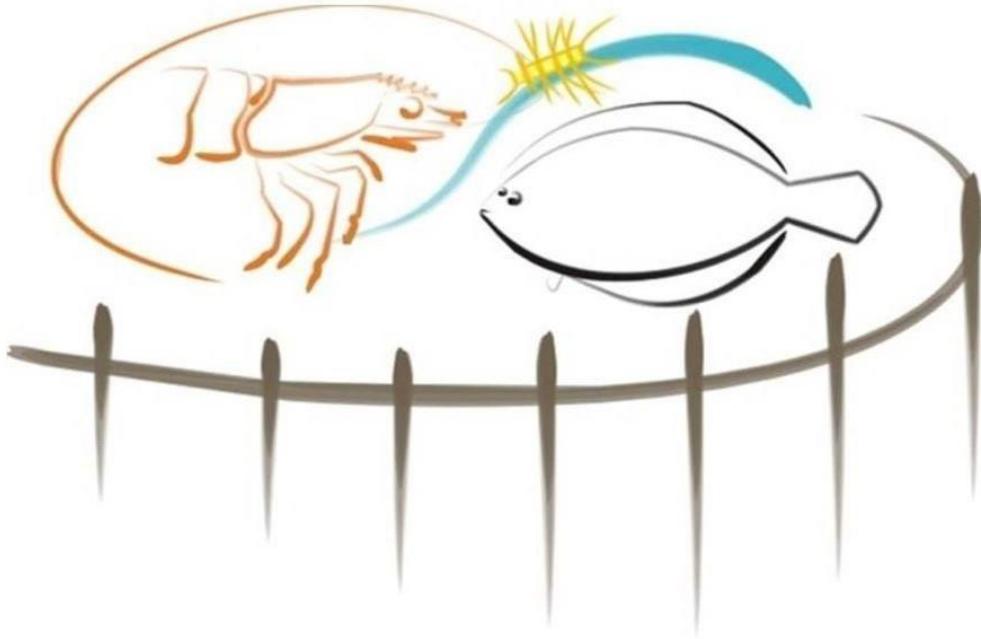


Universidade Federal do Rio grande - FURG
Instituto de Oceanografia - IO
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura



**PRODUÇÃO DE MUTANTES EM MICROALGAS OLEAGINOSAS PARA O
INCREMENTO DO CONTEÚDO LIPÍDICO EM CONDIÇÕES VARIÁVEIS DE
LUZ, SALINIDADE E NITROGÊNIO**

ELAN ALEXIS TÉLLEZ PUEBLAS
RIO GRANDE, RS

2024

Universidade Federal do Rio grande - FURG
Instituto de Oceanografia - IO
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Produção de mutantes em microalgas oleaginosas para o incremento do conteúdo lipídico em condições variáveis de luz, salinidade e nitrogênio.

Elan Alexis Téllez Pueblas

Tese de conclusão de Doutorado apresentada por Elan Alexis Téllez Pueblas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Aquicultura pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Coorientador: Prof. Dr. Paulo César Vergne de Abreu (*in memoriam*)

RIO GRANDE, RS

2024

Ficha Catalográfica

P977p Pueblas, Elan Alexis Téllez.

Produção de mutantes em microalgas oleaginosas para o incremento do conteúdo lipídico em condições variáveis de luz, salinidade e nitrogênio / Elan Alexis Téllez Pueblas. – 2024.
150 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2024.

Orientador: Dr. Luis Fernando Marins.

Coorientador: Dr. Paulo César Vergne de Abreu (*in memoriam*).

1. UV-mutagenese 2. Delineamento composto central 3. Síntese de amido 4. Lipídeo neutro 5. CRISPR/Cas9 I. Marins, Luis Fernando II. Abreu, Paulo César Vergne de III. Título.

CDU 639.3

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA 09/2024

DE DEFESA DA 86ª TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA

No dia vinte oito de março de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, do **ELAN ALEXIS TÉLLEZ PUEBLAS**, orientado pelo Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins (ICB/FURG), Profª. Drª. Dionéia Evangelista Cesar (UFJF), Prof. Dr. Fabio Roselet (IO/FURG), Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes (CENPES/PETROBRAS) Título da Tese: “**PRODUÇÃO DE MUTANTES EM MICROALGAS OLEAGINOSAS PARA O INCREMENTO DO CONTEÚDO LIPÍDICO EM CONDIÇÕES VARIÁVEIS DE LUZ, SALINIDADE E NITROGÊNIO**” Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Luis Fernando Marins, que na qualidade de orientador, passou a palavra para o candidato apresentar a Tese. Após ampla discussão entre os membros da Banca e o candidato, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da Tese, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. O candidato **ELAN ALEXIS TÉLLEZ PUEBLAS** foi considerado **APROVADO**, devendo a versão definitiva da Tese ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador do PPGAq.

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS FERNANDO FERNANDES MARINS
Data: 22/04/2024 16:53:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

- PROF. DR. LUIS FERNANDO FERNANDES MARINS (Orientador – ICB/ FURG)

Documento assinado digitalmente
gov.br DIONEIA EVANGELISTA CESAR
Data: 08/05/2024 22:41:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

- PROFª. DRª. DIONEIA EVANGELISTA CESAR (UFJF)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO FELIPE GABRIEL ROSELET
Data: 07/05/2024 19:43:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

- PROF. DR. FABIO ROSELET (IO/FURG)

Documento assinado digitalmente
gov.br LEONARDO BRANTES BACELLAR MENDES
Data: 07/05/2024 08:59:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

- DR. LEONARDO BRANTES BACELLAR MENDES (CENPES/PETROBRAS)

Assinado de forma digital por
TELLEZ PUEBLAS ELAN ALEXIS -
29566214J
DN: c=ES,
serialNumber=IDCES-29566214J,
givenName=ELAN ALEXIS,
sn=TELLEZ PUEBLAS, ou=TELLEZ
PUEBLAS ELAN ALEXIS - 29566214J
Date: 2024.05.27 18:18:06 +02'00'

- ELAN ALEXIS TÉLLEZ PUEBLAS

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO VIEIRA RODRIGUES
Data: 22/04/2024 14:38:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

- PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador do PPGAq)

“Dedico esta tese à memória do meu pai Fernando e do professor Paulo Abreu, à todas as pessoas que acreditam na ciência como forma de criar um mundo melhor... e especialmente dedico-a à minha mãe Sonia”

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	08
RESUMO GERAL.....	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
As microalgas e os biocombustíveis de 3 geração (3G).....	11
Engenharia genética em microalgas.....	16
Mutação randômica.....	16
Tecnologia CRISPR/Cas9.....	17
OBJETIVO GERAL.....	18
Objetivos específicos.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	32
Material e métodos	34
Resultados e discussão	37
Conclusões.....	49
Referências bibliográficas	50
CAPÍTULO 2.....	56
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e métodos	61
Resultados e discussão	64
Conclusões.....	84
Referências bibliográficas	85
CAPÍTULO 3.....	95
Resumo.....	96
Abstract.....	97
Introdução.....	98
Material e métodos	101
Resultados e discussão	109

Conclusões.....	129
Referências bibliográficas	130
DISCUSSÃO GERAL.....	140
CONCLUSÕES GERAIS.....	144
PERSPECTIVAS	146
REFERÊNCIAS.....	147

Agradecimentos

Ao meu orientador, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de me envolver nesse projeto que me permitiu fazer a ciência que sempre sonhei, e por me incentivar quando acreditava que as coisas não estavam indo pelo caminho certo.

Ao professor Paulo Abreu, por abrir as portas do seu Laboratório e ser o caminho para eu vir ao Brasil.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e a todos os integrantes do LEGENE, pelo tempo, ajudas e bons momentos.

À Estação Marinha de Aquicultura, em especial ao Laboratório de Produção de Microalgas, ao Bifoa e ao Algasul, por me concederem o espaço e a ajuda para realizar essa Tese.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Escola de Química e Alimentos e a todos os seus integrantes, por toda a ajuda.

Aos técnicos do ICB, em especial ao Josencler, pelas conversas sobre cultura, política e, sobretudo, por sempre me ajudar quando ninguém mais conseguia.

Aos amigos da EMA, obrigado pelas ajudas e aventuras vividas.

Aos amigos da Salinha 2, aos que já foram e aos que ainda estão, obrigado por me fazerem rir até nos momentos mais difíceis.

Aos funcionários do ICB, da portaria e da limpeza, que são parte indispensável da logística que todos necessitamos para trabalhar. Sem vocês, ninguém poderia fazer ciência.

Aos amigos do Hotel de Trânsito, que compartilharam e conviveram comigo neste último ano.

Aos meus alunos de dança, por me darem forças e recarregarem minhas energias para continuar lutando. Vocês sempre me proporcionaram o momento mais feliz da semana.

“y sobre todo gracias a mi familia, que siempre me dio el mejor ejemplo que se puede seguir, a mi padre el hombre más trabajador del mundo, que me enseñó que las cosas siempre se tienen que hacer bien. A mis hermanos Lizzett y Dilan por acordarse siempre de mí. Al cabrón de mi primo con el que ‘nunca me falta de na’, a mi hermano Nano que es mi ejemplo a seguir, mi puerto seguro y quién siempre está para salvarme... pero sobre todo, gracias a mi madre, quién siempre se sacrificó por darme las mejores oportunidades y a la que le debo todo mis logros en la vida”

E, finalmente, quero me agradecer a mim mesmo, por não desistir e continuar na luta até quando parecia que não conseguiria ir mais adiante. Chegar até aqui já é uma grande vitória “Enhorabuena campeón”

1 **Resumo geral**

2 Esta tese investiga a identificação, as estratégias de cultivo e a manipulação genética de
3 cepas de microalgas utilizando métodos de mutação randômica e mutação dirigida por meio da
4 tecnologia CRISPR/Cas9 RNP, com o objetivo de aumentar a produção de lipídeos,
5 especialmente lipídeos neutros, visando a potencialização de sua aplicação na produção de
6 biodiesel. Primeiramente, as cepas foram identificadas como *Scenedesmus obliquus* e uma
7 espécie não descrita do gênero *Desmodesmus*, através de técnicas de taxonomia molecular.
8 Posteriormente, na estratégia de mutação randômica, a irradiação com luz UV-C foi utilizada
9 para induzir mutações aleatórias, resultando na obtenção de mutantes da cepa *Desmodesmus*
10 sp. com redução total (tM-10) e parcial (tN-30) da síntese de amido. Ambos apresentaram um
11 aumento significativo nos níveis de lipídeos neutros em comparação com a cepa selvagem. A
12 inibição da síntese de amido redirecionou o fluxo de carbono para a síntese de triglicérides
13 (TAGs), sem comprometer o crescimento das cepas mutantes. Adicionalmente, estratégias de
14 cultivo, como ajustes de salinidade, intensidade luminosa e deficiência de nitrogênio em
15 cultivos de duas etapas, foram validadas para maximizar a produção de biomassa e lipídeos
16 neutros do mutante tN-30, demonstrando a viabilidade desse mutante em condições
17 estressantes. Também foram realizados estudos sobre o perfil de ácidos graxos e o
18 sequenciamento de genes relacionados à síntese de amido e parede celular, além da elaboração
19 de protocolos de extração de RNA e validação de RNAs guias para a endonuclease Cas9,
20 utilizados na implementação da tecnologia CRISPR/Cas9 em ambas as cepas de microalgas.
21 Os resultados sugerem que, para a cepa *Desmodesmus* sp., a mutação aleatória por irradiação
22 com luz UV é uma abordagem eficaz para a obtenção de mutantes com potencial para a
23 produção de lipídeos neutros, destacando a relação com a tecnologia CRISPR/Cas9 RNP. Os
24 resultados dessa Tese destacam a importância do uso de ferramentas genéticas que
25 potencializam o uso das microalgas em processos biotecnológicos e especificamente a cepa tN-
26 30 na produção de biodiesel.

27 **Palavras-chave:** UV-mutagenese; Delineamento composto central; Síntese de amido; Lipídeo
28 neutro; CRISPR/Cas9.

1 **Abstract**

2 This thesis investigates the identification, cultivation strategies, and genetic manipulation of
3 microalgae strains through strategies of random mutagenesis and targeted mutagenesis using
4 CRISPR/Cas9 RNP technology to enhance lipid production, with emphasis on neutral lipids,
5 aiming to enhance their application in biodiesel production. Initially, the strains were identified
6 as *Scenedesmus obliquus* and an undescribed species of the genus *Desmodesmus* through
7 molecular taxonomy techniques. Subsequently, in the random mutagenesis strategy, UV-C light
8 irradiation was used to induce random mutations, resulting in the acquisition of mutants of the
9 *Desmodesmus* sp. strain with total (tM-10) and partial (tN-30) reduction of starch synthesis,
10 both showing a significant increase in neutral lipid levels compared to the wild-type strain.
11 Inhibiting starch synthesis redirected carbon flow towards triglyceride (TAG) synthesis without
12 compromising the growth of mutant strains. Additionally, cultivation strategies, such as
13 adjustments in salinity, light intensity, and nitrogen deficiency in two-stage cultures, were
14 validated to maximize biomass and neutral lipid production of the tN-30 mutant, demonstrating
15 the viability of this mutant under stressful conditions. Studies on fatty acid profiles and
16 sequencing of genes related to starch and cell wall synthesis were also conducted, along with
17 the development of RNA extraction protocols and validation of guide RNAs for the Cas9
18 endonuclease, used in the implementation of CRISPR/Cas9 technology in both microalgae
19 strains. The results suggest that for the *Desmodesmus* sp. strain, random mutagenesis by UV
20 light irradiation is an effective approach for obtaining mutants with potential for neutral lipid
21 production, highlighting its relationship with CRISPR/Cas9 RNP technology. The results of
22 this thesis underscore the importance of using genetic tools that enhance the use of microalgae
23 in biotechnological processes, specifically the tN-30 strain in biodiesel production.

24

25 **Keywords:** UV mutagenesis; Central Composite Design; Starch synthesis; Neutral lipid;
26 CRISPR/Cas9.

27

1 INTRODUÇÃO GERAL

2 As microalgas são organismos fotossintéticos que utilizam energia luminosa juntamente
3 com nutrientes inorgânicos para produzir matéria orgânica (MARKOU; NERANTZIS, 2013) e
4 são as principais responsáveis pela produção de oxigênio atmosférico, produzindo até quase
5 metade do oxigênio do planeta (SAFI *et al.*, 2014). Além disso, são consideradas os produtores
6 primários dos meios aquáticos onde, através da fotossíntese, transformam a matéria inorgânica
7 em orgânica disponibilizando-a para o resto dos níveis tróficos superiores (GRANUM;
8 RAVEN; LEEGOOD, 2005) .

9 No processo da fotossíntese (fase fotoquímica), nas membranas do tilacoide, os
10 pigmentos canalizam a energia luminosa utilizada para gerar energia química em forma de
11 adenosina tri-fosfato e adenina dinucleotídeo fosfato, com oxigênio como produto devido a
12 fotólise da água que se utiliza como doador de elétrons (STIRBET *et al.*, 2020). Posteriormente,
13 na fase bioquímica (estroma), as moléculas energéticas obtidas são utilizadas no ciclo de
14 Calvin-Benson para fixar e reduzir CO₂ em matéria orgânica por meio da ação da enzima
15 Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Como produto do ciclo de Calvin-
16 Benson se obtém um carboidrato de três carbonos denominado gliceraldeído 3-fosfato a partir
17 do qual são sintetizados o resto de componentes celulares (STIRBET *et al.*, 2020; CHISTI,
18 2007).

