. Lopez, P., Gautier, C., Livage, J. & Coradin, T. Mimicking Biogenic Silica Nanostructures Formation. *Curr. Nanosci.* **1**, 73–83 (2005).
116. Gordon, R., Losic, D., Tiffany, M. A., Nagy, S. S. & Sterrenburg, F. a S. The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotechnol.* **27**, 116–127 (2009).
117. Dutton, H. Chlorophyll Fluorescence and Energy Transfer in the Diatom *Nitzschia Closterium*. *J. Phys.* ... (1943). at <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150427a002>>
118. Parker, A. & Townley, H. Biomimetics of photonic nanostructures. *Nat. Nanotechnol.* (2007). at <<http://www.nature.com/nnano/journal/v2/n6/abs/nnano.2007.152.html>>
119. Diatom milking: a review and new approaches. *Mar. Drugs* (2015). at <<http://www.mdpi.com/1660-3397/13/5/2629/htm>>
120. Levitan, O., Dinamarca, J., Hochman, G. & Falkowski, P. G. Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol.* **32**, 117–124 (2014).
121. Lebeau, T. & Robert, J. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2003). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-002-1176-4>>
122. Graham, J. M. *et al.* Freshwater diatoms as a source of lipids for biofuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 419–428 (2012).
123. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294–306 (2007).

124. Lopez, P. J., Desclés, J., Allen, A. E. & Bowler, C. Prospects in diatom research. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 180–6 (2005).
125. Leterme, S. C. The Oil Production Capacity of Diatoms. *Ann. Aquac. Res.* **1007**, 2 (2015).
126. Hildebrand, M., Davis, A. K., Smith, S. R., Traller, J. C. & Abbriano, R. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* **3**, 221–240 (2012).
127. Silva Benavides, A. M., Torzillo, G., Kopecký, J. & Masojídek, J. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy* **54**, 115–122 (2013).
128. Singh, A., Nigam, P. S. & Murphy, J. D. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresour. Technol.* **102**, 26–34 (2011).

ARTIGO

ASPECTOS METABÓLICOS E CRESCIMENTO EM *Nitzschia palea* SOB DIFERENTES FONTES DE SILICATO

RESUMO –

O uso de diatomáceas para diversas implicações comerciais, como produtividade de biomassa e uso comercial do silício tem sido foco de inúmeras pesquisas nos últimos anos. Devido às características do organismo, como a presença de parede celular silicosa, a viabilização do cultivo em larga escala, precisa do fornecimento de micro e macro nutrientes e uma concentração elevada de silicato. Um dos principais entraves para o cultivo em larga escala é a viabilização de meios de baixo custo, o que ainda é pouco estudado para diatomáceas. Neste contexto, o presente trabalho testou o uso de casca de arroz carbonizada, e agregado siderúrgico (fertilizante comercial Agrosilício Plus®) em diferentes concentrações, no cultivo de duas cepas (BR006 e BR022) da diatomácea dulcícola *Nitzschia palea*. A suplementação com casca de arroz mostrou-se eficiente no cultivo de ambas as cepas, ocorrendo um incremento na produtividade de biomassa superior 30%, comparado ao meio controle. As cepas apresentaram a maior produtividade no tratamento com 30 g.L⁻¹ de casca de arroz carbonizada; 0,9056 g.L⁻¹ e 0,8914 g.L⁻¹, respectivamente; o que está associado além fornecimento de silício a outros micro e macronutrientes presentes no material. Os cultivos realizados com agregado siderúrgico, apesar de não apresentar incremento na produtividade de biomassa, sendo a produtividade cerca de 40-50% inferior ao meio controle, não apresentaram mortalidade das células e o rendimento dos compostos acumulados teve percentuais próximos ao meio controle, com produtividade lipídica acima de 30%. Ambas as fontes foram capazes de fornecer silicato solúvel aos cultivos, possibilitando manutenção dos cultivos ou incremento de produtividade. Os padrões de compostos acumulados para as diferentes fontes, combinado às diferentes dosagens indicam que é possível modular o padrão de acúmulo de compostos a partir da manipulação desses fatores. Os resultados tornam as fontes e tratamentos aplicados potenciais para cultivo em larga escala.

ABSTRACT –

Use of diatoms to commercial implications, as biomass productivity and commercial use of silicon has been the focus of numerous studies in recent years. Due to the characteristics of the organism, as the presence of siliceous cell appears, the feasibility of large-scale cultivation, providing precise micro and macro nutrients and a high concentration of silicate. One of the main obstacles to the large-scale cultivation is the feasibility of low-cost media, which has been little studied for diatoms. In this context, the present study tested the use of carbonized rice husk and steel aggregate (commercial fertilizer Agrosilício Plus®) at different concentrations in the cultivation of two strains (BR006 and BR022) freshwater diatom *Nitzschia palea*. Supplementation with rice husk was efficient in the cultivation of both strains, occurring an increase in higher biomass productivity 30%, compared to the control medium. The strains showed the highest productivity in the treatment with 30 g.L⁻¹ carbonized rice husk; 0,9056 g.L⁻¹ and 0,8914 g.L⁻¹, respectively; which it is associated in addition to supplying silicon to other macro and micronutrients present in the material. Crops made with steel aggregate, although no increase in biomass productivity, and productivity about 40-50% lower than the control medium, showed no mortality of the cells and the yield of accumulated compounds had percentage next to the control medium, with lipid yield above 30%. Both sources are capable of providing soluble silicate to crops, enabling maintenance of the crops or increased productivity. The patterns compounds combined for the various sources, combined to indicate different doses that can modulate the pattern of accumulation of compound from the manipulation of these factors. The results become potential sources and treatments applied to large-scale cultivation

INTRODUÇÃO –

Diatomáceas são o mais diverso grupo de microalgas e possuem a maior abundância do fitoplâncton em número de espécies ^{1,2}. Estes organismos tem distribuição cosmopolita com adaptabilidade, eficiência fotossintética e rendimento de biomassa em variadas condições. Além da variedade ecológica, diatomáceas apresentam compostos de interesse comercial, como lipídeos e

proteínas de alto valor agregado^{3,4}. Outra característica, específica do grupo, é a formação de paredes celulares silicosas através de nanopartículas de silício, de elevado interesse biotecnológico⁵. Em função destas características, o interesse em se estudar tanto a fisiologia, quanto produtividade em larga escala desses organismos, tem se intensificado nos últimos anos⁶⁻⁸.

Pelo fato de diatomáceas apresentarem sua parede celular formada por polímeros de silício, há uma demanda específica por esse nutriente nos cultivos⁹. O Si é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, e apresenta fácil associação com diversos átomos¹⁰. Apesar de abundante, apenas a forma solúvel do Si é assimilável. A forma assimilável do Si para a célula é de ácido silícico Si(OH)_4 . O mecanismo de absorção de Si se dá por meio de simporte, por intermédio de transportadores de ácido silícico (SIT)¹¹⁻¹³. Estes transportadores podem apresentar alta ou baixa afinidade, regulando a entrada de Si nas células as quais são responsivas ao excesso ou a baixa concentração do nutriente no meio, sendo que, ambos os extremos podem inibir o crescimento^{14,15}. Trabalhos recentes apontaram que presença ou ausência do silício na célula atua como sinalizadora do ciclo celular, indicando quando é possível ocorrer a formação de novas paredes (frústulas), e efetivar o ciclo mitótico. Dessa forma, as concentrações de silício seriam interpretadas de maneira exclusiva de acordo com a demanda da espécie para a formação da frústula. A carência de silício é interpretada como uma situação de estresse pela impossibilidade de replicação e, em função disso, ocasionaria mecanismos de acúmulo de reservas e fotoproteção. Ao contrário, a abundância de silício, se acompanhada por concentrações adequadas dos demais nutrientes, possibilita uma elevada taxa de crescimento^{16,17}.

Pesquisas realizadas com cultivos de microalgas em condições de estresse, principalmente com o objetivo acúmulo de reservas visando biocombustíveis, são abundantes^{18,19}. Estes estudos tem focado principalmente em determinar cepas potenciais dentro da diversidade natural e a manipulação nutricional em meios de cultura, visando altas taxas de crescimento e percentuais lipídicos elevados²⁰. Recentemente, um trabalho desenvolvido com duas cepas da diatomácea dulcícola *Nitzschia palea* (BR006 e BR022), cultivadas sob deficiência de nitrogênio, observou respostas discrepantes em relação à produtividade lipídica e crescimento entre estas cepas. O estudo discutiu a relação entre o habitat original de uma mesma espécie e seus padrões de produtividade e acúmulo, o que indica que diversos fatores devem ser considerados no cultivo desses organismos²¹.

Atualmente o cultivo de diatomáceas é estudado em diversas escalas, em sistemas abertos e fechados para diferentes objetivos^{22,23}. Além das limitações impostas pela escala de cultivo, o custo dos meios geralmente utilizados representa um importante entrave. Os cultivos são, na maioria das vezes, realizados com meios sintéticos que utilizam reagentes de elevado grau de pureza e preço elevado². Poucos estudos são realizados com meios de cultivo a partir de fontes alternativas para diatomáceas. Já há domínio de meios de baixo custo para outros grupos de microalgas^{24,25}, entretanto, fontes alternativas de silício, essenciais ao cultivo de diatomáceas, ainda não foram testadas. A utilização de resíduos ou produtos comerciais de baixo custo representam fontes alternativas de nutrientes interessantes para a formulação de meios de baixo custo^{1,26}. O êxito no cultivo com fontes alternativas pode representar um sucesso biotecnológico e comercial, viabilizando a produção em larga escala de diatomáceas com menor custo de produção. Além do potencial biotecnológico do cultivo de microalgas, o uso de materiais provenientes de resíduos para o cultivo tem grande apelo à sustentabilidade do processo²⁷.

Apesar da abundância do Si na crosta terrestre, poucos são os subprodutos onde o átomo se apresenta solubilizável. Para a suplementação de meios de cultivo, o ideal é que a fonte seja abundante em Si e que o mesmo tenha facilidade em ser convertido a Si(OH)_4 ^{28,29}. O presente trabalho identificou duas fontes potenciais que atendiam a estas características de interesse: casca de arroz carbonizada e agregado siderúrgico. A casca de arroz representa cerca de 22 % da massa residual após o beneficiamento do cultivo³⁰. Por ser uma das mais importantes culturas do mundo o volume de resíduo produzido anualmente é elevado. Este resíduo de casa, se não corretamente armazenado ou descartado pode gerar compactação de solos e impactar negativamente o ambiente. A utilização da casca de arroz como combustível de fornos é uma das alternativas de redução do material e as cinzas geradas vem despertando interesse para pesquisa. Após a carbonização ocorre a concentração de silício nas cinzas, podendo o teor de moléculas silicosas chegar a 80% da massa do material. Sabe-se que há concentração de diversas moléculas silicatadas, como a mulita ($3\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2$), carbeto de silício (SiC) e dióxido silícico (SiO_2) que podem ser solubilizados através de temperatura, por exemplo^{31,32}. O agregado siderúrgico por sua vez é um resíduo da indústria siderúrgica, produzido após o tratamento do minério de ferro.. O fertilizante comercial Agrosilício Plus ® comercializado pela empresa Harsco

Minerais ®, é produzido a partir desse resíduo, o agregado siderúrgico ³³. O material é rico em macronutrientes como cálcio, fósforo e magnésio além do Si ³⁴. A linha Plus, possui um percentual mais elevado de sílica, 10,5% do conteúdo do fertilizante, tornando-o um fertilizante potencial para o uso na formulação de meios de cultura para diatomáceas ³³.

O fato de ambas as fontes são subprodutos industriais, de cadeias produtivas bem estabelecidas, abundantemente produzidos e baixo custo, desperta enorme interesse para a aplicação como fonte alternativa de silício. Neste trabalho cultivo de duas cepas de *Nitzschia palea* (BR006 e BR022), sob diferentes concentrações de silicato, provenientes das duas fontes alternativas demonstrou que as mesmas são capaz de fornecer Si assimilável, gerando produtividade de biomassa. Os resultados demonstraram ainda o impacto da variação das concentrações de Si no padrão de acúmulo para as diferentes cepas, comprovando o impacto da disponibilidade de Si no metabolismo de diatomáceas.

MÉTODOS

Cepas utilizadas

As cepas da diatomácea dulcícola *Nitzschia palea* BR006 e BR002 são provenientes do banco de microalgas do Laboratório de Ficologia (DBV-UFV). As mesmas apresentam diferentes respostas metabólicas quando submetidas a condições de estresse por nutrientes²¹. Estas cepas foram isoladas a partir de coletas no campus da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa (20 ° 45'14 "S, 42 ° 52'54"W) sudeste do Brasil. A cepa BR006 foi isolada de uma lagoa eutrófica com águas residuais provenientes de manejo de alimentação animal. Já a cepa BR022 foi amostrada a partir de uma rocha artificial em um canal de passagem de água doce.

Produção de inóculos e condições de cultivo

Na produção de inóculos foi utilizado como fonte de silício o silicato de sódio (Na₂SiO₃ - Sigma Aldrich®). O cultivo foi realizado em meio BG11³⁵ contendo a concentração utilizada durante a manutenção no banco de culturas: 10 mM. Esta concentração foi determinada a partir de testes de acondicionamento anteriormente realizados para as diatomáceas isoladas no banco de microalgas do Laboratório de Ficologia (DBV-UFV).

O cultivo foi realizado em frascos do tipo erlenmeyer de 125 mL de volume em sala de cultivo, com 50 mL de volume total, temperatura 24 ± 2 °C, fotoperíodo 16:8 (luz:escuro) e intensidade luminosa de $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED (Light Emitter Diode) tubulares de 20 W (Kian, Led Tube, China), na altura do agitador orbital e agitação constante a 110 rpm. A densidade celular inicial das unidades experimentais foi de $1,7 \times 10^5$ células mL⁻¹ para BR006 e $2,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ para BR022. A diferença se justifica pelas diferentes taxas de crescimento características das duas cepas. Foram cultivadas 5 réplicas por tratamento. Os experimentos tiveram a duração de 10 dias, sendo feita a coleta para análise no início da fase estacionária, segundo curva de crescimento previamente realizada. O acompanhamento das fases de crescimento foi realizado diariamente a partir de contagem de células.

Meios alternativos e tratamentos aplicados

O meio de cultivo com suplementação de casca de arroz carbonizada foi produzido a partir de material proveniente da combustão em fornos da indústria cerâmica e foi fornecido pela Cerâmica Millenium (Paraíso do Tocantins – TO). A partir da análise elementar do material, foi comprovado o percentual de Si (m/m) contido (Tabela 1), permitindo mensurar as concentrações exatas aplicadas em cada uma das massas (0, 3, 15, 30, 45, 60 g/L) utilizados na produção dos meios. As concentrações de silício correspondentes às massas foram: 0, 2, 12, 23, 35 e 45 mM de Si, respectivamente. Para que o Si presente na casca de arroz fosse solubilizado no meio para assimilação pelas cepas foi realizado um processo de solubilização do Si por temperatura²⁹. O procedimento consistiu em homogeneizar em frascos do tipo erlenmeyer de 2L os volumes determinados de casca de arroz carbonizada, previamente pesados, em 1L de água deionizada. Essa mistura foi autoclavada a 121°C, durante 20 minutos. As soluções obtidas foram posteriormente separadas do resíduo por processo de decantação e utilizadas para a produção do meio de cultivo utilizando soluções do meio BG11, sendo o pH ajustado a 8,0; o material era subdividido em frascos erlenmeyers de 125 mL em sala de cultivo, com 50 mL de volume útil e novamente esterilizado por autoclavagem para a montagem dos experimentos.

A produção dos meios alternativos a base de agregado siderúrgico utilizou o material tratado, fertilizante comercial *Agrosilício Plus*®. Segundo já firmado comercialmente, o fertilizante possui 10,5 % m/m de Si disponível. A partir desse dado, foram calculados os volumes de fertilizante a serem solubilizados para o

cultivo para a obtenção das concentrações de: 0; 0,5; 2,5; 5; 7,5; 10 mM de silicato (Tabela 2). Para que o Si presente no agregado siderúrgico (fertilizante comercial *Agrosilício Plus*®) fosse solubilizado no meio para assimilação pelas cepas foi realizado um processo de solubilização do Si por temperatura²⁹. O procedimento consistiu em homogeneizar em erlenmeyers de 2L os volumes determinados de fertilizante, previamente pesados, em 1L de água deionizada. Essa mistura foi autoclavada a 121°C, durante 20 minutos. As soluções obtidas foram posteriormente separadas do resíduo por processo de decantação e utilizadas para a produção do meio de cultivo utilizando soluções do meio BG11, o material era subdividido em erlenmeyers de 125 mL em sala de cultivo, com 50 mL de volume útil e novamente esterilizado por autoclavagem para a montagem dos experimentos.

Quantificação de biomassa

A medida de biomassa foi feita no 10º dia de cultivo (fase estacionária). Foram utilizadas membranas de 0,45 µm (Millipore®), sendo filtrados 10 mL de cultura por meio de um sistema a vácuo. Posteriormente, as membranas foram secas em estufa a 60°C por 24 horas, sendo analisados dados absolutos de biomassa seca. Posteriormente as amostras incineradas em mufla (Fornos Jung Ltda, LF 02312, Brasil), a 550°C por um período de 2 horas, para o cálculo de biomassa seca livre de cinzas.

Análises bioquímicas

O material para as análises foi coletado no 10º dia de cultivo (fase estacionária). As concentrações de clorofila *a* e carotenoides totais foram determinados por extração metanólica segundo protocolo adaptado de Griffiths (2011) e Wellburn (1994)^{36,37}. Carboidratos totais foram determinados conforme o método fenol - ácido sulfúrico descrito por Masuko (2005)³⁸. Para tal, a curva padrão foi preparada a partir de uma solução de glicose. A extração de proteínas totais foi realizada conforme protocolo de extração etanólica seriada, seguida pela quantificação pelo método de Bradford³⁹, utilizando proteína do soro bovino (BSA) como padrão para a curva de calibração. Para a quantificação de lipídeos totais foi utilizado o corante Nile Red, segundo metodologia adaptada de Chen e colaboradores (2011)⁴⁰. A curva de calibração foi feita pela metodologia de Brighth & Dyer, segundo adaptação feita por Ramirez (2014)⁴¹.

Tabela 1 – Concentrações de micro e macronutrientes por tratamento após a suplementação com casca de arroz carbonizada.

		Massa seca de casca de arroz (g.L⁻¹)					
Elementos dissolvidos(mg.L⁻¹)	Nutrientes	0	3	15	30	45	60
	Alumínio	0,0	<0,0015	<0,0075	<0,015	<0,0225	<0,03
	Boro	0,0	0,015	0,075	0,15	0,225	0,3
	Cálcio	0,0	0,0972	0,486	0,972	1,458	1,944
	Cloretos	0,0	0,0594	0,297	0,594	0,891	1,188
	Cobre	0,0	<0,0015	<0,0075	<0,015	<0,0225	<0,03
	Ferro	0,0	<3x10 ⁻⁴	<0,0015	<0,003	<0,0045	<0,006
	Fósforo	0,0	0,12	0,6	1,2	1,8	2,4
	Magnésio	0,0	0,0588	0,294	0,588	0,882	1,176
	Manganês	0,0	<3x10 ⁻⁴	<0,0015	<0,003	<0,0045	<0,006
	Nitrogênio	0,0	<0,084	<0,42	<0,84	<1,26	<1,68
	Potássio	0,0	1,164	5,82	11,64	17,46	23,28
Silício	0,0	1,38	6,95	13,8	20,84	27,79	
Sódio	0,0	0,033	0,165	0,33	0,495	0,66	
Zinco	0,0	6x10 ⁻⁴	0,003	0,006	0,009	0,012	

*Os protocolos utilizados correspondem às metodologias padrão regulamentadas segundo o Departamento de Controle de Qualidade dos Produtos Água e Esgoto.