19 As algas são amplamente conhecidas pelo seu papel na aquicultura, sendo utilizadas
20 como fonte de alimento de alto valor nutricional, no cultivo animais aquáticos (e.g. moluscos,
21 camarões e peixes) em diferentes estágios de crescimento (BOROWITZKA, 1998), compõem
22 o sistema de bioflocos (bio-flocs technology – BFT) (PACHECO-VEGA *et al.*, 2018), atuam
23 no tratamento de efluentes dos cultivos (SIVAKUMAR *et al.*, 2012) e são fontes valiosas para
24 obtenção de compostos de elevado valor comercial (e.g. proteínas, carotenóides, lipídeos,
25 polissacarídeos) (BRASIL *et al.*, 2017). Com uma produção anual de algas de
26 aproximadamente 13 milhões de toneladas e especificamente 9.200 toneladas de biomassa seca
27 de microalgas, o desenvolvimento de pesquisas, bem como o uso biotecnológico desses
28 organismos fotossintetizantes, têm contribuído para expansão da área de atuação da aquicultura
29 para o campo da bioenergia através da sua utilização para a produção de biocombustível (ROY;
30 PAL, 2015; VASSILEV; VASSILEVA, 2016) .

31

32 *As microalgas e os biocombustíveis de 3 geração (3G)*

33 Os combustíveis fósseis são a principal fonte de energia utilizada, correspondendo a
34 mais de 80% da matriz energética mundial. Impulsionado pela demanda energética, o setor de

1 energia foi responsável por um aumento nas emissões globais de CO₂ de 0,9%, ou 321 milhões
2 de toneladas, em 2022, atingindo um novo recorde de mais de 36,8 bilhões de toneladas (IEA,
3 2023). Impulsionada pela maior demanda de energia em 2023, as emissões globais de CO₂
4 aumentaram em 410 milhões de toneladas, 1,1% a mais do que o ano anterior, atingindo uma
5 alta histórica de 37,4 bilhões de toneladas (IEA, 2024). Além do crescimento das energias de
6 origem fósseis, as energias limpas também tem apresentado um crescimento importantes;
7 segundo os dados da Agência Internacional de Energia (IEA), o crescimento das energias
8 limpas foi o dobro do que as energias fósseis, especialmente nos últimos cinco anos (IEA,
9 2024).

10 Nos últimos anos, os biocombustíveis vêm ganhando destaque na matriz energética por
11 utilizar matérias-primas de origem vegetal para sua produção. Porém, o cultivo dessas matrizes
12 (e.g. cana-de-açúcar, milho, girassol, resíduos agrícolas ou florestais) utiliza terras
13 agricultáveis, água doce, e até os próprios alimentos, que poderiam ser utilizadas para produção
14 de alimento (NAIK *et al.*, 2010; SIMS *et al.*, 2010). Como alternativa, os biocombustíveis de
15 3ª geração (3G) são obtidos a partir do cultivo de biomassa de algas podendo se produzir
16 biodiesel, biometanol, bioetanol, biobutanol, entre outros (CHISTI, 2007; SAHA *et al.*, 2019).

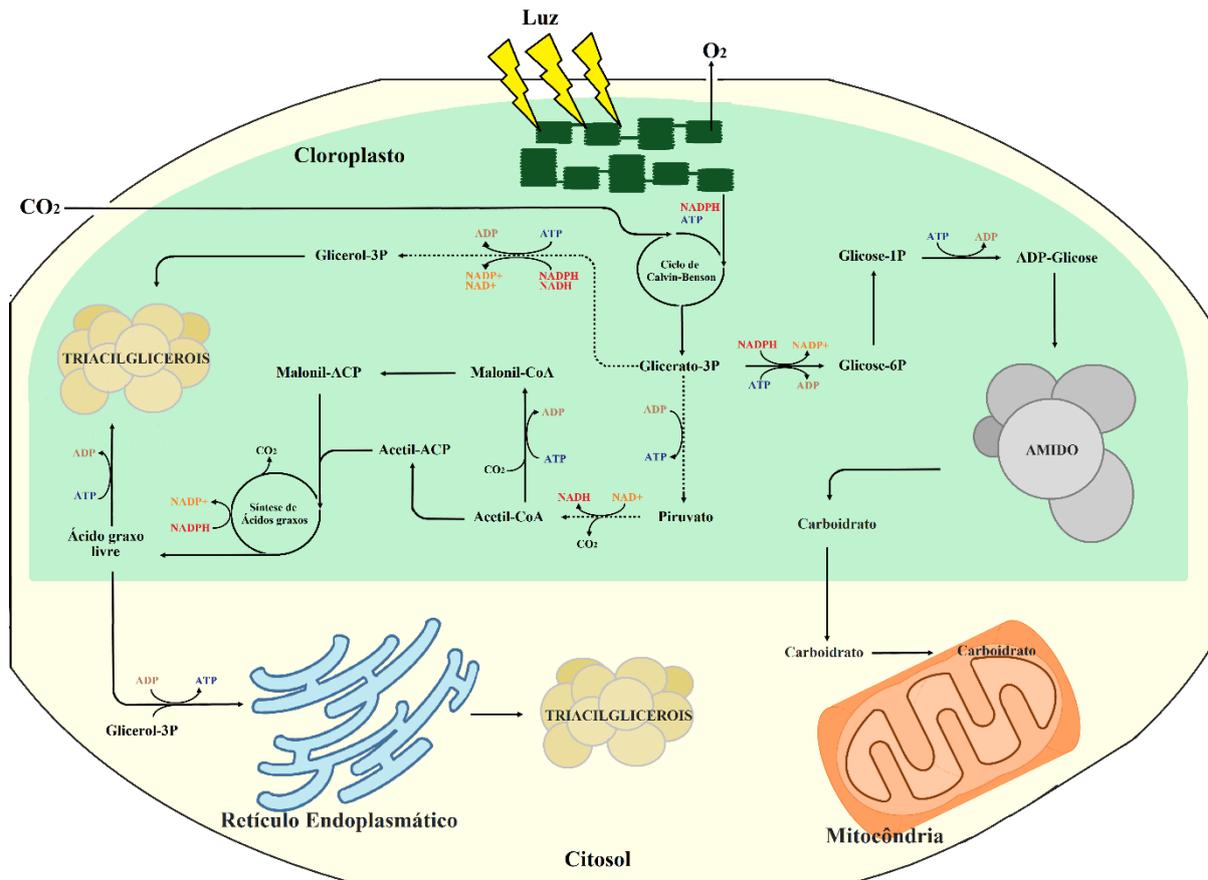
17 Microalgas podem ser cultivadas em águas salinas ou de águas de rejeito, o que confere
18 a vantagem de não competirem com as terras e os recursos utilizados para a agricultura
19 (CHISTI, 2007). Os biocombustíveis 3G reduzem o efeito estufa, já que a biomassa a partir da
20 qual são gerados provem da fixação de CO₂ atmosférico mediante a fotossíntese, além disso, as
21 microalgas a partir das quais são gerados os combustíveis 3G apresentam uma maior
22 produtividade comparado com os seus antecessores (CHISTI, 2007; SAHA *et al.*, 2019), e
23 especificamente, possuem alta produtividade de lipídeos os quais, após extração, são
24 transesterificados para a obtenção do biodiesel (WIJFFELS; BARBOSA, 2010). Apesar das
25 vantagens do uso de biocombustíveis de microalgas, todavia existem diversos desafios que
26 afetam ao custo de produção, dificultando a competição em preço com os combustíveis de
27 origem fóssil. Para a geração de biodiesel por exemplo; metodologias de coleta ou concentração
28 dos cultivos e os solventes para a extração dos lipídeos ou quebra celular são os principais
29 processos que incrementam o custo de produção de biodiesel (ALAM; WANG, 2019). Por isso
30 é necessário aumentar os teor de lipídeos celulares e o rendimento lipídico para reduzir as
31 diferenças com os custos de produção dos combustíveis fósseis e poder viabilizar a produção
32 do biodiesel a partir do cultivo de microalgas.

33 Com eficiência fotossintética maior que as plantas terrestres, utilizando
34 aproximadamente 183 Gt de CO₂ para produzir 100 Gt de biomassa, a aplicação das microalgas

1 para produção de biocombustível também pode estar associada com a mitigação de CO₂ gerado
2 pelas instalações industriais, contribuindo ainda mais para a sustentabilidade da produção
3 (HUANG; TAN, 2014). Além disso, esses microrganismos possuem (i) taxas de crescimento
4 elevadas, (ii) diversidade ecológica e metabólica, que possibilita selecionar espécies adaptadas
5 a cada região, (iii) possibilidade de cultivo em água salgada, resíduos municipais e
6 agroindustriais, e terras impróprias para a agricultura, (iv) necessitam de requisitos mínimos de
7 nutrientes, o que contribui para diminuir o custo de produção, e (v) cultivos em diversos
8 sistemas (e.g. lagoas, fotobiorreatores), possibilitando a produção próxima ao local de
9 utilização, diminuindo o custo com o transporte (BRENNAN; OWENDE, 2013; CHEN *et al.*,
10 2011; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

11 Um pré-requisito fundamental para selecionar cepas de microalgas para a geração de
12 biodiesel é a alta produção de lipídeos neutros, como os triacilgliceróis (TAGs). TAGs e amido
13 são substâncias de reserva produzidas pelas microalgas quando a condição do ambiente se torna
14 desfavorável. A Figura 1 ilustra, simplificada, duas vias possíveis para a formação de
15 TAGs em microalgas: uma das rotas se dá nos cloroplastos e a outra rota é através das
16 membranas do retículo endoplasmático (ER) no citosol. Sabe-se que o acúmulo dessas
17 moléculas energéticas em condições limitantes de crescimento é espécie-específica. Além
18 disso, também agem como “drenos” de elétrons produzidos em excesso pelos fotossistemas, os
19 quais podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROS) e causar estresse fotooxidativo (Hu *et*
20 *al.*, 2008). Espécies do gênero *Scenedesmus* são conhecidas por acumular TAGs, em alguns
21 casos correspondendo em até 45% do peso da sua biomassa seca (CHISTI, 2007; KLEIN-
22 MARCUSCHAMER *et al.*, 2013).

23 As microalgas do gênero *Scenedesmus* sp. são microalgas de água doce pertencentes à
24 divisão Chlorophyta, as quais possuem alto conteúdo lipídico, e que são chamadas de
25 “oleaginosas” e que sintetizam tais moléculas em situações ambientais desfavoráveis (e.g.
26 deficiência de nitrogênio ou fósforo) (ABOU-SHANAB *et al.*, 2011; XIN; HONG-YING; YU-
27 PING, 2011), tornando-as como matéria para produção de biodiesel 3G. Em alguns casos,
28 espécies do gênero *Scenedesmus* podem acumular TAGs, correspondendo em até 45% do peso
29 da sua biomassa seca (CHISTI, 2007; KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2013). Por outro
30 lado, espécies de *Desmodesmus* também são cosmopolitas e apresentam características
31 interessantes, como alta taxa de crescimento, resistência e adaptabilidade a diferentes condições
32 ambientais (HEGEWALD; BRABAND, 2017), além de alta produção de lipídeos e capacidade
33 de bioremediação de ambientes eutróficos (RAI *et al.*, 2022; SAMORI *et al.*, 2013).



1

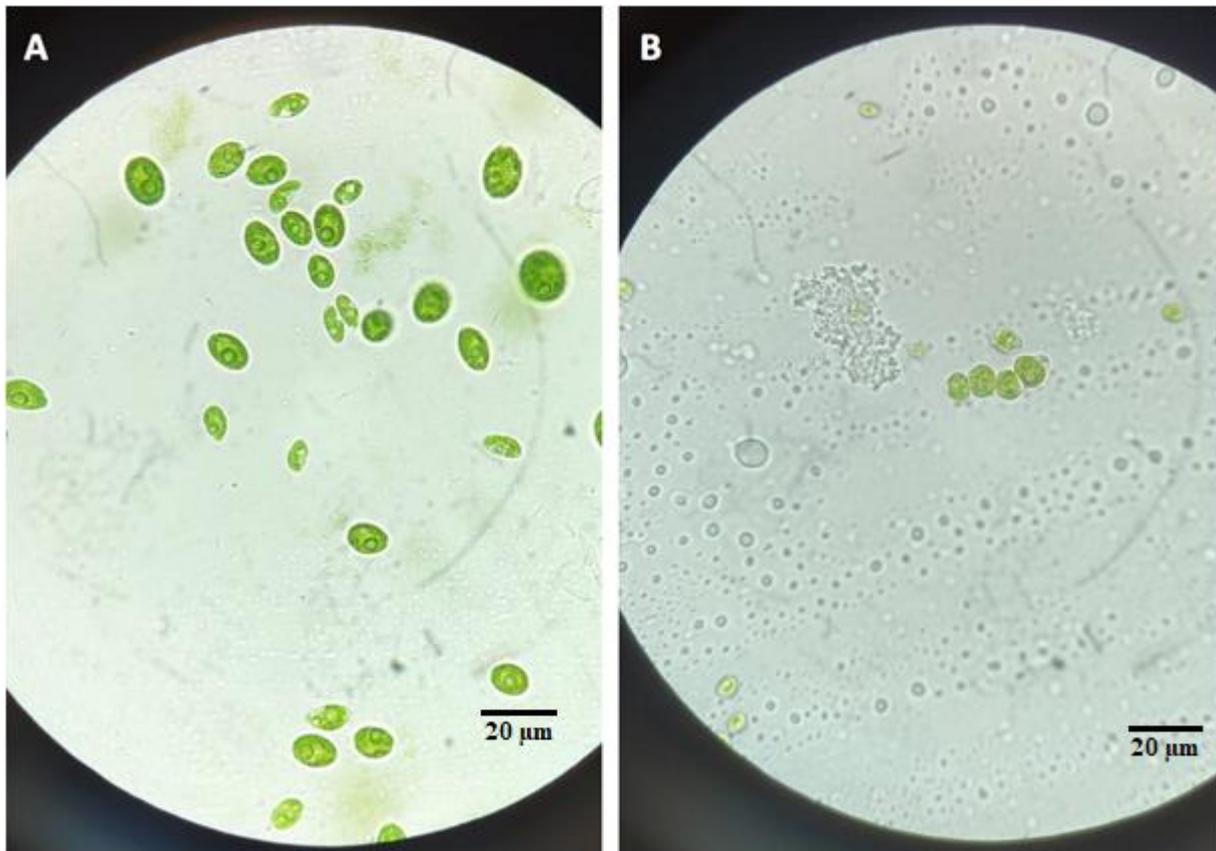
2 **Figura 1.** Rota de síntese dos triacilgliceróis (TAG) e amido em microalgas. As linhas
 3 tracejadas referem-se às reações que ocorrem no citosol.

4

5 Recentemente, pesquisadores do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo
 6 Américo Miguez de Mello (CENPES/PETROBRAS, Brasil) isolaram duas cepas
 7 preliminarmente classificadas como pertencente aos gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus*
 8 (Figuras 2A e 2B, respectivamente), ambas com capacidade de crescer em água de produção,
 9 resíduo derivado da extração do petróleo. A água de produção é um resíduo rico em carbonatos,
 10 bicarbonatos, sulfatos, cloro e outros metais como Ca, Mg, Na, Fe, Ba ou Sn, que é extraído
 11 juntamente com o petróleo de depósitos naturais. Após a extração e separação dos óleos, a água
 12 de produção pode ser re-injetada nos poços de petróleo, ou armazenada, tornando-se um risco
 13 potencial para o meio ambiente. A cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg tem capacidade de
 14 crescimento em altas temperaturas (acima de 40 °C) e alta resistência à contaminação biológica
 15 pela produção de compostos alelopáticos (infoquímicos). Essa cepa *Desmodesmus* sp.
 16 Petrobras/Furg, tem um tamanho que varia aproximadamente entre os 3 – 12 µm, também
 17 demonstrou alto desempenho quanto à coleta de biomassa usando processos de baixa energia
 18 (floculação e sedimentação) e excelente desempenho para o uso de resíduos sólidos da indústria

1 de petróleo e gás, e pode ser cultivada com a adição de CO₂ e cascalho de rocha de perfuração
2 em um ambiente marítimo (Patente NI 21/123; dados não publicados).

3



4

5 **Figura 2.** Visualização ao microscópio ótico (1000 X de magnificação) das cepas *Scenedesmus*
6 *obliquus* (A) e *Desmodesmus* sp. (B).

7

8 *Scenedesmus* sp. podem variar de tamanho entre 3 - 31 µm, possuindo células de
9 diversos formatos e são encontradas em colônias (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER,
10 2014). Na última década, espécies de *Scenedesmus* têm despertado um grande interesse devido
11 às suas qualidades, como crescimento rápido e produção de moléculas de interesse comercial,
12 como carotenóides e astaxantina (QIN *et al.*, 2008), ou luteína (FERNÁNDEZ-SEVILLA; ACIÉN
13 FERNÁNDEZ; MOLINA GRIMA, 2010; SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Com a capacidade de tolerar um
14 intervalo amplo de temperatura e crescer utilizando diferentes fontes de nutrientes,
15 *Scenedesmus* sp. tem sido utilizada para produção de biomassa, tratamento de efluentes,
16 eliminando uma grande quantidade de nutrientes inorgânicos após o seu crescimento, e na
17 produção de biodiesel (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014; XIN *et al.*, 2010).
18 Estudos realizados por HO *et al.* (2010) concluíram que *Scenedesmus obliquus* é uma espécie
19 com potencial para a mitigação das emissões de CO₂ e produção de biodiesel. Em situações

1 ambientais desfavoráveis ou de estresse, como deficiência de nitrogênio ou fósforo,
2 *Scenedesmus* pode produzir uma grande quantidade de lipídeos (MANDAL; MALLICK,
3 2009), o que a torna uma forte candidata para a produção de biodiesel. Além disso, algumas
4 cepas de *Scenedesmus* podem crescer de 4 a 35°C, como é o caso de *Scenedesmus* sp. NJ-1
5 (CHEN *et al.*, 2012), e outras como *Scenedesmus abundans* que toleram até 45°C (GUPTA *et*
6 *al.*, 2016). Entretanto, BREUER *et al.* (2013a) mostraram que *S. obliquus* pode acumular mais
7 carboidratos (40 a 60% do peso seco) do que TAGs (30 a 45% do peso seco), evidenciando que
8 o fluxo de carbono, mesmo em uma microalga considerada oleaginosa, é desfavorável em
9 relação ao acúmulo de carboidratos.

10

11 ***Engenharia genética em microalgas***

12 Através da aplicação de técnicas de engenharia genética, é possível realizar alterações
13 nas rotas metabólicas desses microrganismos em questão, desenvolvendo linhagens
14 recombinantes que aumentem a produtividade de biocombustível por biomassa (SAVAKIS;
15 HELLINGWER, 2015). Poucos estudos incluem engenharia genética ou modificações
16 genéticas usando técnicas moleculares em *Scenedesmus*. A maior parte deste tipo de trabalho
17 em microrganismos fotossintéticos é realizada em organismos modelo como a microalga
18 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella* sp. ou *Nannochloropsis* sp. (DORON; SEGAL;
19 SHAPIRA, 2016; MUSSGNUM, 2015; POLINER; FARRÉ; BENNING, 2018). Até o
20 momento, existem apenas cinco genomas sequenciados para o gênero *Scenedesmus* no
21 GenBank da plataforma NCBI:
22 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=91192>). Na mesma plataforma,
23 existem só duas entradas ao genoma sequenciado de cepas correspondentes a espécie
24 *Desmodesmus armatus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=91202>).

25

26 ***Mutação randômica***

27 O método mais comumente empregado na engenharia genética é mutação randômica,
28 que pode ser realizada, por exemplo, por exposição à radiação de luz ultravioleta (UV-C) ou
29 reação em cadeia da polimerase propensa a erros (Ep-PCR). A aplicação dessa técnica permite
30 a criação de uma biblioteca de variantes de uma determinada enzima por meio de mutações
31 aleatórias em seu gene (McCullum *et al.*, 2010). Apesar de fornecer inúmeros mutantes de uma
32 mesma proteína, essa técnica geralmente produz mais mutações deletérias do que mutações
33 vantajosas e é dependente do rastreamento para identificar as variantes desejadas, o que pode
34 vir a ser um processo caro, demorado, totalmente aleatório e nem sempre fornecer o resultado

1 esperado (KIM *et al.*, 2020). DE JAEGUER e colaboradores (2014) realizaram modificações
2 genéticas em uma espécie de *Scenedesmus* por mutação randômica, utilizando luz UV para
3 bloquear a síntese de amido visando aumentar a produção de TAGs. Tratamento com luz UV
4 em microalgas do gênero *Desmodesmus* também têm sido relatados. SIJIL e colaboradores
5 expuseram cultivos de *Desmodesmus* a luz UV com a finalidade de aumentar a produção de
6 lipídeos (SIJIL; SARADA; CHAUHAN, 2019).

7

8 **Tecnologia CRISPR/Cas9**

9 O sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é
10 composto por um ou mais *locus* presentes nos genomas de algumas bactérias e na maioria das
11 arqueias, constituído de múltiplas sequências palindrômicas curtas, as quais são espaçadas por
12 sequências exógenas pequenas (27 a 72 pb). Essas sequências espaçadoras, em geral, têm
13 origem no DNA de vírus e constituem a base de um sistema imune adaptativo de procariontes
14 (FAURE; MAKAROVA; KOONIN, 2019; MAKAROVA *et al.*, 2020). Associado ao *locus*
15 CRISPR, foi identificado outro *locus* denominado Cas (CRISPR-associated), cujos genes
16 codificam para nucleases de DNA (GASIUNAS *et al.*, 2012; JINEK *et al.*, 2012). O sistema
17 funciona a partir da transcrição do *locus* CRISPR, cujos transcritos são processados por
18 endonucleases Cas para gerar pequenos RNAs CRISPR (crRNAs). Estes crRNAs interagem
19 com RNAs auxiliares transativadores (tracrRNAs), originando uma dupla fita de RNA
20 denominada RNA guia (gRNA). Os gRNAs interagem com a nuclease Cas, principalmente a
21 Cas9, formando um complexo que irá atuar clivando qualquer DNA que seja compatível com
22 o gRNA. Assim, o DNA viral que tiver parte da sua informação genética anteriormente
23 incorporada no *locus* CRISPR da bactéria poderá ser eliminado numa segunda invasão através
24 da ação da Cas9 direcionada por gRNA (FAURE; MAKAROVA; KOONIN, 2019;
25 MAKAROVA *et al.*, 2020).

26 CRISPR/Cas9 representa uma das técnicas mais promissoras para a edição de genes e
27 genomas, uma vez que basta sintetizar um gRNA e expressar uma Cas9 para clivar uma região
28 específica do genoma da célula-alvo. Caso o sistema seja utilizado apenas para fazer uma
29 quebra na dupla fita do DNA, as falhas naturais do sistema de reparo, geradas pela inserção de
30 “indels” (inserções ou deleções), ocasionarão na perda da funcionalidade do gene. Se uma
31 molécula de DNA homóloga à região do corte contendo a alteração desejada for introduzida
32 junto com o sistema CRISPR/Cas9, o sistema de recombinação homóloga poderá substituir o
33 gene original por uma versão modificada, “editando” a informação original (KIM; KIM, 2014).
34 Além disso, a metodologia CRISPR/Cas9 RNP sintetiza o gRNA e a proteína Cas9 *in vitro*,

1 formando o sistema gRNA-Cas9 que é introduzido no interior da célula para efetuar a edição.
2 Esse sistema de “Ribonucleoproteína” (RNA + proteína) é livre de transgenes, o que gera cepas
3 geneticamente editadas, mas não transgênicas (CHANG *et al.*, 2020). Até a presente data, não
4 conhecemos estudos que tenham implementado a tecnologia CRISPR/Cas9 no gênero
5 *Scenedesmus* e *Desmodesmus*. Porém, já se conhecem alguns trabalhos de engenharia genética
6 dirigida no gênero *Scenedesmus*. CHEN *et al.* (2016) utilizaram a técnica de eletroporação para
7 inserir em *Scenedesmus* sp. o gene DGTT1 de diacilglicerol aciltransferase tipo 2 (DGAT) para
8 aumentar a produção de lipídeos. Um estudo recente mostrou a compatibilidade de
9 *Scenedesmus* sp. com a transformação por *Agrobacterium tumefaciens* (SUTTANGKAKUL *et*
10 *al.*, 2019). Embora espécies de *Scenedesmus* sejam bastante promissoras para a produção de
11 óleo, que pode ser usado para a produção de biodiesel, existe uma carência no desenvolvimento
12 de técnicas moleculares avançadas e otimizadas para essas microalgas, como por exemplo a
13 aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9.

14 O Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES) isolou cepas do gênero *Scenedesmus* e
15 *Desmodesmus* em águas oriundas da extração de petróleo. Dentro desse contexto, a aplicação
16 de técnicas moleculares, como a mutação randômica por exposição à radiação ultravioleta (UV)
17 e a metodologia CRISPR-Cas9 RNP, visando aumentar a produção lipídica em cepas de
18 *Scenedesmus obliquus* e *Desmodesmus* sp., cultivadas em água de produção, pode contribuir
19 para o desenvolvimento de microalgas mutantes não transgênicas capazes não só de viabilizar
20 a produção de biodiesel 3G, como também possibilitar integrar nesse processo o
21 reaproveitamento de um resíduo acumulado na indústria petroquímica.

22

23 **OBJETIVO GERAL**

24 Produzir mutantes não-transgênicos com menor capacidade de sintetizar amido
25 (*starchless*) e maior teor de lipídeos neutros, em cepas de *Scenedesmus obliquus* e
26 *Desmodesmus* sp. da coleção do CENPES-PETROBRAS.

27

28 **Objetivos específicos**

- 29 1. Confirmar o status taxonômico das duas cepas de microalgas alvo deste estudo através
30 de filogenia molecular;
- 31 2. Sequenciar genes relacionados à síntese de amido;
- 32 3. Produzir e selecionar mutantes de microalgas com menor produção de amido utilizando
33 mutagênese randômica e CRISPR/Cas9;

- 1 4. Avaliar a produção de biomassa e o acúmulo de lipídeos neutros, carboidratos e
- 2 proteínas em escala laboratorial dos mutantes obtidos;
- 3 5. Determinar as melhores condições de cultivo dos mutantes que permitam o incremento
- 4 da produção de lipídeos neutros sem comprometimento da produção de biomassa.

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2
3 ABOU-SHANAB, Reda A.I.; HWANG, Jae-Hoon; CHO, Yunchul; MIN, Booki; JEON,
4 Byong-Hun. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a
5 potential source for biodiesel production. **Applied Energy**, vol. 88, no. 10, p. 3300–3306, Oct.
6 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.060>.

7
8 ALAM, Md. Asraful; WANG, Zubao. **Microalgae Biotechnology for Development of**
9 **Biofuel and Wastewater Treatment**. [S. l.: s. n.], 2019. [https://doi.org/10.1007/978-98113-](https://doi.org/10.1007/978-98113-2264-8)
10 [2264-8](https://doi.org/10.1007/978-98113-2264-8).

11
12 BOROWITZKA, M. A. Algae as food. **Microbiology of Fermented Foods**. Boston, MA:
13 Springer US, 1998. p. 585–602. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_18.

14
15 BRASIL, Bruno dos Santos Alves Figueiredo; DE SIQUEIRA, Félix Gonçalves; SALUM,
16 Thaís Fabiana Chan; ZANETTE, Cristina Maria; SPIER, Michele Rigon. Microalgae and
17 cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, vol. 25, p. 76–89, Jul. 2017.
18 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035>.

19
20 BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from Microalgae: Towards Meeting Advanced
21 Fuel Standards. **Advanced Biofuels and Bioproducts**. New York, NY: Springer New York,
22 2013. p. 553–599. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_24.

23
24 BREUER, Guido; EVERS, Wendy A. C.; DE VREE, Jeroen H.; KLEINEGRIS, Dorinde M.
25 M.; MARTENS, Dirk E.; WIJFFELS, René H.; LAMERS, Packo P. Analysis of Fatty Acid
26 Content and Composition in Microalgae. **Journal of Visualized Experiments**, no. 80, 1 Oct.
27 2013. <https://doi.org/10.3791/50628>.

28
29 CHANG, Kwang Suk; KIM, Jongrae; PARK, Hanwool; HONG, Seong Joo; LEE, Choul Gyun;
30 JIN, Eon Seon. Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis*
31 sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method. **Bioresource Technology**, vol. 303, 1 May
32 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122932>.

1 CHEN, Chun Yen; YEH, Kuei Ling; AISYAH, Rifka; LEE, Duu Jong; CHANG, Jo Shu.
2 Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A
3 critical review. **Bioresource Technology**, vol. 102, no. 1, 2011.
4 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
5

6 CHEN, Chun-Yen; KAO, Ai-Ling; TSAI, Zheng-Chia; CHOW, Te-Jin; CHANG, Hsin-
7 Yueh; ZHAO, Xin-Qing; CHEN, Po-Ting; SU, Hsiang-Yen; CHANG, Jo-Shu. Expression of
8 type 2 diacylglycerol acyltransferase gene *DGTT1* from *Chlamydomonas reinhardtii* enhances
9 lipid production in *Scenedesmus obliquus*. **Biotechnology Journal**, vol. 11, no. 3, p. 336–344,
10 16 Mar. 2016. <https://doi.org/10.1002/biot.201500272>.
11

12 CHEN, Zhuo; GONG, Yangmin; FANG, Xiantao; HU, Hanhua. Scenedesmus sp. NJ-1 isolated
13 from Antarctica: a suitable renewable lipid source for biodiesel production. **World Journal of**
14 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 28, no. 11, p. 3219–3225, 1 Nov. 2012.
15 <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1132-0>.
16

17 CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, vol. 25, no. 3, p. 294–
18 306, May 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
19

20 DE JAEGER, Lenny; VERBEEK, Ruben EM; DRAAISMA, René B; MARTENS, Dirk E;
21 SPRINGER, Jan; EGGINK, Gerrit; WIJFFELS, René H. Superior triacylglycerol (TAG)
22 accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and
23 characterization. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 7, no. 1, p. 69, 2014.
24 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-69>.
25

26 DORON, Lior; SEGAL, Na'ama; SHAPIRA, Michal. Transgene Expression in Microalgae—
27 From Tools to Applications. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, 22 Apr. 2016.
28 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>.
29

30 FAURE, Guilhem; MAKAROVA, Kira S.; KOONIN, Eugene V. CRISPR–Cas: Complex
31 Functional Networks and Multiple Roles beyond Adaptive Immunity. **Journal of Molecular**
32 **Biology**, vol. 431, no. 1, p. 3–20, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.030>.
33

1 FERNÁNDEZ-SEVILLA, José M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E.
2 Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied Microbiology and**
3 **Biotechnology**, vol. 86, no. 1, p. 27–40, 21 Mar. 2010. [https://doi.org/10.1007/s00253-009-](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2420-y)
4 [2420-y](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2420-y).
5
6 GASIUNAS, Giedrius; BARRANGOU, Rodolphe; HORVATH, Philippe; SIKSNYS,
7 Virginijus. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for
8 adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 109,
9 no. 39, 25 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
10
11 GRANUM, Espen; RAVEN, John A; LEEGOOD, Richard C. How do marine diatoms fix 10
12 billion tonnes of inorganic carbon per year? **Canadian Journal of Botany**, vol. 83, no. 7, p.
13 898–908, 1 Jul. 2005. <https://doi.org/10.1139/b05-077>.
14
15 GUPTA, Sanjay Kumar; ANSARI, Faiz Ahmad; SHRIWASTAV, Amritanshu; SAHOO,
16 Narendra Kumar; RAWAT, Ismail; BUX, Faizal. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and
17 *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production
18 for bio-fuels. **Journal of Cleaner Production**, vol. 115, p. 255–264, Mar. 2016.
19 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.040>.
20
21 HEGEWALD, Eberhard; BRABAND, Anke. A taxonomic revision of *desmodesmus* serie
22 *desmodesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). **Fottea**, vol. 17, no. 2, 2017.
23 <https://doi.org/10.5507/fot.2017.001>.
24
25 HO, Shih-Hsin; CHEN, Wen-Ming; CHANG, Jo-Shu. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a
26 potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**,
27 vol. 101, no. 22, p. 8725–8730, Nov. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.112>.
28
29 HUANG, Chih Hung; TAN, Chung Sung. A review: CO₂ utilization. **Aerosol and Air Quality**
30 **Research**, vol. 14, no. 2, 2014. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2013.10.0326>.
31
32 IEA. CO₂ Emissions in 2022 – Analysis - IEA. **Global Energy**, vol. 62, no. 10, 2023.
33