Tabela 2 – Valores de nutrientes fornecidos por tratamento após a suplementação com agregado siderúrgico (Agrosilício Plus ®)

		Massa de Agrosilício Plus (g.L⁻¹)					
Elementos dissolvidos(mg.L⁻¹)	Nutriente	0	0,28	1,43	2,86	4,29	5,71
	Cálcio	0	7	35,75	71,5	105,25	142,75
	Magnésio	0	1,68	8,58	1,71	2,57	3,43
	Silício	0	3	15	30	45	60

*Valores proporcionais aos fornecidos pelo produto comercial. Registro: MAPA – MG 10019

1002-4

Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições para cada tratamento. Os valores observados para todas as variáveis respostas foram submetidos a Análise de Variância

(ANOVA). Adicionalmente, para estudar o efeito do meio alternativo segundo cada concentração de Si em relação às variáveis respostas foi realizado teste de Scott & Knott utilizando o software ASSISTAT 7.7 Beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos nutrientes do meio alternativo

Objetivando quantificar os nutrientes disponibilizados no meio a partir autoclavagem do material de casca de arroz carbonizada, foram analisados os teores de micronutrientes e macronutrientes solubilizados através do tratamento. As análises foram realizadas, segundo protocolos padronizados nas normas do Departamento de Controle de Qualidade dos Produtos Água e Esgoto, pela empresa Nucleotec – Laboratório de Análises Físico-Químicas (Foz do Iguaçu – PR).

O material de casca de arroz carbonizada, após tratamento por temperatura é capaz de disponibilizar silicato na forma solúvel no meio (cerca de 0,046% da massa). Além do silício, outros nutrientes, tais como: magnésio, nitrogênio, potássio e sódio também são solubilizados em variadas concentrações. A presença desses nutrientes já havia sido anteriormente descrita na utilização de casca de arroz como substrato para cultivo de plantas ^{30,42,43}. A partir dos dados obtidos, foram calculadas as proporções para cada uma das concentrações a serem utilizadas no cultivo das cepas BR006 e BR022, que estão detalhadamente descritos na tabela 1, que contem as dosagens proporcionais de nutrientes para cada um dos tratamentos.

A quantificação exata dos nutrientes disponíveis foi importante tanto para concluir sobre o impacto do silício nos cultivos, quanto a possível influência dos demais nutrientes incrementados concomitantemente. Os macro e micronutrientes quantificados estão disponíveis em variadas concentrações após o tratamento da casca de arroz carbonizada. Sabe-se que o enriquecimento com todos eles é essencial ao cultivo de microalgas ^{19,44}, já tendo sido relacionada a abundância sazonal desses nutrientes no meio com o aumento da produtividade de diatomáceas em ambientes naturais ⁴⁵. Já era esperado que a presença desses nutrientes no meio conjuntamente ao silício, que é a suplementação objetivada com o uso da casca de arroz, tivesse impacto na produtividade. Os teores dos

nutrientes disponibilizados pela casca de arroz não apresentam efeito inibitório ao crescimento, apenas aumentando a disponibilidade de nutrientes no meio, o que corrobora com o aumento da cinética do ciclo de vida das células ⁴⁶. Segundo pesquisas com produção de meios de cultivo para diatomáceas os micronutrientes são responsáveis por até 30% da produtividade de diatomáceas, enquanto os macronutrientes relacionam com 50% da produtividade ⁴⁷; logo, o aumento da disponibilidade dos mesmos teve influência na maior biomassa produzida.

Produtividade sob diferentes concentrações

Cada uma das cepas foi avaliada em aspectos bioquímicos e de crescimento para cada uma das diferentes dosagens de casca de arroz carbonizada utilizadas na suplementação do meio de cultivo. Os resultados obtidos, apresentados nas tabelas 2 e 3, foram comparados em relação aos obtidos para o meio controle (BG11 suplementado com 10mM de silicato de sódio).

O comportamento cinético das cepas BR006 e BR022 não se diferenciou de forma impactante, como é possível observar através das contagens de células, apresentadas nas curvas de crescimento (Figuras 1B e 2B). Com exceção do tratamento com ausência de fonte de silicato (0 g.L⁻¹), onde a carência de silício impede o crescimento da cepa, todas as demais concentrações apresentaram aumento no número de células. Observou-se que, apesar de variadas taxas de crescimento, as fases logarítmica e estacionária foram mantidas com comportamentos semelhantes entre os tratamentos. Essa observação permite concluir que as diferentes dosagens de silício sejam capazes de alterar as taxas de crescimento, acelerando o ciclo celular, o que é observado pela variação em produtividade de biomassa e número de células. No entanto, as respostas ao decréscimo da concentração de nutrientes no meio são mantidas, ocasionando a entrada em fase estacionária (9-10º dia), dado o consumo dos nutrientes do meio ¹³.

A produtividade de biomassa sofreu incremento com a suplementação através de casca de arroz carbonizada para ambas as cepas, comparadas ao controle (Figuras 1A e 2A). A cepa BR006 apresentou a maior produtividade (0,9056 g.L⁻¹) no tratamento com 30 g.L⁻¹ de casca de arroz carbonizada, sendo observado decréscimo nos valores absolutos de biomassa nas duas concentrações superiores (45 e 60 g.L⁻¹); no entanto, esse decréscimo não diferiu

estatisticamente da produtividade máxima. O tratamento com 3 g.L⁻¹ de casca de arroz carbonizada apresentou-se estatisticamente equivalente ao controle, sendo que a concentração imediatamente superior (15 g.L⁻¹), obteve maior produtividade e o tratamento com ausência de suplementação de silicato obteve a menor produtividade. A cepa BR022 também apresentou maior produtividade absoluta na concentração de 30 g.L⁻¹ de casca de arroz carbonizada (0,8914 g.L⁻¹), sendo que este valor não foi estatisticamente diferente nas concentrações de 3, 15, 45 e 60 g.L⁻¹ de casca de arroz carbonizada. O tratamento com ausência de fonte de silicato, por sua vez, foi comparado ao controle.

Os dados de produtividade de biomassa indicam um diferente comportamento das cepas em relação à abundância de silicato disponível no cultivo. Essa variação deve estar relacionada às características intrínsecas de ambas⁴⁸, pautadas na variação dos ambientes de onde foram coletadas. Neste aspecto, as cepas provavelmente possuem mecanismos de controle de influxo de silício diversificados, que reagem de maneiras distintas à concentração de silício do ambiente^{49,50}. Dessa forma, enquanto BR006 necessitaria de maior disponibilidade de silício no meio para ativar o simporte pelos Transportadores Internos de Silício (SIT) na célula. A cepa BR022 apresentaria funcionalidade constante dos SITs, tendo boa produtividade mesmo sob baixas concentrações de silicato solúvel no meio^{13,15,51}.

Os dados de pigmentos (clorofila *a* e carotenoides totais), apresentados em percentual nas tabelas 2 e 3, indicaram que os tratamentos influenciaram de maneiras deferentes em seus teores para as cepas. Em BR006 os maiores teores de clorofila *a* foram observados na concentração de 30 g.L⁻¹, que diferiu estatisticamente das concentrações dos demais tratamentos. Já o teor de carotenoides foi mais alto na concentração de 15 g.L⁻¹, sendo que não apresentou diferença estatística para todas as concentrações superiores. Em BR022 os maiores teores de ambos os pigmentos foram observados na concentração de 15 g.L⁻¹, não sendo estatisticamente equivalentes a nenhuma outra concentração. Os percentuais de clorofila *a* e carotenoides para a concentração de maior produtividade de biomassa (30 g.L⁻¹), nesta cepa, corresponderam a 20-25% do máximo observado.

Os percentuais de lipídeos neutros, proteínas totais e carboidratos totais se mantiveram estáveis para ambas as cepas (Tabelas 2 e 3). Em BR006 não houve diferença estatística entre os tratamentos e em relação ao controle tanto para a produtividade lipídica quanto para os teores de proteínas. Os teores de carboidratos, por sua vez, apresentaram variação sendo que o máximo foi observado na concentração de 3 g.L⁻¹ e o mínimo na concentração de 30 g.L⁻¹, sendo que todas as concentrações foram percentualmente inferiores ao meio controle. No entanto, com exceção dos tratamentos em concentrações extremas (0 e 60 g.L⁻¹) todas as demais concentrações foram estatisticamente homogêneas comparadas ao meio controle. Para BR022, a produtividade lipídica apresentou variação estatística, sendo que o tratamento com maior produtividade de biomassa (30 g.L⁻¹) teve menores teores em relação ao controle e aos tratamentos com dosagens superiores de casca de arroz. Para esta cepa, no entanto, os percentuais de proteínas e carboidratos apresentaram-se estatisticamente homogêneos.

Segundo os dados apresentados, o fornecimento alternativo de silicato, a partir de casca de arroz carbonizada, apesar de aumentar o acúmulo de biomassa e promover incremento nas taxas de crescimento (comparados ao meio com fonte sintética de silício), não afeta o padrão de constituição de reservas ou impacta drasticamente no acúmulo de compostos⁴⁸. Apesar de ter sido observada diferença estatística entre os teores de lipídeos acumulados em BR022, os dados não são determinantes em relação ao padrão de acúmulo na cepa promovido pela fonte alternativa ou pela variação da concentração de nutrientes

Os meios de cultivo alternativos são a principal maneira de tornar a produção de algas em larga escala viável^{20,52}. Um meio de cultivo ideal proporciona elevada produtividade de biomassa e, preferencialmente, altos percentuais de acúmulo dos compostos de interesse²⁵. A utilização de casca de arroz carbonizada conseguiu em dosagens mais elevadas alta produtividade de biomassa (Figuras 1A e 2A), superando até mesmo o meio controle. A produção de biomassa e componentes celulares é resultado de uma soma de fatores, onde a principal interferência são as características particulares da espécie⁵³, o que impede generalizações e faz com que a modulação dos meios de cultivo para produtividade específica de determinados compostos precise ser individualmente testada^{54,55}.