1 IEA (2024), Emisiones de CO2 en 2023 , IEA, París [https://www.iea.org/reports/co2-](https://www.iea.org/reports/co2-emissions-in-2023)
2 [emissions-in-2023](https://www.iea.org/reports/co2-emissions-in-2023), Licencia: CC BY 4.0
3
4 JINEK, Martin; CHYLINSKI, Krzysztof; FONFARA, Ines; HAUER, Michael; DOUDNA,
5 Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA
6 Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, vol. 337, no. 6096, p. 816–821, 17
7 Aug. 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
8
9 KIM, Hyongbum; KIM, Jin-Soo. A guide to genome engineering with programmable
10 nucleases. **Nature Reviews Genetics**, vol. 15, no. 5, p. 321–334, 2 May 2014.
11 <https://doi.org/10.1038/nrg3686>.
12
13 KIM, Jongrae; KIM, Minjae; LEE, Suhyeon; JIN, EonSeon. Development of a *Chlorella*
14 *vulgaris* mutant by chemical mutagenesis as a producer for natural violaxanthin. **Algal**
15 **Research**, vol. 46, p. 101790, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101790>.
16
17 KLEIN-MARCUSCHAMER, Daniel; CHISTI, Yusuf; BENEMANN, John R.; LEWIS,
18 David. A matter of detail: Assessing the true potential of microalgal biofuels. **Biotechnology**
19 **and Bioengineering**, vol. 110, no. 9, p. 2317–2322, 21 Sep. 2013.
20 <https://doi.org/10.1002/bit.24967>.
21
22 MAKAROVA, Kira S.; WOLF, Yuri I.; IRANZO, Jaime; SHMAKOV, Sergey A.;
23 ALKHNABASHI, Omer S.; BROUNS, Stan J. J.; CHARPENTIER, Emmanuelle; CHENG,
24 David; HAFT, Daniel H.; HORVATH, Philippe; MOINEAU, Sylvain; MOJICA, Francisco J.
25 M.; SCOTT, David; SHAH, Shiraz A.; SIKSNYS, Virginijus; TERNS, Michael P.;
26 VENCLOVAS, Česlovas; WHITE, Malcolm F.; YAKUNIN, Alexander F.; ... KOONIN,
27 Eugene V. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived
28 variants. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 18, no. 2, p. 67–83, 19 Feb. 2020.
29 <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.
30
31 MANDAL, Shovon; MALLICK, Nirupama. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential
32 source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 84, no. 2, p.
33 281–291, 28 Aug. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1935-6>.

1
2 MARKOU, Giorgos; NERANTZIS, Elias. Microalgae for high-value compounds and biofuels
3 production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology**
4 **Advances**, vol. 31, no. 8, p. 1532–1542, Dec. 2013.
5 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>.
6
7 MUSSGNUG, Jan H. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied**
8 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, no. 13, p. 5407–5418, 30 Jul. 2015.
9 <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6698-7>.
10
11 NAIK, S.N.; GOUD, Vaibhav V.; ROUT, Prasant K.; DALAI, Ajay K. Production of first and
12 second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy**
13 **Reviews**, vol. 14, no. 2, p. 578–597, Feb. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>.
14
15 PACHECO-VEGA, Juan M.; CADENA-ROA, Marco A.; LEYVA-FLORES, Jesús A.;
16 ZAVALA-LEAL, O. Iram; PÉREZ-BRAVO, Elizabeth; RUIZ-VELAZCO, Javier M.J. Effect
17 of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp
18 culture. **Aquaculture Reports**, vol. 11, p. 24–30, Aug. 2018.
19 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.05.003>.
20
21 PITTMAN, Jon K.; DEAN, Andrew P.; OSUNDEKO, Olumayowa. The potential of
22 sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, vol.
23 102, no. 1, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>.
24
25 POLINER, Eric; FARRÉ, Eva M.; BENNING, Christoph. Advanced genetic tools enable
26 synthetic biology in the oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp. **Plant Cell Reports**, vol.
27 37, no. 10, p. 1383–1399, 6 Oct. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2270-0>.
28
29 QIN, Shan; LIU, Guo-Xiang; HU, Zheng-Yu. The accumulation and metabolism of astaxanthin
30 in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochemistry**, vol. 43, no. 8, p. 795–802,
31 Aug. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.03.010>.
32
33 RAI, Anshuman; SIROTIYA, Vandana; MOURYA, Megha; KHAN, Mohd Jahir; AHIRWAR,
34 Ankesh; SHARMA, Anil K.; KAWATRA, Rajeev; MARCHAND, Justine; SCHOEFS, Benoit;

1 VARJANI, Sunita; VINAYAK, Vandana. Sustainable treatment of dye wastewater by
2 recycling microalgal and diatom biogenic materials: Biorefinery perspectives. **Chemosphere**,
3 vol. 305, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135371>.
4

5 RAMIREZ, Nelzy Neyza Vargas; FARENZENA, Marcelo; TRIERWEILER, Jorge Otávio.
6 Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and**
7 **Technology**, vol. 57, no. 5, p. 630–635, Oct. 2014. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401791)
8 [8913201401791](https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401791).
9

10 ROY, Sudeshna Sen; PAL, Ruma. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special
11 References to Nutritional Value and Fish Dietetics. **Proceedings of the Zoological Society**,
12 vol. 68, no. 1, p. 1–8, 4 Jun. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9>.
13

14 SAFI, Carl; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre-Yves; VACA-
15 GARCIA, Carlos. Morphology, composition, production, processing and applications of
16 *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 35, p. 265–
17 278, Jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
18

19 SAHA, Sampa; SHARMA, Arun; PURKAYASTHA, Srijita; PANDEY, Kalpana; DHINGRA,
20 Shaifali. Bio-plastics and Biofuel. **Plastics to Energy**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 365–376.
21 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813140-4.00014-5>.
22

23 SAMORÌ, Giulia; SAMORÌ, Chiara; GUERRINI, Franca; PISTOCCHI, Rossella. Growth and
24 nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium
25 in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, vol.
26 47, no. 2, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006>.
27

28 SÁNCHEZ, J.F.; FERNÁNDEZ, J.M.; ACIÉN, F.G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.;
29 MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new
30 strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, vol. 43, no. 4, p. 398–405, Apr. 2008.
31 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.004>.
32

1 SAVAKIS, Philipp; HELLINGWERF, Klaas J. Engineering cyanobacteria for direct biofuel
2 production from CO₂. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 33, p. 8–14, Jun. 2015.
3 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.09.007>.
4

5 SIJIL, P.V.; SARADA, R.; CHAUHAN, V.S. Enhanced accumulation of alpha-linolenic acid
6 rich lipids in indigenous freshwater microalga *Desmodesmus* sp.: The effect of low-temperature
7 on nutrient replete, UV treated and nutrient stressed cultures. **Bioresource Technology**, vol.
8 273, p. 404–415, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.028>.
9

10 SIMS, Ralph E.H.; MABEE, Warren; SADDLER, Jack N.; TAYLOR, Michael. An overview
11 of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, vol. 101, no. 6, p. 1570–
12 1580, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>.
13

14 SIVAKUMAR, Ganapathy; XU, Jianfeng; THOMPSON, Robert W.; YANG, Ying;
15 RANDOL-SMITH, Paula; WEATHERS, Pamela J. Integrated green algal technology for
16 bioremediation and biofuel. **Bioresource Technology**, vol. 107, p. 1–9, Mar. 2012.
17 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.091>.
18

19 STIRBET, Alexandrina; LAZÁR, Dušan; GUO, Ya; GOVINDJEE, Govindjee.
20 Photosynthesis: basics, history and modelling. **Annals of Botany**, vol. 126, no. 4, p. 511–537,
21 14 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz171>.
22

23 SUTTANGKAKUL, Anongpat; SIRIKHACHORNKIT, Anchalee; JUNTAWONG, Piyada;
24 PUANGTAME, Wilasinee; CHOMTONG, Thitikorn; SRIFA, Suchada; SATHITNAITHAM,
25 Sukhita; DUMRONGTHAWATCHAI, Wasawat; JARIYACHAWALID, Kanidtha;
26 VUTTIPONGCHAIKIJ, Supachai. Evaluation of strategies for improving the transgene
27 expression in an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus*. **BMC Biotechnology**, vol. 19, no.
28 1, p. 4, 10 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0497-z>.
29

30 VASSILEV, Stanislav V.; VASSILEVA, Christina G. Composition, properties and challenges
31 of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel**, vol. 181, p. 1–33, Oct. 2016.
32 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.106>.
33

1 WIJFFELS, René H.; BARBOSA, Maria J. An Outlook on Microalgal Biofuels. **Science**, vol.
2 329, no. 5993, p. 796–799, 13 Aug. 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>.

3

4 XIN, Li; HONG-YING, Hu; KE, Gan; JIA, Yang. Growth and nutrient removal properties of a
5 freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources.
6 **Ecological Engineering**, vol. 36, no. 4, p. 379–381, Apr. 2010.
7 <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.003>.

8

9 XIN, Li; HONG-YING, Hu; YU-PING, Zhang. Growth and lipid accumulation properties of a
10 freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource**
11 **Technology**, vol. 102, no. 3, p. 3098–3102, Feb. 2011.
12 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>.

13

14

15

CAPÍTULO 1

Produção de mutantes amido-deficientes com maior conteúdo lipídico e proteico através de exposição à irradiação ultravioleta (UV) em *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg

* Este capítulo está formatado de acordo com as normas do periódico Bioresource Technology.

1 **Resumo**

2 A utilização de microalgas para a produção de biodiesel é promissora, mas o teor de
3 lipídeos neutros em algumas cepas não é suficiente para alcançar viabilidade econômica.
4 Consequentemente, identificar cepas com conteúdo lipídico aprimorado é crucial para avançar
5 na produção de biodiesel baseado em microalgas. A microalga *Desmodesmus* sp.
6 PETROBRAS/FURG, uma candidata potencial para a produção de biocombustíveis, possui
7 características distintas como tolerância a altas temperaturas, produção de compostos
8 alelopáticos e utilização de resíduos. Embora as microalgas do gênero *Desmodesmus* são
9 consideradas oleaginosas, o conteúdo lipídico neutro da cepa *Desmodesmus* sp.
10 Petrobras/FURG ainda não é suficiente para gerar biodiesel economicamente viável. Este
11 estudo teve como objetivo aumentar a produtividade de lipídeos em *Desmodesmus* sp.
12 PETROBRAS /FURG através de mutagênese induzida por UV-C. Mutantes com baixa
13 produção de amido foram gerados e avaliados quanto ao seu potencial de produção de lipídeos.
14 Os mutantes apresentaram dinâmicas de crescimento comparáveis ao tipo selvagem, com os
15 mutantes tM-10 e tN-30 exibindo aumentos significativos na acumulação de lipídeos neutros e
16 também, um aumento dos níveis de proteínas totais do mutante tN-30. Paralelamente, uma
17 análise filogenética refinou a classificação taxonômica de *Desmodesmus* sp.
18 PETROBRAS/FURG, indicando uma possível espécie ainda não descrita. O estudo enfatiza a
19 eficiência da mutagênese induzida por UV na geração de cepas de microalgas ricas em lipídeos.
20 Os atributos únicos dos mutantes, juntamente com sua produtividade de lipídeos aprimorada,
21 oferecem promessas para a indústria de biocombustíveis. Além disso, as informações obtidas
22 com esta pesquisa contribuem para a compreensão das vias metabólicas de microalgas e
23 destacam o potencial de *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG como uma fonte sustentável para a
24 produção de lipídeos conversíveis a biodiesel. A exploração contínua deste caminho,
25 juntamente com futuros esforços de sequenciamento genômico, podem dar passo a um setor de
26 biocombustíveis mais amigável ao meio ambiente e economicamente viável.

27

28 **Palavras-chave:** Microalga; filogenia molecular; mutagênese randômica; Triacilglicerol
29 (TAG); produtividade lipídica.

30

1 **Abstract**

2 The use of microalgae to produce biodiesel is promising, but the content of neutral lipids
3 in some strains is not sufficient to achieve economic viability. Consequently, identifying strains
4 with enhanced lipid content is crucial for advancing the production of microalgae-based
5 biodiesel. The microalga *Desmodesmus* sp. Petrbras/FURG, a potential candidate for biofuel
6 production, has distinct characteristics such as high-temperature tolerance, allelopathic
7 compound production, and waste utilization. Although microalgae of the genus *Desmodesmus*
8 are considered oleaginous, the neutral lipid content of the *Desmodesmus* sp.
9 PETROBRAS/FURG is still not enough to generate economically viable biodiesel. This study
10 aimed to increase lipid productivity in *Desmodesmus* sp. PETROBRAS/FURG through UV-C-
11 induced mutagenesis. Mutants with low starch production were generated and evaluated for
12 their lipid production potential. The mutants exhibited growth dynamics comparable to the wild
13 type, with mutants tM-10 and tN-30 showing significant increases in neutral lipid accumulation
14 and also an increase in the total protein levels of the tN-30 mutant. Concurrently, a phylogenetic
15 analysis refined the taxonomic classification of *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG, indicating
16 a possible species not yet described. The study emphasizes the efficiency of UV-induced
17 mutagenesis in generating lipid-rich microalgae strains. The unique attributes of the mutants,
18 together with their enhanced lipid productivity, hold promise for the biofuel industry.
19 Additionally, the information obtained from this research contributes to the understanding of
20 microalgal metabolic pathways and highlights the potential of *Desmodesmus* sp.
21 PETROBRAS/FURG as a sustainable source to produce biodiesel-convertible lipids. The
22 continued exploration of this path, along with future genomic sequencing efforts, may pave the
23 way for an environmentally friendly and economically viable biofuel sector.

24

25 **Keywords:** Microalgae; molecular phylogeny; random mutagenesis; Triacylglycerol; lipid
26 productivity

27

28

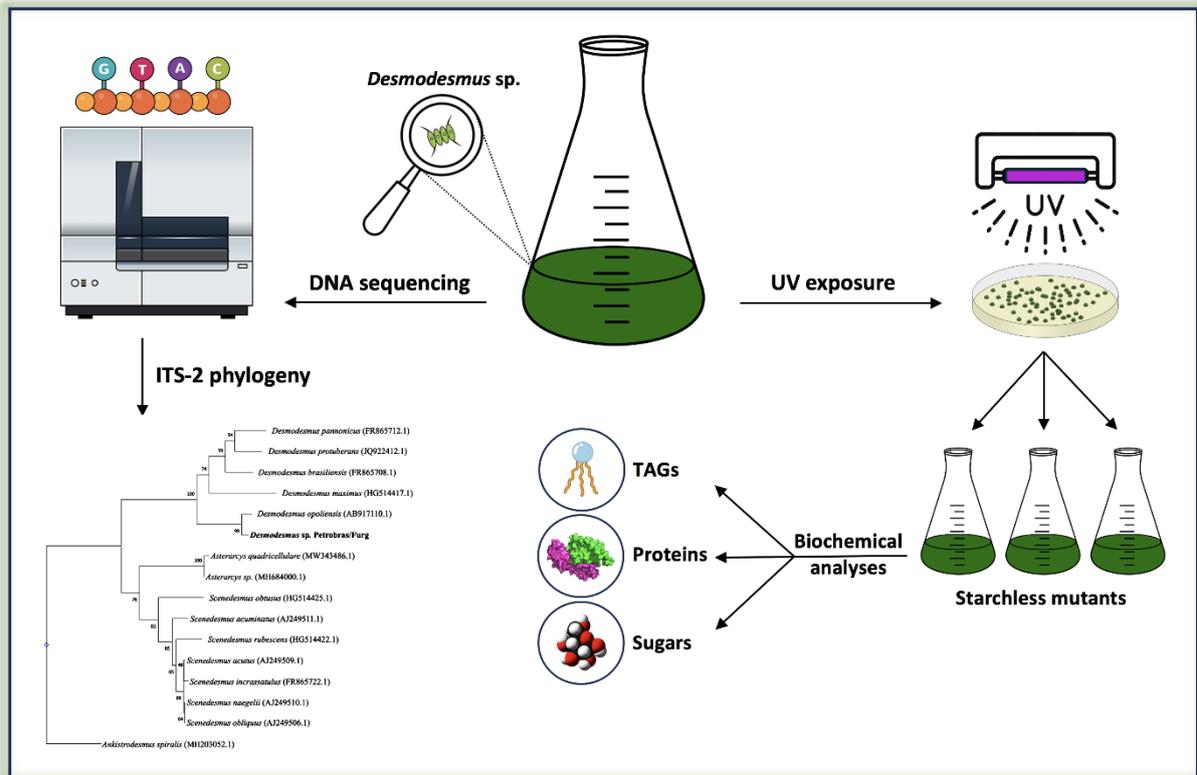
29

30

31

1 Graphical abstract

2



3

4

1. Introdução

O crescimento da economia mundial depende inteiramente do uso de energia, e os combustíveis fósseis são a principal fonte de energia utilizada globalmente. Óleos, gás natural e carvão representam mais de 80% da matriz energética mundial, cujo uso libera altas concentrações de CO₂ na atmosfera, juntamente com outros gases de efeito estufa (GEEs). Esses gases contribuem para intensificar o aquecimento global, causando mudanças climáticas em todo o mundo. Impulsionada pela maior demanda de energia em 2023, as emissões globais de CO₂ aumentaram em 410 milhões de toneladas, um 1,1% a mais do que o ano anterior, atingindo uma alta histórica de 37,4 bilhões de toneladas (IEA, 2024). Segundo os dados da Agência Internacional de Energia (IEA), o crescimento das energias limpas foi o dobro das energias fósseis (IEA, 2024). Nos últimos cinco anos o uso de tecnologias de energias alternativas tem desacelerado notavelmente o acréscimo da demanda de energias fósseis (IEA, 2024). Além disso, por ser uma fonte de energia não renovável, as reservas de combustíveis fósseis são limitadas, sugerindo uma crise energética global em um futuro próximo. Embora várias fontes de energia alternativas tenham sido estudadas, os biocombustíveis são considerados uma das mais promissoras para substituir o uso de petróleo devido à sua viabilidade econômica e capacidade de produção em larga escala (Basile e Dalena, 2019).

Nos últimos anos, os biocombustíveis ganharam destaque na matriz energética (aproximadamente 10%) porque utilizam matérias-primas de origem vegetal para sua produção. No entanto, o cultivo dessas matrizes (por exemplo, cana-de-açúcar, milho, girassol) utilizam plantas alimentares ou terras aráveis e água doce que poderiam ser usadas para a produção de alimentos (Naik et al., 2010; Sims et al., 2010). Como alternativa, os biocombustíveis de 3ª geração (3G) são obtidos a partir do cultivo de biomassa de microalgas que possuem alta produtividade de lipídeos, os quais, após extração, são transesterificados para obter biodiesel (Wijffels e Barbosa, 2010).

Com eficiência fotossintética superior às plantas terrestres, a aplicação de microalgas para produção de biocombustíveis também pode estar associada à mitigação do CO₂ gerado por instalações industriais, contribuindo ainda mais para a sustentabilidade da produção (Huang e Tan, 2014). Além disso, esses microrganismos apresentam altas taxas de crescimento, diversidade ecológica e metabólica, o que permite selecionar espécies adaptadas a cada região, possibilitando o cultivo em água salgada, resíduos municipais e agroindustriais e terras inadequadas para agricultura. Além disso, eles necessitam de nutrientes mínimos, o que contribui para reduzir os custos de produção, e podem ser cultivados em diferentes sistemas

1 (por exemplo, lagoas, fotobiorreatores), permitindo a produção próxima ao local de uso,
2 reduzindo os custos de transporte (Chen et al., 2011; Pittman et al., 2011).

3 Embora existam inúmeras espécies de microalgas que podem ser usadas para produção
4 de biocombustíveis, aquelas conhecidas como "oleaginosas" parecem ser as mais adequadas
5 para o desenvolvimento dessa tecnologia. Entre elas, destacam-se o gênero *Desmodesmus*, cuja
6 classificação taxonômica foi assegurada por meio de análises de sequências de genes
7 ribossomais, como o Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2), conforme relatado por An et al.
8 (1999) e Van Hannen et al. (2002). As espécies de *Desmodesmus* são cosmopolitas e
9 apresentam características interessantes, como alta taxa de crescimento, resistência e
10 adaptabilidade a diferentes condições ambientais (Hegewald e Braband, 2017), além de alta
11 produção de lipídeos e capacidade de bioremediação de ambientes eutróficos (Rai et al., 2022;
12 Samorì et al., 2013). Recentemente, pesquisadores do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento
13 Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/PETROBRAS, Brasil) isolaram uma cepa
14 preliminarmente classificada como pertencente a *Desmodesmus* com capacidade de
15 crescimento em altas temperaturas (acima de 40 °C) e alta resistência à contaminação biológica
16 pela produção de compostos alelopáticos (infoquímicos). Também, esta cepa (aqui denominada
17 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg) demonstrou alto desempenho quanto à coleta de biomassa
18 usando processos de baixa energia (floculação e sedimentação) e excelente desempenho para o
19 uso de resíduos sólidos da indústria de petróleo e gás, e pode ser cultivada com a adição de CO₂
20 e cascalho de rocha de perfuração em um ambiente marítimo (Patente NI 21/123; dados não
21 publicados).

22 Embora microalgas oleaginosas como a cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg
23 apresentem características interessantes para serem consideradas como plataforma para a
24 produção de biodiesel, ainda existem diversos obstáculos para a viabilidade econômica dessa
25 tecnologia. Entre esses desafios estão o desenvolvimento de metodologias para a coleta ou
26 concentração de culturas, a busca por solventes mais adequados para extração de lipídeos ou
27 ruptura celular, bem como alcançar uma produção elevada e consistente de lipídeos neutros
28 (Alam e Wang, 2019). Existem várias metodologias de engenharia genética para aumentar o
29 teor de lipídeos em microalgas, incluindo recombinação homóloga, TALENs ou CRISPR/Cas
30 (Hao et al., 2018; Kilian et al., 2011; Lin e Ng, 2020). No entanto, essas ferramentas exigem
31 conhecimento genético específico das cepas a serem manipuladas, limitando suas aplicabilidade
32 para espécies sem informações genéticas básicas (Woolston et al., 2013). Para microalgas desse
33 tipo, a exposição a agentes mutagênicos físicos ou químicos, sendo o tratamento com radiação
34 UV um dos métodos mais comuns, é a abordagem mais frequentemente utilizada para induzir

1 e obter mutantes (Bleisch et al., 2022). Embora esses tratamentos resultem em mutações
2 distribuídas aleatoriamente, a obtenção de mutantes com maior produção de lipídeos
3 geralmente depende de mutações deletérias em genes relacionados a vias anabólicas que não
4 sejam a síntese de lipídeos. De fato, bloquear a síntese de amido pela exclusão de genes
5 associados a essa via anabólica pode redirecionar o fluxo de carbono fixo para a síntese de
6 triacilgliceróis (TAGs), como demonstrado em organismos como *Chlamydomonas reinhardtii*
7 (Li et al., 2010b) e *Scenedesmus obliquus* (de Jaeger et al., 2014).

8 O principal objetivo deste estudo foi confirmar o status taxonômico da cepa
9 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg usando a sequência de nucleotídeos do ITS-2 em uma
10 filogenia molecular. Além disso, mutantes aleatórios foram gerados por exposição à radiação
11 UV, com seleção baseada em baixa produção de amido. Posteriormente, os mutantes amido-
12 deficientes obtidos foram avaliados quanto à capacidade de produzir TAGs, proteínas e
13 carboidratos.

14

15 **2. Materiais e métodos**

16

17 **2.1. Cultivo e filogenia molecular de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg**

18 A microalga foi cultivada em condições mixotróficas em Erlenmeyers de 125 mL
19 contendo 50 mL de meio Tris-Acetato-Fosfato (Gorman e Levine, 1965), com adição de ácido
20 acético glacial como fonte de carbono orgânico, salinidade de 10 g/L, pH = 8,0, a 30 °C, com
21 agitação a 100 rpm, 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidade de luz e um fotoperíodo de 16:8 horas
22 luz/escuro.

23 Para extração de DNA genômico foram utilizados aproximadamente 150-200 mg de
24 biomassa fresca de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg em fase exponencial de crescimento,
25 utilizando o kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). O procedimento foi realizado seguindo o
26 protocolo do fabricante, analisado em eletroforese em gel de agarose a 1%, e quantificado por
27 fluorometria (Qubit, Invitrogen). O sequenciamento de próxima geração (NGS), utilizando a
28 plataforma Illumina, foi conduzido pela empresa GenOne (<https://geneone.com.br/>). Os dados
29 de sequenciamento NGS (não publicados) foram inicialmente avaliados quanto a estatísticas de
30 mapeamento, profundidade e cobertura em relação ao genoma de referência. O genoma de
31 *Desmodesmus armatus* (assembly ASM744998v2), disponível no National Center for
32 Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foi utilizado como
33 referência. Para a taxonomia molecular, foi utilizada a sequência nuclear incluindo os ITSs
34 (Internal Transcribed Spacers) 1 e 2, as quais flanqueiam a sequência ribossomal 5.8S. A

1 sequência ITS1/5.8S/ITS2 de *Acutodesmus obliquus* (AB917127) foi utilizada como gene de
2 referência para o mapeamento contra o pacote de dados obtidos a partir do sequenciamento
3 NGS, utilizando a versão trial do software Geneious Prime (<https://www.geneious.com>). As
4 sequências de consenso obtidas para *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg foram submetidas à
5 ferramenta BLAST do NCBI para obtenção do índice de identidade com sequências disponíveis
6 de ITS1/5.8S/ITS2. Para análise filogenética de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg, apenas a
7 sequência de nucleotídeos do Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) foi utilizada, a qual separa
8 os genes ribossômicos 5.8S e 28S. A sequência de ITS-2 aqui obtida foi submetida ao NCBI e
9 recebeu o número de acesso OR600244.1.

10 Para a construção de uma árvore filogenética, as sequências de nucleotídeos do ITS-2
11 de microalgas relacionadas ao ITS-2 de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg foram obtidas usando
12 a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar sequências com
13 identidade próxima. O resultado dessa abordagem preliminar sugeriu as seguintes sequências:
14 *Desmodesmus opoliensis* (AB917110.1), *Desmodesmus protuberans* (JQ922412.1),
15 *Desmodesmus pannonicus* (FR865712.1), *Desmodesmus maximus* (HG514417.1),
16 *Desmodesmus brasiliensis* (FR865708.1), *Scenedesmus rubescens* (HG514422.1),
17 *Scenedesmus obtusus* (HG514425.1), *Scenedesmus obliquus* (AJ249506.1), *Scenedesmus*
18 *naegelii* (AJ249510.1), *Scenedesmus incrassatulus* (FR865722.1), *Scenedesmus acutus*
19 (AJ249509.1), *Scenedesmus acuminatus* (AJ249511.1), *Asterarcys* sp. (MH684000.1) e
20 *Asterarcys quadricellulare* (MW343486.1). *Ankistrodesmus spiralis* (MH203052.1) foi
21 utilizado como um grupo externo para a raiz da árvore filogenética. A árvore filogenética foi
22 construída utilizando o método de Neighbor-joining, com o modelo de substituição de Poisson
23 e usando 10.000 bootstraps no software MEGA 11 (Tamura et al., 2021).

24

25 **2.2. Geração e seleção de mutantes**

26 Mutantes foram obtidos da cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg por meio de
27 irradiação com luz UV. Um total de 2×10^5 células em fase de crescimento exponencial
28 (Cultivadas conforme a seção 2.1) foram semeadas em meio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) com
29 adição de 15 g/L de ágar e secas ao ar por 30 min antes da irradiação. As placas com a cepa
30 foram irradiadas com uma dose de 25.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de luz UV monocromática com comprimento
31 de onda de 254 nm em uma câmara de fluxo vertical (Purificador Classe II de Segurança
32 Biológica, LABCONCO). Como controle negativo, foram utilizadas 3 placas com cultivo que
33 replicaram todo o processo exceto a irradiação com luz UV. Subsequentemente, as placas foram
34 incubadas a 30 °C na completa escuridão por 24 h e depois incubadas com luz (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

1 e um fotoperíodo de 12:12 até o aparecimento de colônias (aproximadamente 2 semanas). A
2 dose e o tempo de exposição à luz UV foram determinados com base na irradiância e na fórmula
3 (Diffey, 2002): $T(\text{tempo}) = (1000 * \text{Dose}) / (60 \text{ min} * \text{Irradiância})$.

4 Para a seleção de mutantes com interferência na síntese de amido, foi utilizado o teste
5 de coloração I₂ (Work et al., 2010). As colônias de microalgas obtidas foram transferidas e
6 cultivadas para meio sólido TAP (ágar 15 g/L) sem adição de nitrogênio (N-TAP) por 5 dias a
7 30 °C, 50 μmol/m²/s, e fotoperíodo constante. Após esse período de incubação, as colônias
8 foram expostas ao vapor de iodo proveniente da sublimação de um comprimido sólido de I₂
9 colocado dentro da placa de cultura. Colônias que mostraram redução ou ausência de coloração
10 foram consideradas como potenciais mutantes sem amido com potencial para aumento do
11 conteúdo lipídico. Esses mutantes foram selecionados para análises futuras e também foram
12 submetidos a um segundo teste de validação de estabilidade fenotípica usando a coloração I₂.

13

14 **2.3. Crescimento e biomassa**

15 Para as curvas de crescimento, *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg (cepa controle) e seus
16 mutantes foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio TAP,
17 salinidade de 10 g/L e pH = 8,0, com agitação a 100 rpm, 2.400 Lux, um fotoperíodo de 16 h
18 de luz e 8 h de escuridão, e com uma densidade celular inicial de aproximadamente 5 x
19 10⁵ células/mL. Cada cepa foi cultivada em triplicata por nove dias, e amostras diárias foram
20 retiradas e fixadas com Lugol para contagem celular usando uma câmara de Neubauer com 1
21 mL de cultura, sob um microscópio óptico (Walsby, 1995).

22 A taxa de crescimento foi calculada usando a contagem de células correspondente da
23 fase de crescimento logarítmico da curva de crescimento, seguindo a fórmula: $\mu = \ln(N_2/N_1) /$
24 $(t_2 - t_1)$, onde N₂ e N₁ são números de células e t₂ e t₁ são os tempos correspondentes (WEHR,
25 2007).

26 A concentração de biomassa foi determinada por análise de peso seco; 10 mL de cultura
27 foram filtrados e concentrados em um filtro GF50/A pré-secado e pesado. Subsequentemente,
28 os filtros foram lavados com uma solução de formiato de amônio 50 mM para remover o
29 excesso de sal (Zhu e Lee, 1997), e depois secos a 60 °C por 24 h. A biomassa foi determinada
30 pela diferença de peso entre os filtros secos antes e após a filtração (Moheimani et al., 2013).

31

32 **2.4. Determinação do conteúdo de lipídeos neutros**

33 Para avaliar a concentração de lipídeos neutros em microalgas, foi utilizada a coloração
34 com Nile red (Chen et al., 2009). Volumes de 5 mL de culturas de *Desmodesmus* sp.