Dentre as pesquisas com meios de cultivo alternativos, para microalgas como um todo, o uso de águas residuárias tem sido a aplicação mais comum^{26,56}. Resíduos agrícolas tem sido apontados como potenciais para o fornecimento de nutrientes em cultivo de algas, porém, são escassos os experimentos que objetivem comprovar essa aplicabilidade, principalmente para diatomáceas que apresentam a dependência nutricional do silício^{57,58}.

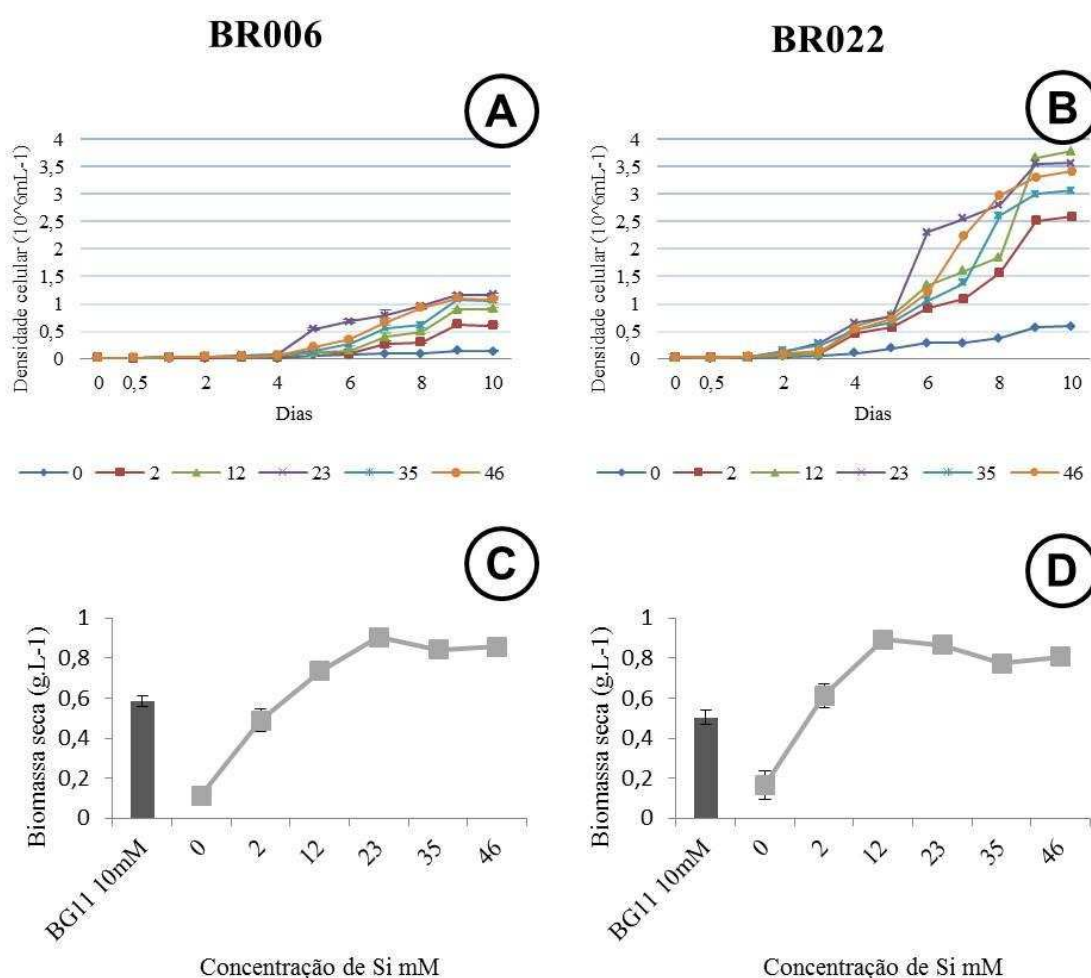


Figura 1 - Densidade celular dos cultivo da diatomácea *Nitzschia palea* BR006 (A) e BR022(B) cultivadas em meios suplementados com diferentes dosagens de Si (0, 2, 12, 23, 35 e 46 mM) provenientes do tratamento de casca de arroz carbonizada. Valores de massa seca do cultivo das respectivas em cada uma das diferentes dosagens da fonte alternativa de silício, comparado ao meio BG11 suplementado com silicato de sódio. As barras de erro contem diferentes letras de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A limitação da presença do silício para o crescimento de diatomáceas faz com que o desenvolvimento de meios de cultivo alternativos necessite ser abundante neste nutriente¹³. A manipulação dos teores de silício disponibilizados em cultivo são frequentemente estudados e dados obtidos com espécies marinhas

apontam que o estresse por carência de silício seja capaz de aumentar a produtividade lipídica ⁵⁹. No entanto, não se observou esta variação nos experimentos realizados, a produção lipídica manteve os seus percentuais estatisticamente iguais (BR006 – Tabela 2) ou apresentou decréscimo nas condições de estresse por baixa dosagem de silício (BR022 – Tabela 3). Porém, o elevado acúmulo de biomassa observado nos tratamentos, indica que o meio

Interferência de demais nutrientes na produtividade

Diante dos dados observados, pareceu evidente a influência das variadas concentrações de silicato, fornecidas pela fonte alternativa; casca de arroz carbonizada. Entretanto, o fato de que o incremento de produtividade foi elevado até mesmo em tratamentos onde as concentrações de silicato disponibilizadas eram muito próximas ao meio controle, gerou a dúvida se somente a dosagem de silicato estaria impactando a produtividade. Provavelmente, os demais elementos disponibilizados no meio através da autoclavagem da casca de arroz carbonizada seriam os responsáveis por ampliar o efeito das maiores doses de silício, ocasionando maior aumento de produtividade. Para tanto, as cepas foram cultivadas com suplementação dos três principais elementos incrementados na solubilização dos componentes da casca de arroz carbonizada: cálcio, magnésio e potássio.

Os dados obtidos para os cultivos (apresentados na Tabela 4) demonstraram que a suplementação dos três nutrientes, conjuntamente, interfere positivamente na produtividade das cepas. Para a cepa BR006, foi observada maior produtividade de biomassa no tratamento com suplementação do combinado de nutrientes, sendo estatisticamente maior que o meio controle. Os meios suplementados com cálcio e potássio somente, apresentaram produtividade de biomassa estatisticamente equivalente ao controle e o meio suplementado apenas com magnésio apresentou menor produtividade. A cepa BR022, de forma semelhante, apresentou boa produtividade com suplementação do combinado de nutrientes, no entanto, o valor de biomassa produzido não foi superior ao tratamento controle, sendo que, a produtividade observada, tanto para o meio suplementado apenas com cálcio quanto para o meio suplementado com o combinado de nutrientes, foram equivalentes estatisticamente ao meio controle.

Assim como observado nos cultivos com suplementação de silicato a partir de casca de arroz carbonizada, os percentuais de lipídeos neutros, proteínas totais e carboidratos totais tenderam a ser estáveis entre os tratamentos. Da mesma forma os percentuais observados para todos os componentes quantificados seguiram o mesmo comportamento dos tratamentos com meio alternativo.

Os dados obtidos através dos testes com suplementação de cálcio, magnésio e potássio permitiram concluir que o efeito do seu incremento pelo uso da casca de arroz carbonizada como fonte de nutrientes possa ter ocorrido de formas diferentes para cada uma das cepas. A disponibilização de outros nutrientes pela fonte alternativa de silício utilizada nos experimentos se somou às maiores concentrações de silicato fornecidas interferindo positivamente na produtividade. Estes elementos já possuem sua relação com o metabolismo de plantas bem elucidado^{60,61}. O papel destes no metabolismo de diatomáceas também já foi hipotetizado⁶², ou até mesmo estudado em mecanismos específicos; como função de sinalização enzimática e participação nos mecanismos de adesão do cálcio⁶³, regulação do metabolismo exercida pelo magnésio⁶⁴, ou ativação enzimática e simporte de silício do potássio^{11,65,66}. Apesar dos estudos já realizados que indicam a relação entre esses nutrientes e o metabolismo de diatomáceas, nenhum se propôs a identificar a influência destes no aumento da produtividade, indicando uma promissora área de estudo.

Características do meio a base de agregado siderúrgico

O cálculo das concentrações de silicato solubilizados em cada um dos tratamentos teve como base os teores de nutrientes informados no produto comercial (Agrosilício Plus ®), segundo registro do mesmo (MAPA – MG 10019 1002-4). Além da disponibilização do silício na solubilização do material, outros dois nutrientes estão presentes em abundância: cálcio e magnésio. As massas correspondentes aos volumes de nutrientes disponibilizados em cada um dos tratamentos foi calculada e pode ser analisada na Tabela 1.

Dado o elevado teor de cálcio, elemento utilizado como precipitador em meio aquoso⁶⁷, fornecido pelo Agrosilício Plus ®, foi testado o impacto do aumento de sua concentração no meio sintético, anteriormente à realização dos experimentos. Ambas as cepas forma cultivadas em meio BG11 com 10 mM de silicato de sódio e adição de 100mg.L⁻¹ de carbonato de cálcio. A partir de

observação da viabilidade de células durante este teste, foi observado que o cultivo de diatomáceas não era impedido sob altas concentrações de cálcio. Dessa forma, os experimentos procederam com a adição de volumes graduais do fertilizante, conforme as dosagens desejadas de silicato dissolvido, desconsiderando os demais nutrientes adicionados concomitantemente. Ainda assim foram estimados os teores dos demais nutrientes inseridos por auxiliarem na interpretação dos resultados, uma vez que todos possuem impactos no metabolismo de organismos fotoautotróficos^{60,64}.

Produtividade sob diferentes concentrações

A avaliação da produtividade das cepas foi feita a partir de análises bioquímicas e de parâmetros de crescimento em relação aos tratamentos. Os resultados obtidos através da suplementação de meios de cultivo com Agrosilício Plus® para as diatomáceas BR006 e BR022 (Tabelas 2 e 3) foram comparados aos dados obtidos com o meio controle (BG11 suplementado com 10mM de silicato de sódio). A análise estatística foi feita com base no teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A condição dos cultivos foi acompanhada por observação ao microscópio durante os 10 dias de duração do experimento. Apesar de as células se manterem viáveis durante todo o período, indicando que existiam condições nutricionais, não houve produtividade superior ao controle para nenhum dos tratamentos. Os dados de biomassa, indicados nas figuras 1 e 2, apresentam que as cepas BR006 e BR022 produziram menos que o meio controle para todos os tratamentos. No tratamento com ausência de suplementação de silicato foram observados os menores valores de biomassa, como esperado, uma vez que o silicato é essencial para a produtividade de diatomáceas. Para as dosagens de 0,03 e 0,15 g.L⁻¹ a produtividade também foi baixa, mas estatisticamente superior à ausência de fornecimento de silicato. Nessas concentrações BR022 apresentou valores de biomassa estatisticamente iguais, enquanto em BR006 foi observado incremento correspondente ao aumento da dose de silicato, sendo a produtividade na dosagem de 0,15 g.L⁻¹ superior à 0,3 g.L⁻¹. A maior produtividade de biomassa para BR006 (0,313 g.L⁻¹), em valores absolutos, foi observada na concentração de 0,30 g.L⁻¹; porém as dosagens superiores não apresentaram diferença estatística nesse parâmetro. Para BR022 a maior produtividade de biomassa (0,3328 g.L⁻¹)

foi observada com a suplementação de $0,60 \text{ g.L}^{-1}$ de silicato. Nesta cepa, as concentrações de $0,45$ e $0,60 \text{ g.L}^{-1}$ tiveram produtividades de biomassa estatisticamente iguais. O valor máximo de produtividade de biomassa obtido para BR006 foi $48,6\%$ inferior que o meio controle, enquanto para BR022 esse valor foi de $33,9\%$.

Os dados de biomassa indicam que houve fornecimento de silicato em forma solúvel a partir da suplementação com Agrosilício Plus®, uma vez que os cultivos permaneceram viáveis e apresentaram crescimento. No entanto, o fato de as cepas apresentarem acúmulo de biomassa inferior ao meio controle sob concentrações de silicato equivalentes (o tratamento de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ possui concentração de silicato equivalente a 10 mM de silicato de sódio), permite concluir que outras características do meio impactaram no crescimento das cepas. Provavelmente as elevadas concentrações de cálcio fornecidas pelo agregado siderúrgico não impedem o crescimento das diatomáceas (como comprovado por testes anteriores), mas devem afetar o metabolismo das cepas diminuindo sua taxa de crescimento. O cálcio tem função de sinalização celular, papel em atividade enzimática e constitutivo, já tendo sido estudado, principalmente em plantas para estas funções^{60,68}. Em diatomáceas o cálcio já foi foco de estudos que abordam as propriedades de adesão a superfícies e motilidade^{63,69}. O impacto da sua concentração em produtividade, especificamente, ainda não foi estudado⁶².

A quantificação de pigmentos (clorofila a e carotenoides totais) foi normalizada percentualmente aos dados de biomassa seca (tabelas 2 e 3). Em BR006 os tratamentos de $0,15$ a $0,60 \text{ g.L}^{-1}$ apresentaram dados estatisticamente iguais para clorofila a, sendo que foram inferiores ao controle. Nas concentrações inferiores, 0 e $0,03 \text{ g.L}^{-1}$, os percentuais decresceram de acordo com o tratamento, sendo estatisticamente diferentes. Os percentuais carotenoides em BR006 também foram estatisticamente inferiores ao meio controle, no entanto, apresentaram homogeneidade em todas as concentrações de silicato dos tratamentos, sendo estatisticamente iguais de $0,03$ a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$. Em BR022 os percentuais de clorofila a e carotenoides apresentaram o mesmo comportamento, apenas o tratamento com ausência de silicato foi estatisticamente inferior em seu percentual de pigmentos. Os demais tratamentos, de $0,03$ a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de silicato foram estatisticamente equivalentes ao meio controle.

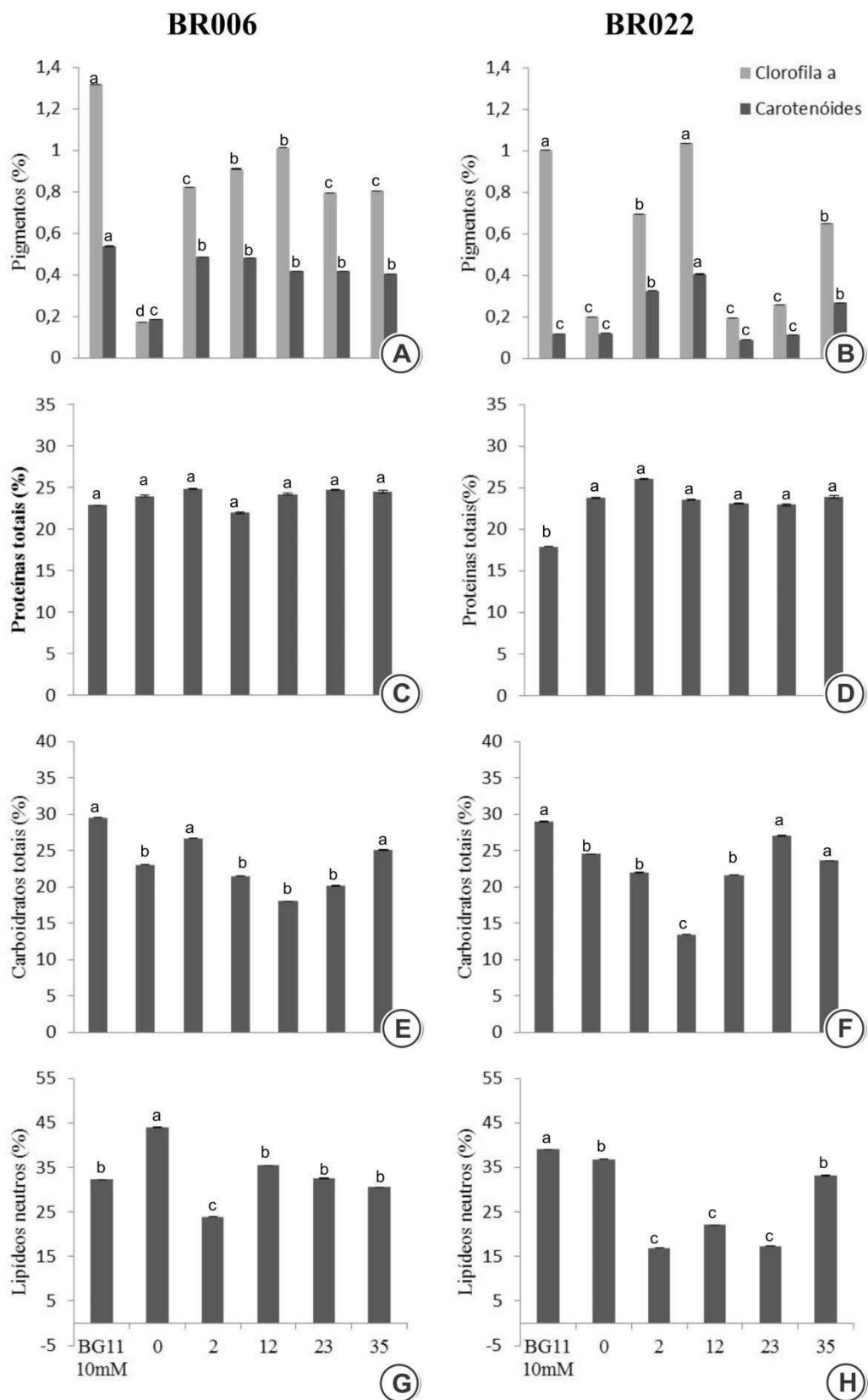


Figura 2 Valores percentuais de clorofila a (%), carotenóides (%), lipídeos neutros (%), proteínas totais (%) e carboidratos (%), correspondentes à massa seca obtida (g.L^{-1}), no cultivo da diatomáceas BR006 e BR022, em meios BG 11 suplementado com diferentes massas de casca de arroz carbonizada. As letras indicam a diferença estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados de pigmentos indicam que a ausência de silicato foi realmente impactante em ambas as cepas, no entanto, a cepa de BR006 sofreu mais estresse em relação à fotossíntese, comparada à cepa BR022, uma vez que seus percentuais de pigmentos sofreram variação e decréscimo em relação ao controle, o que não ocorreu em BR022.

Através de análises bioquímicas também se quantificou lipídeos neutros, proteínas totais de carboidratos totais (Tabelas 2 e 3). Estes dados indicaram que os percentuais de lipídeos em BR006 variaram da média 21%, na concentração de 0,45 g.L⁻¹, a 47,71%, na concentração de 0,6 g.L⁻¹. Estatisticamente apenas os percentuais obtidos nas concentrações de 0,30 e 0,45 g.L⁻¹ foram inferiores ao obtido no controle. Para proteínas totais observou-se homogeneidade nos percentuais quantificados para BR006 entre todos os tratamentos, não havendo diferença estatística entre eles e o controle. Os percentuais de carboidratos totais para BR006 foram estatisticamente iguais ao controle nos tratamentos com concentrações de 0,03, 0,15 e 0,45 g.L⁻¹; as concentrações de 0,3 e 0,6 foram estatisticamente iguais e inferiores ao controle e o menor percentual foi obtido na ausência de suplementação com fertilizante.

Para a diatomácea BR022 os percentuais de lipídeos foram estatisticamente iguais ao controle para todos os tratamentos, com exceção das concentrações de 0,15 e 0,45 g.L⁻¹, que foram iguais entre si e inferiores aos demais tratamentos. Os maiores percentuais de proteínas totais foram encontrados nos tratamentos com concentrações de 0 a 0,15 g.L⁻¹, sendo estatisticamente uniformes nessas concentrações. O controle teve percentual de proteínas totais inferior e estatisticamente uniforme em relação às demais concentrações (0,30; 0,45 e 0,60 g.L⁻¹). Os resultados de carboidratos totais indicaram que apenas no tratamento com 0,45 g.L⁻¹ o percentual foi estatisticamente igual ao meio controle. Os demais tratamentos foram estatisticamente homogêneos entre si, com valores entre 14,22% (0 g.L⁻¹) e 22,42% (0,30 g.L⁻¹) inferiores ao controle no percentual de carboidratos totais.