1 Petrobras/Furg e seus mutantes foram centrifugados a 8.000 g a temperatura ambiente por 10
2 minutos e lavados com água ultrapura três vezes. Posteriormente, as células coletadas foram
3 ressuspensas em 5 mL de água ultrapura, e 15 µL de solução de Nile red (0,5 mg/mL em
4 acetona) foram adicionados e levemente agitados por 1 min. Após 15 min de incubação no
5 escuro, 200 µL foram adicionados a uma placa preta de 96 poços, e a fluorescência foi medida
6 usando um fluorímetro (BioTek, leitor de microplacas SYNERGY H1) com comprimentos de
7 onda de excitação e emissão de 530 nm e 568 nm, respectivamente. O experimento foi realizado
8 em triplicata, e os dados foram normalizados por volume (mL) e pelo número de células nas
9 culturas.

10

11 **2.5. Determinação de carboidratos, lipídeos e proteínas totais**

12 A determinação de carboidratos e proteínas foi realizada com 10 mg de biomassa
13 liofilizada de cada amostra, que foram hidratadas com 10 mL de água destilada e submetidas à
14 ruptura celular por sonicação (QSonica, modelo Q55, EUA) com um programa de 10 ciclos de
15 1 min (ligado/desligado). Os carboidratos totais foram quantificados usando o método fenol-
16 ácido com uma curva padrão de glicose (DuBois et al., 1956). O método colorimétrico de Lowry
17 foi utilizado para a determinação de proteínas totais, com pré-solubilização com hidróxido de
18 sódio (NaOH) e utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (LOWRY et al., 1951).
19 Para extração de lipídeos, 10 mg de biomassa liofilizada foram tratados com solventes
20 orgânicos metanol-clorofórmio em uma proporção de 2:1, respectivamente (Marsh and
21 Weinstein, 1966). Posteriormente, para a medição do teor total de lipídeos, foi utilizada uma
22 curva padrão de tripalmitina (Holland and Gabbott, 1971). A produtividade de lipídeos (P) foi
23 calculada usando a seguinte equação (Cordeiro et al., 2021): $P = (X_f * \% \text{ lipid} / t) * 10$, onde X_f
24 é a concentração final de biomassa (g/L), e t é o tempo de cultura em dias.

25

26 **2.6. Análises estatísticas**

27 Para verificar se existiam diferenças estatísticas, os dados foram analisados utilizando o
28 teste estatístico ANOVA de uma via ($p < 0,05$), seguido pelo teste de comparação de Tukey.
29 Normalidade e homogeneidade foram verificadas usando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de
30 Levene, respectivamente.

31

32 **3. Resultados e discussão**

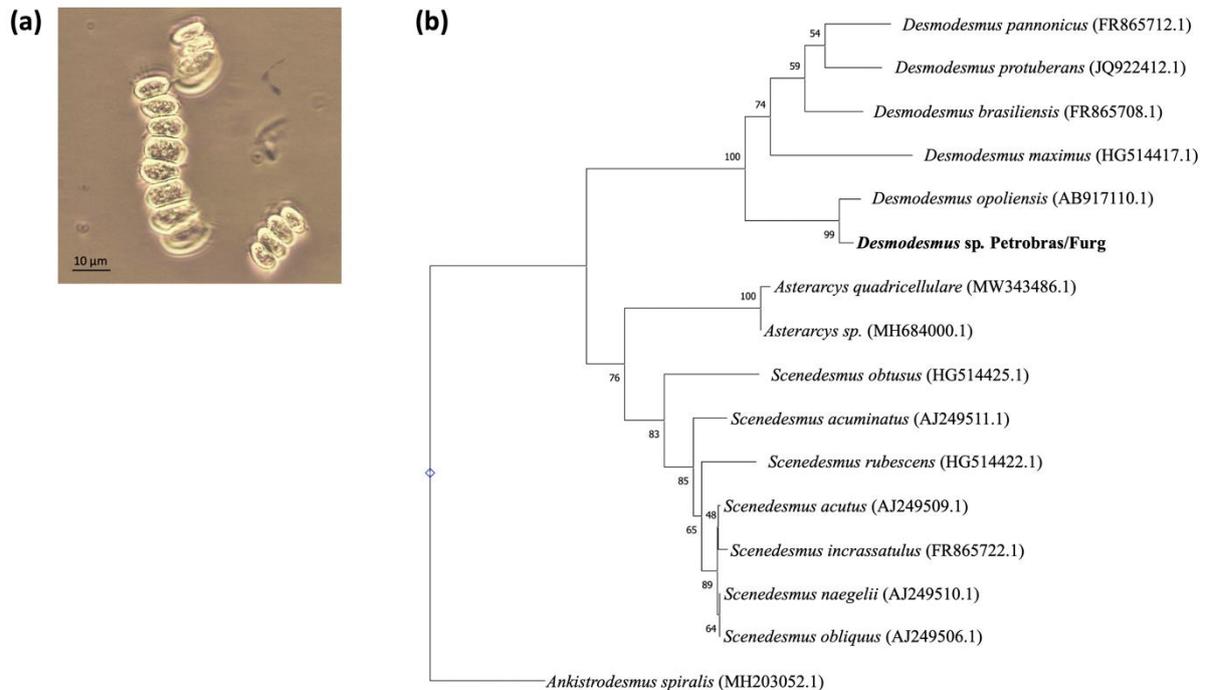
33 Embora as cepas de *Desmodesmus* sejam consideradas microalgas oleaginosas, o teor
34 de lipídeos neutros encontrado ainda não é o suficiente para gerar biodiesel economicamente

1 viável. Portanto, é necessário a identificação de novas cepas com capacidades distintas é de
2 interesse para viabilizar a produção de biodiesel à base de microalgas. Estudos não publicados
3 com a cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg demonstraram sua capacidade de crescimento em
4 altas temperaturas (acima de 40 °C) e alta resistência à contaminação biológica pela produção
5 de compostos alelopáticos (infoquímicos). Esta cepa também apresentou alto desempenho em
6 relação à coleta de biomassa usando processos de baixa energia (floculação e sedimentação), e
7 excelente desempenho na utilização de resíduos sólidos da indústria de petróleo e gás, podendo
8 ser cultivada com a adição de CO₂ e cascalho de perfuração em um ambiente offshore (Patente
9 NI 21/123; dados não publicados). Considerando as características únicas desta cepa, o
10 desenvolvimento de mutantes com aumento na produção de lipídeos convertíveis em biodiesel
11 é uma via interessante a ser explorada.

12 *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG foi inicialmente identificada como membro do
13 gênero *Desmodesmus* com base em seus traços morfológicos observáveis usando um
14 microscópio óptico. A forma padrão de *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG é elíptica ou
15 ocasionalmente esférica, com um espinho curto em cada ápice. Ela pode ser encontrada tanto
16 na forma unicelular quanto em cenóbios lineares de 2, 4 e, raramente, 8 células, que são
17 características do gênero *Desmodesmus*. (An et al., 1999; Hegewald, 2000) (Figura 1a). Ela
18 tem um tamanho de aproximadamente 5-12 micrômetros e o morfotipo elíptico e as formações
19 de cenóbios lineares predominam no crescimento em meio autotrófico e, sobretudo, durante a
20 fase de crescimento exponencial, enquanto o morfotipo unicelular e arredondado predomina na
21 fase estacionária e em meios de cultivos mixotróficos, onde as microalgas alcançam seu
22 tamanho máximo e adquirem uma forma esférica devido ao acúmulo de substâncias de reserva.
23 No entanto, para estabelecer uma classificação taxonômica mais abrangente, foi conduzida uma
24 análise filogenética utilizando a sequência de nucleotídeos (228 pb) da região ITS-2, obtida por
25 sequenciamento de próxima geração (NGS). A análise filogenética resultante é mostrada na
26 Figura 1b, revelando claramente que ITS-2 serve como uma ferramenta taxonômica
27 significativa para distinguir entre as espécies de *Scenedesmus* e *Desmodesmus*, como
28 previamente documentado por An et al. (1999). Além disso, é evidente que as espécies de
29 *Asterarcys* são geneticamente mais semelhantes a *Scenedesmus* do que *Desmodesmus*. Os
30 resultados também indicaram uma proximidade filogenética íntima entre *Desmodesmus* sp.
31 Petrobras/FURG e *Desmodesmus opoliensis* (AB917110.1), embora não a ponto de estabelecer
32 definitivamente sua caracterização em nível de espécie. A cepa focada no presente estudo ainda
33 pode ser considerada uma espécie não descrita. De qualquer forma, essa relação próxima com
34 *D. opoliensis* também pode indicar que ambas as espécies podem compartilhar características

1 fenotípicas interessantes. *D. opoliensis* foi documentada como uma das espécies mais
2 prevalentes em sistemas de tratamento de água municipal que fazem uso de “high-rate algal
3 ponds” (HRAPs; Sutherland et al., 2018).

4
5



6
7

8 **Figura 1.** a) Imagem de microscopia óptica de *Desmodesmus sp. Petrobras/Furg* (ampliação
9 1.000X). b) Árvore filogenética inferida a partir de sequências de nucleotídeos do Internal
10 Transcribed Spacer 2. A árvore foi reconstruída utilizando o método de Neighbor-joining, com
11 o modelo de substituição de Poisson e utilizando 10.000 bootstraps, cujos valores (%) são
12 mostrados em cada nó. *Ankistrodesmus spiralis* foi usado como um grupo externo para enraizar
13 a árvore.

14

15 A estratégia de irradiar as células com a UV durante a fase log de crescimento tem o
16 fundamento de que a expressão dos genes da síntese de amido é maior, sendo encontrados
17 desenrolados das histonas para que enzimas responsáveis da transcrição tenha acesso aos genes
18 e possam ser transcritos (Sirikhachornkit et al., 2018). Nesse momento os genes estão mais
19 expostos à radiação UV, aumentando a probabilidade de serem atingidos pela radiação UV e
20 possam sofrer mutações. Após duas semanas da exposição à radiação UV na fase exponencial,
21 um total de 1957 colônias de *Desmodesmus sp. Petrobras/Furg* sobreviveram ao tratamento.
22 Deste total, apenas quatro colônias não mostraram coloração ou reação ao vapor de iodo

1 semelhante aos controles selvagens quando cultivadas em meio pobre em nitrogênio (Figura 2).
2 Estas cepas foram então identificadas como tM-10, tN-30, tO-06 e tO-11. Na ausência de
3 nitrogênio, microalgas direcionam o uso de carbono orgânico para a síntese de macromoléculas
4 de armazenamento como amido e TAGs. Portanto, este tipo de metodologia é amplamente
5 utilizado na seleção de organismos com baixa ou nenhuma síntese de amido (de Jaeger et al.,
6 2014; Sirikhachornkit et al., 2016; Work et al., 2010).

7



8

9 **Figura 2.** Identificação de mutantes amido-deficientes mediante exposição ao vapor de iodo
10 das colônias obtidas por irradiação UV na cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg. Colônias que
11 não apresentaram coloração roxa ou coloração reduzida foram classificadas como possíveis
12 mutantes amido-deficientes.

13

14 Para determinar a estabilidade fenotípica das cepas obtidas, uma segunda exposição ao
15 vapor de iodo foi realizada após dez ciclos de cultivo em meio líquido, que mais uma vez
16 confirmou o fenótipo para os mutantes tM-10 (que não mostrou coloração) e tN-30 (Figura 3).
17 O mutante tN-30, embora tenha reagido ao vapor de iodo, exibiu uma coloração diferente em
18 comparação com a cepa selvagem, apresentando uma cor marrom-avermelhada diferente da cor
19 roxa escura tipicamente mostrada pelo amido exposto ao vapor de iodo. É provável que a
20 irradiação com luz UV tenha afetado parcialmente a capacidade de síntese de amido para este
21 mutante ou que ele tenha uma estrutura de amido diferente do normal. Por outro lado, os
22 mutantes tO-06 e tO-11 mostraram coloração semelhante à do tipo selvagem, indicando uma
23 reversão fenotípica da mutação que inicialmente causou a deficiência de amido.

24

25



1
2 **Figura 3.** Confirmação da estabilidade de mutantes-amido deficientes utilizando o teste de
3 coloração com vapor de iodo. Tipo selvagem (Wt) e mutantes tM-10, tN-30, tO-06 e tO-11.

4
5 A carência de nitrogênio reduz drasticamente a divisão e o crescimento das células,
6 induzindo a formação de polímeros de estocagem, incluindo carboidratos como amido, e
7 lipídeos neutros (TAGs) (Akgül, 2019; Dixit et al., 2019). O nitrogênio é um elemento essencial
8 na formação de várias biomoléculas vitais para o correto funcionamento das células; ele é
9 responsável por formar parte do grupo amino dos aminoácidos e das bases nitrogenadas dos
10 ácidos nucleicos (DNA e RNA). Com a supressão desse elemento, as células de microalgas não
11 podem replicar o seu material genético, nem fornecer toda a maquinaria proteica necessária
12 para gerar duas células completamente funcionais na divisão celular. Nesta situação, e
13 mantendo os níveis dos outros elementos junto com as condições ideais de cultivo, o carbono
14 fixado através da fotossíntese e obtido do meio de cultivo TAP (acetato como fonte de carbono
15 orgânico), é redirecionado para a formação de compostos de estoque, como o amido e os
16 lipídeos neutros.

17 Tratamentos com luz UV em microalgas do gênero *Desmodesmus* já tem sido relatados.
18 Sijil e colaboradores expuseram cultivos de *Desmodesmus* a luz UV com a finalidade de
19 aumentar a produção de lipídeos, obtendo um aumento de 1.6 vezes no conteúdo de lipídeos
20 após um tratamento de 60 minutos com luz UV (Sijil et al., 2018). Embora esse tratamento
21 tenha sido efetivo, essa metodologia não incluiu um processo de seleção nem de isolamento de
22 cepas. Esses autores apenas analisaram o conjunto de todas as células do cultivo sem diferenciar
23 entre as possíveis mutações existentes que cada uma delas poderiam ter adquirido após a

1 exposição a UV. Diferentemente, no presente trabalho nós isolamos cepas mutantes amido-
 2 deficientes de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg provenientes de uma única célula ou unidade
 3 formadora de colônia (UFC), sendo esta a primeira vez que se obtém mutantes amido-
 4 deficientes fenotipicamente estáveis do gênero *Desmodesmus*.

5 Quanto à dinâmica de crescimento, as cepas mutantes exibiram um crescimento
 6 semelhante ao da cepa selvagem. Todos os mutantes atingiram a fase estacionária no quinto dia
 7 de cultivo, assim como a cepa selvagem, com densidades celulares semelhantes em torno de 20
 8 $\times 10^6$ células/mL, exceto para mutante tM-10, que alcançou apenas 17×10^6 células/mL. No
 9 entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre nenhum dos mutantes em
 10 comparação com a cepa selvagem ao longo do experimento, exceto no quarto dia de cultivo
 11 (fase exponencial), onde o mutante tM-10 apresentou um menor crescimento do que a cepa
 12 selvagem (Figura 4). Essa diferença pode ser explicada pela completa ausência de amido no
 13 mutante tM-10 que, sem uma reserva de energia facilmente metabolizável como os
 14 carboidratos, depende principalmente da energia obtida do catabolismo lipídico, como ácidos
 15 graxos dos TAGs. Resultados semelhantes foram encontrados em mutantes de *Scenedesmus*
 16 *obliquus* e *Dunaliella tertiolecta* obtidos pela mesma metodologia de exposição à luz UV, que
 17 não produziram amido e não comprometeram a dinâmica de crescimento (de Jaeger et al., 2014;
 18 Sirikhachornkit et al., 2016). Quanto à taxa de crescimento, não foram encontradas diferenças
 19 estatísticas entre a cepa selvagem e qualquer um dos mutantes (Tabela 1). No entanto, uma
 20 diferença foi observada entre a cepa tM-10 (que apresentou o menor valor de taxa de
 21 crescimento) e os mutantes tO-06 e tO-11 (Tabela 1). O mesmo resultado foi observado para a
 22 concentração de biomassa, nenhum dos mutantes apresentou diferenças significativas com a
 23 cepa selvagem (Figura 5). Hu et al. (2013) relataram achados semelhantes para cepas de
 24 *Desmodesmus* sp. também obtidas por meio de mutação induzida, resultando em um aumento
 25 no teor de lipídeos sem comprometer os rendimentos de biomassa.