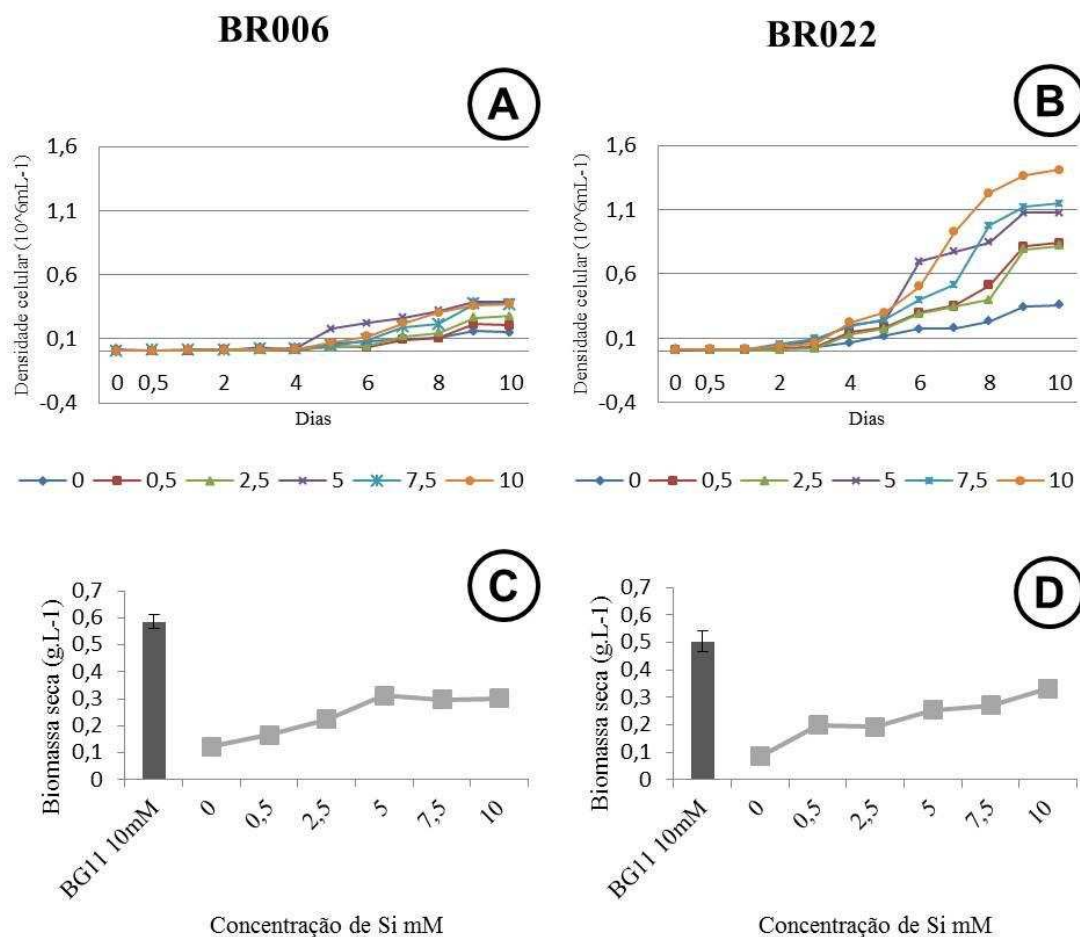


Figura 3 - Figura 1 - Densidade celular dos cultivo da diatomácea *Nitzschia palea* BR006 (A) e BR022(B) cultivadas em meio BG 11 suplementado com diferentes dosagens de Si (0; 0,5; 2,5; 5; 7,5; 10 mM) provenientes de agregado siderúrgico (Agrosilício Plus ®). Valores de massa seca do cultivo das respectivas em cada uma das diferentes dosagens da fonte alternativa de silício, comparado ao meio BG11 suplementado com silicato de sódio (C e D). As barras de erro contem diferentes letras de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados de acúmulo de compostos indicam que, apesar do impacto apresentado pelo uso de Agrosilício Plus® como fonte de silício, que reduziu consideravelmente a produtividade de biomassa, o padrão de produção dos demais compostos não foi alterado drasticamente. A produtividade de lipídeos, proteínas e carboidratos, de forma geral, não teve seus percentuais muito alterados pelos tratamentos, o que indica que apesar do estresse provocado pela utilização da fonte alternativa as cepas foram capazes de utilizar os nutrientes disponíveis de forma satisfatória no metabolismo. Entre as cepas, a diatomácea BR022 se adaptou melhor às condições dos tratamentos, o que refletiu nos seus resultados de produtividade e percentuais de constituintes celulares.

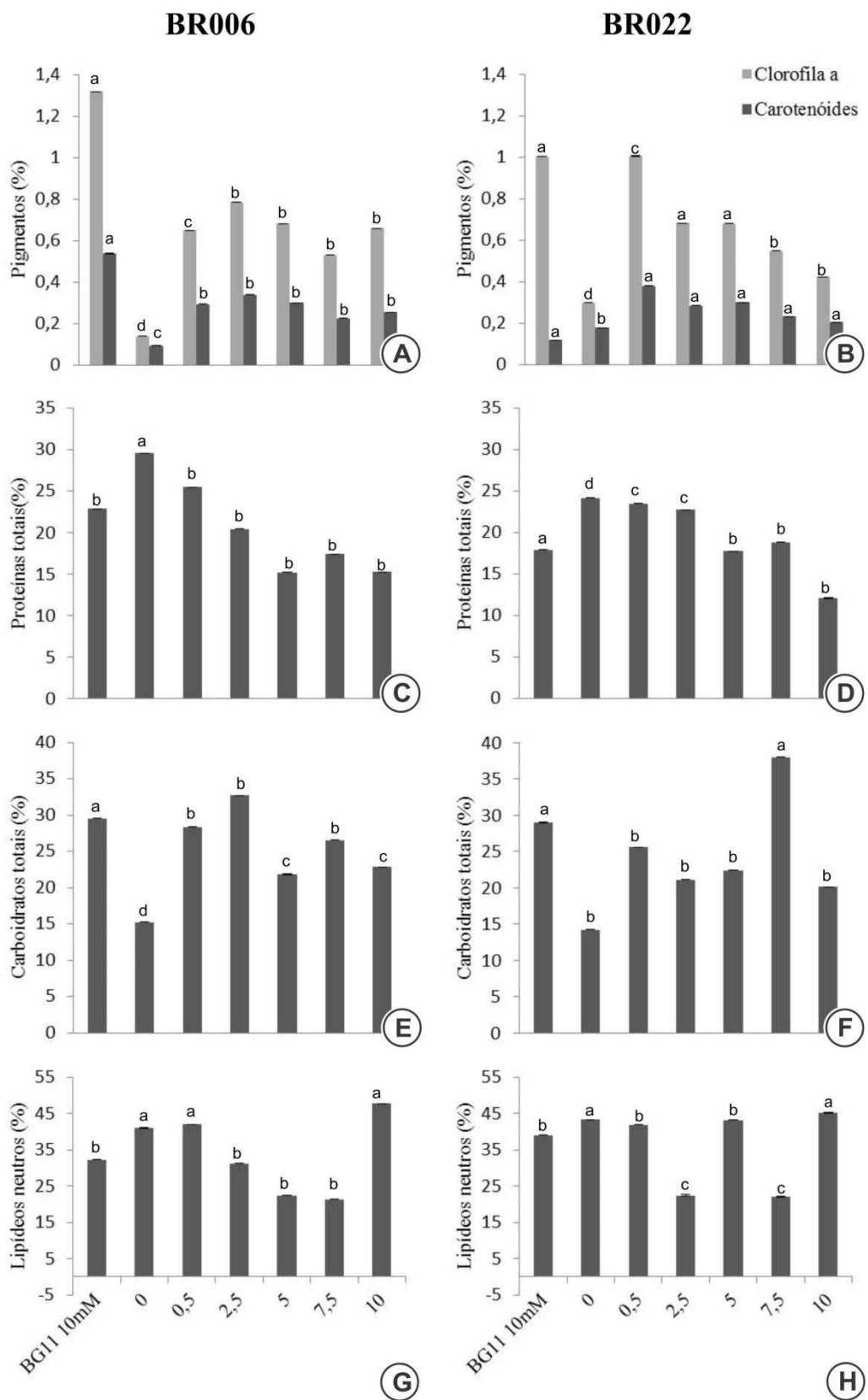


Figura 4 - Valores percentuais de clorofila a (%), carotenóides (%), lipídeos neutros (%), proteínas totais (%) e carboidratos (%), correspondentes à massa seca obtida ($g.L^{-1}$), no cultivo da diatomáceas BR006 e BR022, em meios BG 11 suplementado com diferentes massas de agregado siderúrgico (Agrosilício Plus®). As letras indicam a diferença estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme dados apresentados na tabela 4, o uso de Agrosilício Plus® como fonte de silicato no meio, na concentração de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, reduziram em 13,66% o custo final do meio de cultura. Esta redução poderia ser ainda maior se fosse utilizado um meio base, equivalente ao BG11, também alternativo. Calculando a partir de um meio equivalente anteriormente proposto ⁷⁰, o custo do meio de cultivo poderia ser reduzido em 98,70%, comparado ao meio sintético, custando R\$0,0392. Adicionalmente ao baixo custo, que confere potencial a utilização do agregado siderúrgico como fonte de silício, esta fonte pode ser encontrada em diversos ambientes onde há atividade de siderurgia ⁷¹, por ser resíduo da atividade. O uso de agregado siderúrgico, inclusive tem sido bastante estudado por representar uma via de redução de impacto através do consumo do resíduo ⁷².

CONCLUSÕES

A utilização de diatomáceas para diversos fins comerciais e biotecnológicos tem sido frequentemente citada nos últimos anos ^{7,69}. No entanto, a produção deste organismo em larga escala ainda é inviável, principalmente em função do alto valor dos meios de cultivo. Como são escassos os estudos que se propõe a desenvolver meios de cultura de baixo custo e com produtividade razoável, para tornar o cultivo de diatomáceas economicamente viável, é importante que sejam desenvolvidas pesquisas que se proponham a solucionar esta questão.

Os dados deste trabalho indicaram que a suplementação de silicato a partir de casca de arroz carbonizada é viável para a produção das duas cepas dulcícolas (BR006 e BR022) utilizadas. As dosagens utilizadas foram capazes de produzir biomassa e, na concentração de 30 g.L^{-1} de casca de arroz carbonizada na suplementação de meio BG11, foi observada a máxima produtividade para ambas as cepas, sendo o rendimento estatisticamente superior ao meio totalmente sintético, com suplementação de silicato de sódio. Estes dados demonstram não somente a possibilidade de utilização da casca de arroz carbonizada como fonte alternativa de silicato, como indicam a eficiência da fonte alternativa testada no aumento da produtividade das cepas.

Além do potencial incremento de produtividade de biomassa, o padrão de acúmulo de reserva lipídica observado nos tratamentos com suplementação de silício a base casca de arroz carbonizada, demonstram que este meio alternativo é

potencial ao cultivo visando biodiesel, uma vez que a média de acúmulo de lipídeos, para ambas as cepas, foi acima de 30%, citado na literatura como produtividade ideal para a finalidade de biocombustíveis³⁵.

Adicionalmente, o presente trabalho ainda observou que a variação da concentração de silício dos tratamentos realizados possui impactos diferentes para cada cepa, que devem estar relacionados à sua regulação natural de entrada de silício na célula. Além disto, analisou alguns nutrientes como o cálcio, por seu papel de sinalização dentro da célula, podem ser capazes de promover aumento de produtividade da cepa, como foi testado. Ambos os aspectos indicados carecem maiores estudos, porém, a partir dos resultados obtidos, foram indicados como potenciais para permitir a viabilização da produtividade de diatomáceas em escalas maiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**, 217–232 (2010).
2. Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy* **103**, 444–467 (2013).
3. Leterme, S. C. The Oil Production Capacity of Diatoms. *Ann. Aquac. Res.* **2**, 1–5 (2015).
4. Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. & Roessler, P. A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. (1998). at <[http://www.freestateprojects.org/files/biodiesel+algae/Biodiesel from algae - USDOD report.pdf](http://www.freestateprojects.org/files/biodiesel+algae/Biodiesel%20from%20algae%20-%20USDOD%20report.pdf)>
5. Lopez, P. J., Desclés, J., Allen, A. E. & Bowler, C. Prospects in diatom research. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 180–6 (2005).
6. Obata, T., Fernie, A. & Nunes-Nesi, A. The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. *Metabolites* (2013). at <<http://www.mdpi.com/2218-1989/3/2/325/htm>>
7. Mubarak, M., Shaija, A. & Suchithra, T. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Res.* (2015). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926414001088>>
8. Vinayak, V. *et al.* Diatom Milking: A Review and New Approaches. *Mar. Drugs* **13**, 2629–2665 (2015).
9. Coombs, J., Spanis, C. & Volcani, B. E. Studies on the biochemistry and

- fine structure of silica shell formation in diatoms. Photosynthesis and respiration in silicon-starvation synchrony of *Navicula pelliculosa*. *Plant Physiol.* **42**, 1607–1611 (1967).
10. Struyf, E., Smis, A., Van Damme, S., Meire, P. & Conley, D. J. The Global Biogeochemical Silicon Cycle. *Silicon* **1**, 207–213 (2009).
 11. Parida, S. K., Dash, S., Patel, S. & Mishra, B. K. Adsorption of organic molecules on silica surface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **121**, 77–110 (2006).
 12. Demarest, M. S., Brzezinski, M. A. & Beucher, C. P. Fractionation of silicon isotopes during biogenic silica dissolution. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 5572–5583 (2009).
 13. Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M. & Brzezinski, M. a. Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth. *J. Phycol.* **36**, 821–840 (2000).
 14. Hildebrand, M., Volcani, B., Gassmann, W. & Schroeder, J. A gene family of silicon transporters. *Nature* (1997). at <<http://europepmc.org/abstract/med/9034185>>
 15. Shrestha, R. P. & Hildebrand, M. Evidence for a regulatory role of diatom silicon transporters in cellular silicon responses. *Eukaryot. Cell* **14**, 29–40 (2015).
 16. Hildebrand, M. & Lerch, S. J. L. Diatom silica biomineralization: Parallel development of approaches and understanding. *Semin. Cell Dev. Biol.* **46**, 27–35 (2015).
 17. Smith, S. R. *et al.* Transcript level coordination of carbon pathways during silicon starvation-induced lipid accumulation in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. (2016).
 18. Mirón, A. S. *et al.* Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* **16**, 287–297 (2003).
 19. Fields, M. W. *et al.* Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4805–16 (2014).
 20. Levitan, O., Dinamarca, J., Hochman, G. & Falkowski, P. G. Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol.* **32**, 117–124 (2014).
 21. Machado, M. *et al.* Comprehensive metabolic reprogramming in freshwater *Nitzschia palea* strains undergoing nitrogen starvation is likely associated with its ecological origin. *Algal Res.* **18**, 116–126 (2016).
 22. Graham, J. M. *et al.* Freshwater diatoms as a source of lipids for biofuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 419–428 (2012).
 23. Brennan, L. & Owende, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. energy Rev.* (2010). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002408>>

24. Ahmad, a. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C. & Lim, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **15**, 584–593 (2011).
25. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294–306 (2007).
26. Pittman, J., Dean, A. & Osundeko, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* (2011). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410010163>>
27. Williams, P. & Laurens, L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ. Sci.* (2010). at <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/ee/b924978h>>
28. Iler, R. The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. (1979). at <<http://www.bcin.ca/Interface/openbcin.cgi?submit=submit&Chinkey=117554>>
29. Alexander, G., Heston, W. & Iler, R. The solubility of amorphous silica in water. *J. Phys.* ... (1954). at <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150516a002>>
30. Shao, L., Xu, Z., Jin, W. & Yin, H. Rice husk as carbon source and biofilm carrier for water denitrification. *Polish J. Environ.* ... (2009). at <<http://www.6csnfn.pjoes.com/pdf/18.4/693-699.pdf>>
31. Foletto, E. L., Hoffmann, R., Hoffmann, R. S., Portugal, U. L. & Jahn, S. L. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. *Quim. Nova* **28**, 1055–1060 (2005).
32. Menezes, R. & Fagury-Neto, E. Obtenção de mulita porosa a partir da sílica da casca de arroz e do acetato de alumínio (Porous mullite obtained using silica from rice husk and aluminum. *Cerâmica* (2008). at <https://www.researchgate.net/profile/RHGA_Kiminami/publication/262653432_Porous_mullite_obtained_using_silica_from_rice_husk_and_aluminum_acetate/links/00b7d53b335c8378ad000000.pdf>
33. Corporation, H. M. Agricultura: Agrosilício Corretivo. *Acesso em 05 de 2015* (2012). at <<http://www.harscominerais.com.br/agricultura.aspx>>
34. Pereira, H. & Queiroz, A. Potencial de uso de agregados siderúrgicos e outras fontes de silício em quatro materiais de solo fase cerrado. *Biosci.* ... (2007). at <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewArticle/6670>>
35. Allen, R.Y.; Stanier, M. M. Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.* **51**, 199–202 (1968).
36. Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P. & Harrison, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Methods* **85**, 119–23 (2011).

37. Wellburn, A. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* (1994). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161711811922>>
38. Masuko, T., Minami, A. & Iwasaki, N. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal. ...* (2005). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269704009522>>
39. Kruger, N. The Bradford method for protein quantitation. *protein Protoc. Handb.* (2009). at <http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7_4>
40. Chen, W., Sommerfeld, M. & Hu, Q. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour. Technol.* **102**, 135–41 (2011).
41. Ramirez, NNV; Ranzan, C; Farenzena, M; Trierwieler, J. Novo método para a quantificação rápida de lipídios em microalgas. in *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química* 1–8 (2014).
42. Inden, H. & Torres, A. Comparison of four substrates on the growth and quality of tomatoes. *Int. Symp. Grow. Media ...* (2001). at <http://www.actahort.org/books/644/644_27.htm>
43. Faria, R. & Rego, L. Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternative substrates. *Brazilian Arch. ...* (2001). at <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132001000400003&script=sci_arttext>
44. Marsh, A., Gémare, A. & Tenore, K. Effect of food type and ration on growth of juvenile *Capitella* sp. I (Annelida: Polychaeta): macro- and micronutrients. *Mar. Biol.* (1989). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00438354>>
45. Reynolds, C. The seasonal periodicity of planktonic diatoms in a shallow eutrophic lake. *Freshw. Biol.* (1973). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2427.1973.tb00065.x/full>>
46. Tantanarrit, C., Englande, A. & Babel, S. Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations. *J. Exp. Mar. ...* (2013). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098113001792>>
47. Thothathri, S. Composition for growth of diatom algae. *US Pat.* 7,585,898 (2009). at <<https://www.google.com/patents/US7585898>>
48. Machado M., Bromke M., Domingues Júnior A. P., Vaz M. G. M. V, Rosa R.M., Vinson C. C., Sabir J. S., Rocha D. I., Martins M. A., Araújo W. L., Willmitzer L, Szymanski J., N.-N. A. *Comprehensive metabolic reprogramming in freshwater *Nitzschia palea* strains undergoing nitrogen starvation is likely associated with its ecological origin.* (2016).
49. Milligan, A. J., Varela, D. E., Brzezinski, M. a. & Morel, F. M. M.