26

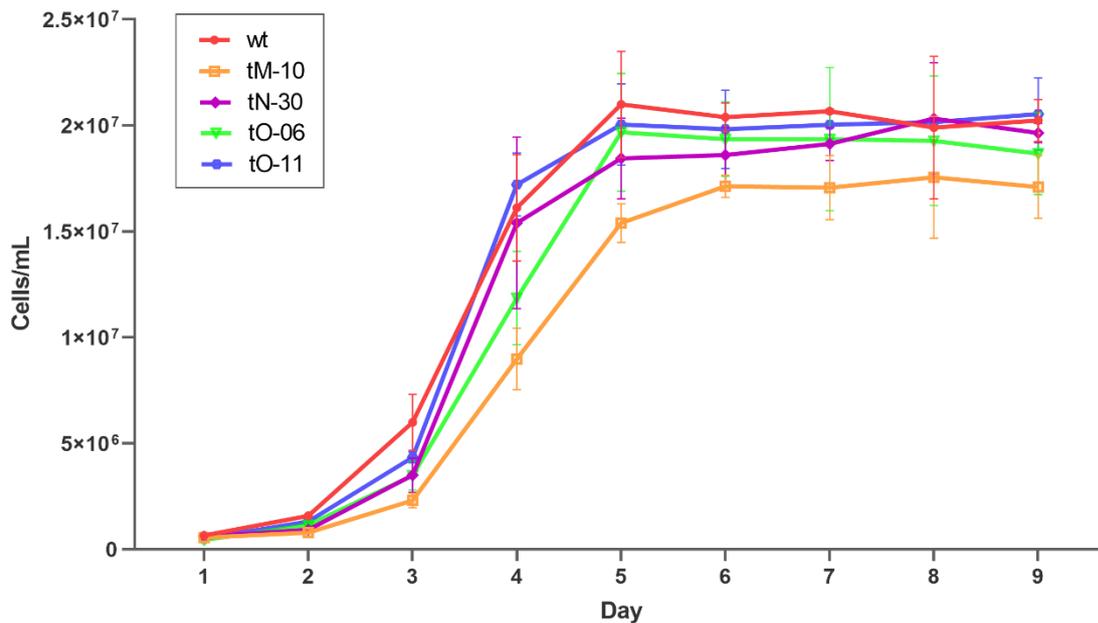
27 **Tabela 1.** Taxa de crescimento (μ^*d^{-1}) das cepas wild-type *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg e
 28 dos mutantes obtidos por irradiação UV. Letras diferentes representam diferenças
 29 estatisticamente significativas determinadas por ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

Wt	tM-10	tN-30	tO-06	tO-11
$0,87 \pm 0,01^{ab}$	$0,79 \pm 0,08^a$	$0,86 \pm 0,03^{ab}$	$0,95 \pm 0,04^b$	$0,92 \pm 0,02^b$

30

31

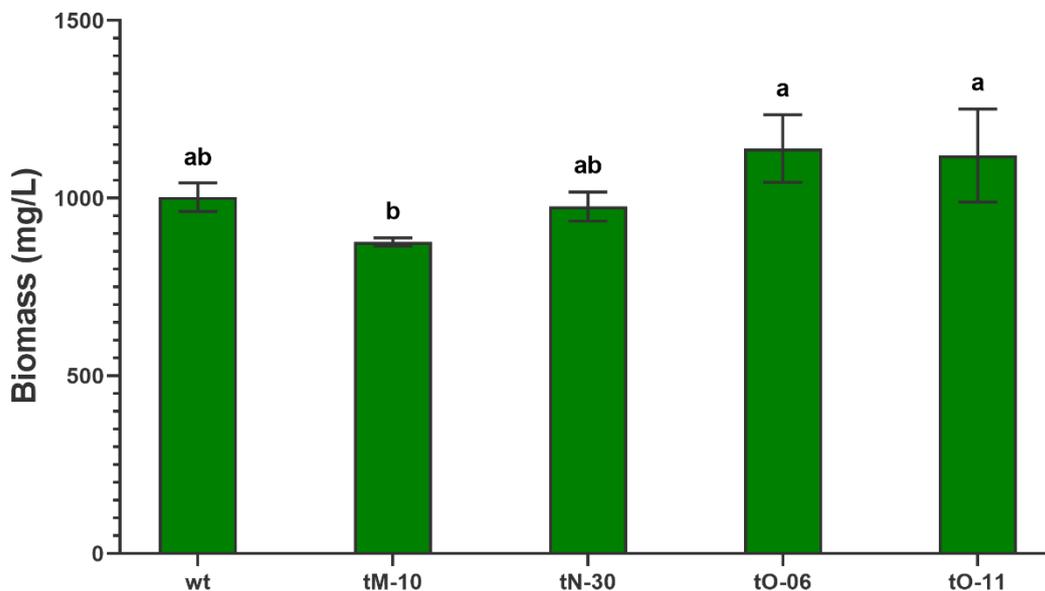
1



2

3 **Figura 4.** Curvas de crescimento da cepa wild-type *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg e dos
4 mutantes obtidos por irradiação UV. A linha vermelha representa a cepa selvagem, a linha
5 laranja representa o mutante tM-10, a linha roxa representa o mutante tN-30, a linha verde
6 representa o mutante tO-06 e a linha azul representa o mutante tO-11.

7



8

9 **Figura 5.** Concentração de biomassa da cepa wild-type *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg e dos
10 mutantes obtidos por irradiação UV. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente
11 significativas determinadas por ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

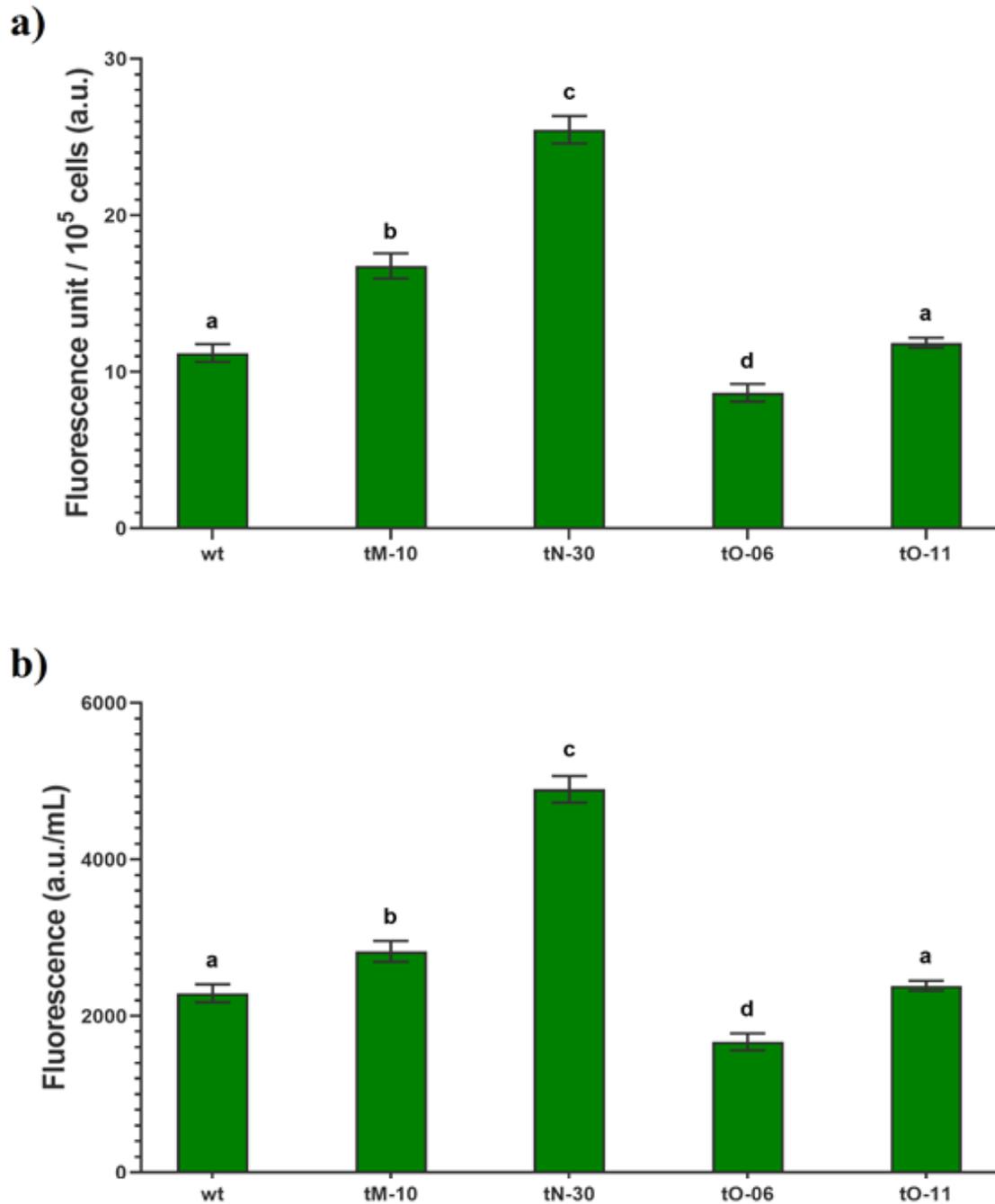
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Sabe-se que as microalgas, quando em fase estacionária de crescimento ou na ausência de crescimento celular, tendem a acumular moléculas de armazenamento como lipídeos neutros (Alonso et al., 2000). Nesse contexto, o conteúdo de lipídeos neutros da cepa selvagem e dos mutantes foi avaliado após cinco dias em fase estacionária (dia 9), utilizando o corante fluorescente Nile red para (TAGs). As cepas mutantes tM-10 e tN-30 exibiram os valores mais altos de fluorescência média por célula, sendo significativamente diferentes em 1,5 e 2,3 vezes maiores do que a cepa selvagem, respectivamente (Figura 6a). Esses resultados indicam que esses mutantes acumularam uma quantidade maior de lipídeos neutros do que a cepa selvagem. Portanto, esses dados confirmaram que a estratégia de interferir na síntese de amido redirecionou o fluxo de carbono para a síntese de lipídeos na microalga *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg. A relação entre a deficiência na biossíntese de amido e seu efeito na produção de lipídeos já é conhecida em microalgas. A interferência na transcrição do gene que codifica a ADP-glucose pirofosforilase (AGP), a enzima reguladora chave na via de biossíntese de amido, por recombinação homóloga em *Chlamydomonas reinhardtii*, levou a um aumento de aproximadamente 10 vezes na produção de TAGs em condições deficientes em nitrogênio (Li et al., 2010a; Zabawinski et al., 2001). Um resultado semelhante foi observado na microalga *Tetraselmis* sp., onde a interferência na enzima AGP usando a tecnologia CRISPR/Cas9 também resultou em um aumento de três vezes na produção de lipídeos (Chang et al., 2020). Por outro lado, os mutantes que resgataram o fenótipo de síntese de amido, tO-06 e tO-11, não apresentaram nenhum aumento significativo na produção de lipídeos neutros. O mutante tO-06, pelo contrário, teve um decaimento significativo de 23% comparado com a cepa selvagem.

Quando os resultados foram normalizados pelo volume do cultivo, os mutantes tM-10 e tN-30, mantiveram os valores significativamente superiores aos da cepa controle. O mutante tN-30 teve 2,14 vezes mais intensidade de fluorescência do que a cepa controle, mantendo ainda mais do dobro de lipídeos neutros. Já o mutante tM-10 que, mesmo tendo uma densidade celular menor, ainda apresentou 23% a mais por unidade de volume do que a cepa Wt (Fig. 6b). Inicialmente, uma alta produção de lipídeos neutros era esperada para o mutante tM-10, assumindo-se que, ao não produzir amido, todo o carbono orgânico fixado seria priorizado para a síntese de TAGs. No entanto, surpreendentemente, o mutante tN-30 apresentou o maior resultado de fluorescência do Nile red. Esse aumento substancial pode ser explicado por um gasto de energia mais eficiente pela cepa tN-30, que, ao armazenar uma certa quantidade de amido, poderia utilizar essa molécula de energia para atender às demandas metabólicas de seu crescimento. Para a mutante tM-10, é possível que suas reservas lipídicas sejam a única ou

1 principal fonte de energia para a manutenção e o crescimento celular, limitando potencialmente
2 sua capacidade de armazenar quantidades maiores dessas biomoléculas. Além disso, uma
3 quantidade maior de amido no mutante tN-30 poderia fornecer um caminho extra para a
4 conversão de amido em lipídeos na forma de TAGs (Li et al., 2011). Para o mutante tO-11 o
5 fluorescência por volume de cultivo se manteve praticamente igual a cepa controle e sem
6 diferenças significativas. Já para o mutante tO-06 as análises revelaram uma queda significativa
7 nos valores obtidos de fluorescência, indicando que a exposição à irradiação UV teve um efeito
8 negativo no metabolismo de lipídeos neutros nesta cepa. A relação inversa que apresenta o
9 mutante tO-06 entre o aumento da taxa de crescimento e diminuição dos níveis de lipídeos
10 neutros tem sido observada em outras microalgas (Hu et al., 2008).

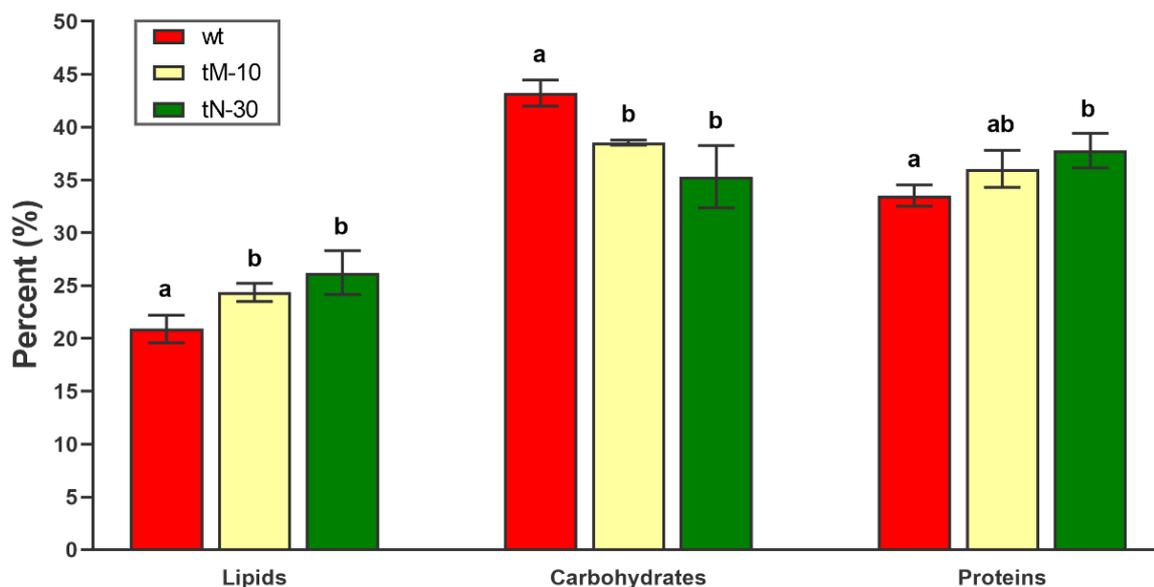
11 Os resultados das cepas tO-06 e tO-11 em relação aos níveis de lipídeos e à restauração
12 do fenótipo original de produção de amido indicam que, apesar do comprometimento inicial na
13 síntese de amido, ambas as cepas de microalgas conseguiram de alguma forma reverter os
14 efeitos das mutações induzidas por UV. Isso pode ser devido a mecanismos de reparo de danos
15 no DNA ou à plasticidade fenotípica das microalgas, aumentando potencialmente a expressão
16 de outras enzimas ou vias alternativas envolvidas na síntese de amido. A plasticidade fenotípica
17 em espécies de *Desmodesmus* já foi relatada anteriormente (Chung et al., 2018).