- Dynamics of silicon metabolism and silicon isotopic discrimination in a marine diatom as a function of pCO₂. *Limnol. Oceanogr.* **49**, 322–329 (2004).
50. Hockin, N. L., Mock, T., Mulholland, F., Kopriva, S. & Malin, G. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiol.* **158**, 299–312 (2012).
 51. Marron, A. O. *et al.* A family of diatom-like silicon transporters in the siliceous loricate choanoflagellates. *Proc. Biol. Sci.* **280**, 20122543 (2013).
 52. Hildebrand, M., Davis, A. K., Smith, S. R., Traller, J. C. & Abbriano, R. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* **3**, 221–240 (2012).
 53. Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J. & Chang, J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* **102**, 71–81 (2011).
 54. Kanaga, K., Pandey, A. & Kumar, S. Multi-objective optimization of media nutrients for enhanced production of algae biomass and fatty acid biosynthesis from *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738. *Bioresour. Technol.* (2016). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415015436>>
 55. Borowitzka, M. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* (2013). at <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-9983-9>>
 56. Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**, 217–232 (2010).
 57. Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M. & Das, K. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl. Energy* (2011). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261910005842>>
 58. Kapdan, I. & Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* (2006). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905005053>>
 59. Takeda, S. Influence of iron availability on nutrient consumption ratio of diatoms in oceanic waters. *Nature* **393**, 774–777 (1998).
 60. Jones, R. G. W. & Lunt, O. R. The function of calcium in plants. *Bot. Rev.* **33**, 407–426 (1967).
 61. Kauss, H. Some Aspects of Calcium-Dependent Regulation in Plant Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**, 47–71 (1987).
 62. Falciatore, A. & Bowler, C. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* (2002). at <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.53.091701.153921>>

63. Geesey, G., Wigglesworth-Cooksey, B. & Cooksey, K. Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review. *Biofouling* (2000). at <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927010009386310>>
64. Hildebrand, M., Higgins, D. R., Busser, K. & Volcani, B. E. Silicon-responsive cDNA clones isolated from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Gene* **132**, 213–218 (1993).
65. Werner E. G. Müller. *Progress in Molecular and Subcellular Biology - Silicon Biomineralization*. (Springer-Verlag, 2003). doi:101007/978-3-642-55486-5
66. Lewin, J. Silicon metabolism in diatoms: III. Respiration and silicon uptake in *Navicula pelliculosa*. *J. Gen. Physiol.* (1955). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2147524/>>
67. Alves, H., Mochida, G. & Cruz, G. Precipitação química e cloração para combate a maus odores em estações de tratamento de esgoto anaeróbias. ... –*Revista Técnica da* ... (2004). at <<http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/v21/art02.pdf>>
68. Wang, W. & Fisher, N. Effects of calcium and metabolic inhibitors on trace element uptake in two marine bivalves. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* (1999). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098198001956>>
69. Cooksey, B. & Cooksey, K. Calcium is necessary for motility in the diatom *Amphora coffeaeformis*. *Plant Physiol.* (1980). at <<http://www.plantphysiol.org/content/65/1/129.short>>
70. Soares J., Martins M.A., Loterio R., Rosa R. M., Santos M. O., Nascimento A. G do, Santos N. T., Nunes-Nesi, A. *Cultivation of Scenedesmus sp. BR003 in low cost media*. (2016).
71. Dudka, S. & Adriano, D. Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. *J. Environ. Qual.* (1997). at <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/26/3/JEQ0260030590>>
72. Roque, A. & Correia, A. A geotecnia na valorização de agregados siderúrgicos inertes reciclados: um projecto nacional. (2006). at <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/6781>>

MATERIAL SUPLEMENTAR

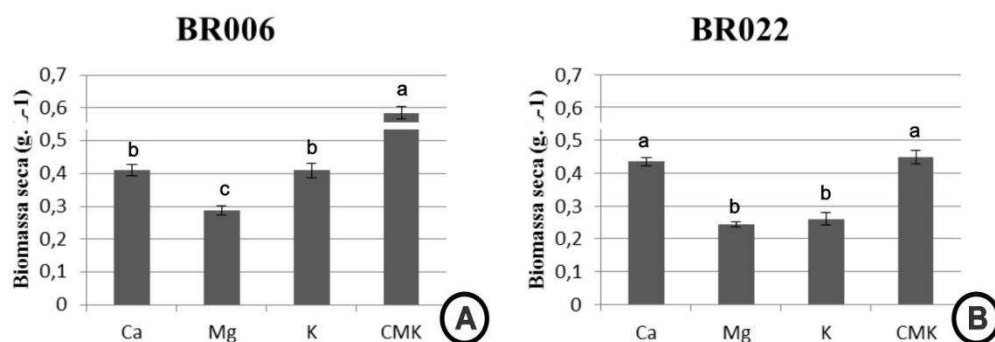


Figura suplementar 1 – Valores de biomassa seca obtida (g.L⁻¹), no cultivo da diatomáceas BR006 e BR022, em meio BG 11 modificado com 10mM de silicato de sódio (Na₂SiO₃), suplementado com Cálcio (CaCl₂x2H₂O) , Magnésio [Mg(SO)₄] e Potássio [KH₂(PO)₄], ou combinação de nutrientes.

Tabela suplementar - Custo de produção de 1L de meio de cultivo a base de nutrientes sintéticos e alternativos, tendo como base meio alternativo com cálculo de nutrientes correspondente ao BG11 testado no cultivo de *Scenedesmus*.

Meio de cultivo	Fonte de silicato	Custo final (R\$.L ⁻¹)	Economia em relação ao meio completamente sintético (%)
BG 11 sintético	Na ₂ SiO ₃	3,029	
	Casca de arroz carbonizada	2,6108	13,80
	Agrosilício Plus	2,6152	13,66
Meio alternativo B4*	Na ₂ SiO ₃	0,453	86,62
alternativo B4*	Casca de arroz carbonizada	0,0348	98,85
	Agrosilício Plus	0,0392	98,70

*Meio alternativo a base de fertilizantes comerciais (Soares, J. et al; Submetido)⁷⁰

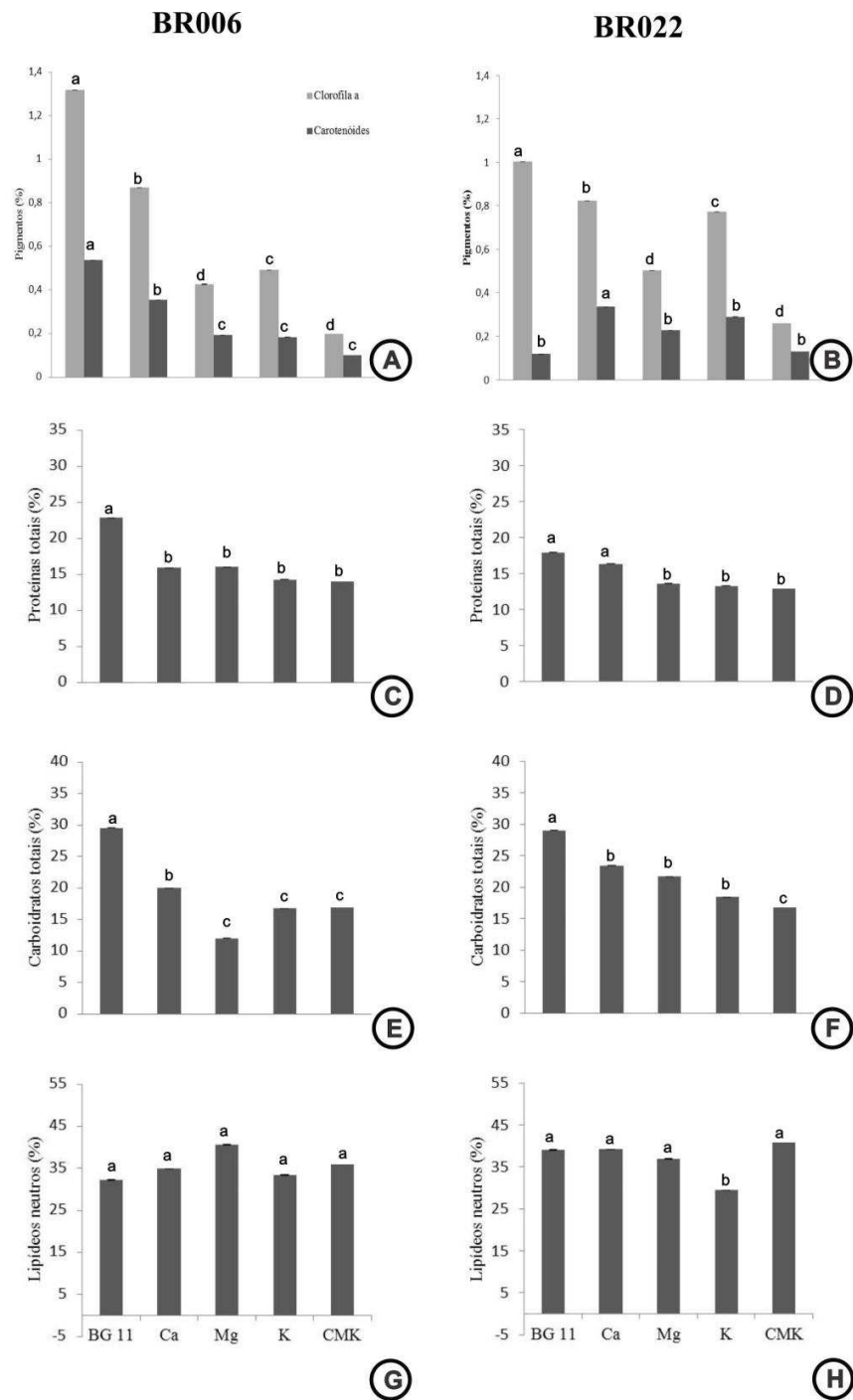


Figura suplementar 2 - Valores percentuais de clorofila a (%), carotenoides (%), lipídeos neutros (%), proteínas totais (%) e carboidratos (%), correspondentes à massa seca obtida (g.L^{-1}), no cultivo da diatomáceas BR006 e BR022, em meio BG 11 modificado com 10mM de silicato de sódio (Na_2SiO_3), suplementado com Cálcio ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), Magnésio [$\text{Mg}(\text{SO}_4)_4$] e Potássio [$\text{KH}_2(\text{PO})_4$], ou combinação de nutrientes. As diferentes letras indicam a diferença estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.