1
2 **Figura 6.** Intensidade de fluorescência do Nile red da cepa selvagem *Desmodesmus* sp.
3 Petrobras/Furg e os mutantes obtidos por irradiação UV. a) Intensidade de fluorescência da
4 cultura de células normalizada pelo número de células (100.000 células). b) Intensidade de
5 fluorescência da cultura de células normalizada pelo volume de cultivo. Letras diferentes
6 representam diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA de uma via
7 ($p < 0,05$).

8
9
10

1 A Figura 7 mostra os resultados das quantificações de lipídeos totais, carboidratos e
2 proteínas apenas para os mutantes tM-10 e tN-30, uma vez que estes foram os que deram os
3 melhores resultados nas análises de lipídeos neutros. Embora o objetivo principal deste estudo
4 seja aumentar a produção de lipídeos neutros convertíveis em biodiesel, os lipídeos totais
5 também têm uma importância econômica significativa, assim como as proteínas e os
6 carboidratos. A quantificação de lipídeos totais nos mutantes tM-10 e tN-30 mostrou níveis
7 significativamente mais altos em comparação com a cepa selvagem, com aumentos de 19% e
8 25%, respectivamente. Em comparação, Zhang et al. (2016) observaram um aumento de
9 lipídeos totais de cerca de 8% e 10% para as mutantes aleatórias S81 e G41 de *Desmodesmus*
10 sp., respectivamente. Assim, o aumento observado nos lipídeos totais para os mutantes testados
11 aqui parece ser bastante representativo. No caso da concentração de carboidratos totais, uma
12 redução significativa foi observada tanto nos mutantes tM-10 quanto no tN-30 em comparação
13 com a cepa selvagem, de 11% e 18%, respectivamente. Embora esta quantificação leve em
14 conta os carboidratos totais, é provável que as mutações induzidas por UV tenham de fato
15 afetado a capacidade de síntese de amido dos mutantes tM-10 e tN-30. Em relação à
16 concentração de proteínas, apenas o mutante tN-30 mostrou um aumento significativo em
17 relação à cepa selvagem, de aproximadamente 13%. Esses dados indicam que o fluxo de
18 carbono orgânico, quando a via do amido é afetada, é redirecionado não apenas para a síntese
19 de TAGs, mas também para a síntese de proteínas. A concentração de proteínas observada aqui
20 está dentro da faixa normalmente observada em microalgas (Koyande et al., 2019). Os
21 aminoácidos essenciais das microalgas têm um valor biotecnológico significativo e podem ser
22 usados como alimento humano (Lafarga et al., 2020) ou incorporados na alimentação de
23 animais comercialmente importantes (de Medeiros et al., 2021). As proteínas de microalgas
24 estão sendo utilizadas nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e cosmética, com aplicações
25 que incluem propriedades anti-inflamatórias, fotoprotetoras, antioxidantes, reológicas,
26 estimulantes de colágeno, tratamento de doenças crônicas, antimicrobianas e antivirais
27 (Levasseur et al., 2020; López-Sánchez et al., 2022).



1
 2 **Figura 7.** Composição proximal (lipídeos, carboidratos e proteínas) da cepa wild-type de
 3 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg e dos mutantes tM-10 e tN-30 obtidos por irradiação UV.
 4 Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas determinadas por
 5 ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

6
 7 Os resultados da produtividade lipídica (Tabela 2) mostraram um aumento significativo
 8 para a cepa tN-30, que alcançou 28,47 mg/L/d, melhorando a produtividade de lipídeos em 22%
 9 em comparação com a cepa controle (23,30 mg/L/d). Um resultado muito semelhante foi
 10 relatado para o mutante randômico de uma cepa de *Desmodesmus* obtida por exposição a íons
 11 de carbono pesado, onde o mutante D90G-19 mostrou um aumento de 20,6% em comparação
 12 com sua cepa selvagem (Hu et al., 2013). Outros estudos com cepas do gênero *Desmodesmus*
 13 expostas ao sulfonato de etilmetano e luz UV também relataram um aumento na produtividade
 14 de lipídeos (Sijil et al., 2019; Zhang et al., 2016). Esses dados mostram que a mutante tN-30
 15 tem o perfil promissor para a produção em larga escala de biocombustíveis. Por outro lado, a
 16 produtividade de lipídeos do mutante tM-10 (23,74 mg/L/d) não mostrou diferenças
 17 significativas em comparação com a cepa selvagem, mesmo com um aumento significativo nos
 18 níveis de lipídeos celulares. Este resultado se deve a uma densidade celular ligeiramente menor
 19 no mutante em comparação com a cepa selvagem, resultando em uma produtividade de lipídeos
 20 semelhante entre as duas cepas. Embora ambas as cepas tenham produtividade de lipídeos
 21 semelhante, a mutante tM-10 parece ser a melhor candidata para a produção de biodiesel. Com
 22 menor densidade celular e a mesma produtividade de lipídeos, espera-se uma redução no
 23 esforço e na energia necessários para a coleta de células e a ruptura celular durante a extração

1 de lipídeos sensíveis à conversão de biodiesel, reduzindo os custos de produção de biodiesel
2 em comparação com a cepa selvagem.

3

4 **Tabela 3.** Produtividade lipídica (mg/L/d) da cepa wild-type *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg
5 e dos mutantes tM-10 e tN-30 obtidos por irradiação UV. Letras diferentes representam
6 diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

Wt	tM-10	tN-30
$23,3 \pm 1,41^a$	$23,74 \pm 1,14^{ab}$	$28,47 \pm 2,85^b$

7

8

9 **4. Conclusões**

10 O presente estudo destacou o potencial de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg,
11 provavelmente uma espécie ainda não descrita, como uma candidata viável para a produção de
12 biodiesel devido a seus atributos únicos, incluindo a capacidade de crescer em altas
13 temperaturas, resistência à contaminação biológica e coleta eficiente de biomassa. Além disso,
14 este estudo selecionou e caracterizou os mutantes tM-10 e tN-30, gerados por mutagênese
15 induzida por UV, com produção de lipídeos aprimorada, um fator-chave para a produção de
16 biodiesel. A mutante tM-10 apresentou deficiência completa de amido, enquanto a mutante tN-
17 30 exibiu redução parcial de amido e aumento dos níveis de proteína. Interessantemente, os
18 mutantes também revelaram que a interferência na síntese de amido desencadeia uma mudança
19 no fluxo de carbono em direção à produção de lipídeos e proteínas. Os níveis elevados de
20 lipídeos totais nos mutantes ressaltam ainda mais o potencial dessas cepas para aplicações em
21 biodiesel e bioprodutos. A capacidade da cepa de utilizar resíduos sólidos da indústria de
22 petróleo e gás e suas capacidades de cultivo com a adição de CO₂ e cascalho rochoso de
23 perfuração oferecem uma abordagem de produção sustentável e economicamente viável. Além
24 disso, as proteínas microalgais com aminoácidos essenciais possuem um valor biotecnológico
25 significativo e podem ser aplicadas em diversas indústrias, incluindo farmacêutica, nutracêutica
26 e cosmética.

27

28

1 **Referências bibliográficas**

- 2 Alam, Md.A., Wang, Z., 2019. Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and
3 Wastewater Treatment. <https://doi.org/10.1007/978-98113-2264-8>
- 4 Alonso, D.L., Belarbi, E.-H., Fernández-Sevilla, J.M., Rodríguez-Ruiz, J., Grima, E.M., 2000.
5 Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in
6 continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 54,
7 461–471. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00084-4)
- 8 Akgül, F., 2020. Effects of nitrogen concentration on growth, biomass, and biochemical
9 composition of *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald. *Prep Biochem*
10 *Biotechnol* 50, 98–105. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697884>
- 11 An, S.S., Friedl, T., Hegewald, E., 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and
12 *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence
13 comparisons. *Plant Biol* 1. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x>
- 14 Basile, A., Dalena, F., 2019. Second and third generation of feedstocks: The evolution of
15 biofuels, Second and Third Generation of Feedstocks: The Evolution of Biofuels.
16 <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02722-2>
- 17 Bleisch, R., Freitag, L., Ihadjadene, Y., Sprenger, U., Steingröwer, J., Walther, T., Krujatz, F.,
18 2022. Strain Development in Microalgal Biotechnology—Random Mutagenesis
19 Techniques. *Life* 12, 961. <https://doi.org/10.3390/life12070961>
- 20 Chang, K.S., Kim, J., Park, H., Hong, S.J., Lee, C.G., Jin, E.S., 2020. Enhanced lipid
21 productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free
22 CRISPR-Cas9 RNP method. *Bioresour Technol* 303.
23 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122932>
- 24 Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor
25 design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review.
26 *Bioresour Technol* 102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- 27 Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2009. A high throughput Nile red
28 method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J Microbiol*
29 *Methods* 77, 41–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>
- 30 Chung, T.Y., Kuo, C.Y., Lin, W.J., Wang, W.L., Chou, J.Y., 2018. Indole-3-acetic-acid-
31 induced phenotypic plasticity in *Desmodesmus* algae. *Sci Rep* 8.
32 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28627-z>
- 33 de Jaeger, L., Verbeek, R.E., Draaisma, R.B., Martens, D.E., Springer, J., Eggink, G., Wijffels,
34 R.H., 2014. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of

1 *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization. *Biotechnol Biofuels*
2 7, 69. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-69>

3 de Medeiros, V.P.B., Pimentel, T.C., Sant’Ana, A.S., Magnani, M., 2021. Microalgae in the
4 meat processing chain: feed for animal production or source of techno-functional
5 ingredients. *Curr Opin Food Sci* 37, 125–134.
6 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.014>

7 Diffey, B.L., 2002. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18, 68–74.
8 <https://doi.org/10.1034/j.1600-0781.2002.180203.x>

9 Dixit, R., Singh, S., Singh, A., 2020. Effect of nitrogen deficiency on the physiology and
10 biochemical composition of microalga *Scenedesmus rotundus* -MG910488. *J Basic*
11 *Microbiol* 60, 158–172. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900383>

12 DuBois, Michel., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, Fred., 1956. Colorimetric
13 Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28, 350–356.
14 <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

15 Gorman, D.S., Levine, R.P., 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the
16 photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad*
17 *Sci U S A* 54. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>

18 Hao, X., Luo, L., Jouhet, J., Rébeillé, F., Maréchal, E., Hu, H., Pan, Y., Tan, X., Chen, Z., You,
19 L., Chen, H., Wei, F., Gong, Y., 2018. Enhanced triacylglycerol production in the
20 diatom *Phaeodactylum tricorutum* by inactivation of a Hotdog-fold thioesterase gene
21 using TALEN-based targeted mutagenesis. *Biotechnol Biofuels* 11, 312.
22 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1309-3>

23 Hegewald, E., 2000. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae,
24 *Scenedesmaceae*). *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*
25 96, 1–18. https://doi.org/10.1127/algol_stud/96/2000/1

26 Hegewald, E., Braband, A., 2017. A taxonomic revision of *desmodesmus* serie *desmodesmus*
27 (*Sphaeropleales*, *Scenedesmaceae*). *Fottea* 17. <https://doi.org/10.5507/fot.2017.001>

28 Holland, D.L., Gabbott, P.A., 1971. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of
29 Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. *Journal*
30 *of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 659–668.
31 <https://doi.org/10.1017/S0025315400015034>

32 Hu, G., Fan, Y., Zhang, L., Yuan, C., Wang, J., Li, W., Hu, Q., Li, F., 2013. Enhanced Lipid
33 Productivity and Photosynthesis Efficiency in a *Desmodesmus* sp. Mutant Induced by

1 Heavy Carbon Ions. PLoS One 8, e60700.
2 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060700>

3 Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008.
4 Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and
5 advances. The Plant Journal 54, 621–639. [https://doi.org/10.1111/j.1365-
6 313X.2008.03492.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x)

7 Huang, C.H., Tan, C.S., 2014. A review: CO₂ utilization. Aerosol Air Qual Res 14.
8 <https://doi.org/10.4209/aaqr.2013.10.0326>

9 IEA, 2024. Emisiones de CO₂ en 2023 – IEA. Licencia: CC BY 4.0. París
10 <https://www.iea.org/reports/co2-emissions-in-2023>,

11 Kilian, O., Benemann, C.S.E., Niyogi, K.K., Vick, B., 2011. High-efficiency homologous
12 recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. Proceedings of the
13 National Academy of Sciences 108, 21265–21269.
14 <https://doi.org/10.1073/pnas.1105861108>

15 Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., Show, P.-L., 2019.
16 Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. Food Science
17 and Human Wellness 8, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>

18 Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J.M., González-López, C., Ación-Fernández, F.G., 2020.
19 Spirulina for the food and functional food industries. Food Research International 137,
20 109356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356>

21 Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V., 2020. A review of high value-added molecules
22 production by microalgae in light of the classification. Biotechnol Adv 41, 107545.
23 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>

24 Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., Hu, Q., 2010a.
25 *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-
26 accumulates triacylglycerol. Metab Eng 12, 387–391.
27 <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.02.002>

28 Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2010b. Inhibition of starch synthesis results
29 in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnol Bioeng 107,
30 258–268. <https://doi.org/10.1002/bit.22807>

31 Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid
32 production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae)
33 under nitrogen-limited conditions. Bioresour Technol 102, 123–129.
34 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.036>

- 1 Lin, W.-R., Ng, I.-S., 2020. Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-
2 E to enhance lipid accumulation. *Enzyme Microb Technol* 133, 109458.
3 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109458>
- 4 López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A.L., Aguilar-Juárez, Ó., Senés-Guerrero, C., Orozco-
5 Nunnely, D.A., Carrillo-Nieves, D., Gradilla-Hernández, M.S., 2022. Microalgae-
6 based livestock wastewater treatment (MbWT) as a circular bioeconomy approach:
7 Enhancement of biomass productivity, pollutant removal and high-value compound
8 production. *J Environ Manage* 308, 114612.
9 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114612>
- 10 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the
11 Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–75.
- 12 Marsh, J.B., Weinstein, D.B., 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid*
13 *Res* 7, 574–6.
- 14 Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A., Isdepsky, A., Sing, S.F., 2013. Standard Methods for
15 Measuring Growth of Algae and Their Composition, in: *Algae for Biofuels and Energy*.
16 Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 265–284. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-
17 5479-9_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_16)
- 18 Naik, S.N., Goud, V. V., Rout, P.K., Dalai, A.K., 2010. Production of first and second
19 generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy*
20 *Reviews* 14, 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- 21 Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel
22 production using wastewater resources. *Bioresour Technol* 102.
23 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- 24 Rai, A., Sirotiya, V., Mourya, M., Khan, M.J., Ahirwar, A., Sharma, A.K., Kawatra, R.,
25 Marchand, J., Schoefs, B., Varjani, S., Vinayak, V., 2022. Sustainable treatment of
26 dye wastewater by recycling microalgal and diatom biogenic materials: Biorefinery
27 perspectives. *Chemosphere* 305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135371>
- 28 Samorì, G., Samorì, C., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2013. Growth and nitrogen removal
29 capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch
30 culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Res* 47.
31 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006>
- 32 Sijil, P.V., Sarada, R., Chauhan, V.S., 2019. Enhanced accumulation of alpha-linolenic acid
33 rich lipids in indigenous freshwater microalga *Desmodesmus* sp.: The effect of low-

1 temperature on nutrient replete, UV treated and nutrient stressed cultures. *Bioresour*
2 *Technol* 273, 404–415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.028>

3 Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., Taylor, M., 2010. An overview of second generation
4 biofuel technologies. *Bioresour Technol* 101, 1570–1580.
5 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>

6 Sirikhachornkit, A., Vuttipongchaikij, S., Suttangkakul, A., Yokthongwattana, K., Juntawong,
7 P., Pokethitiyook, P., Kangvansaichol, K., Meetam, M., 2016. Increasing the
8 Triacylglycerol Content in *Dunaliella tertiolecta* through Isolation of Starch-Deficient
9 Mutants. *J Microbiol Biotechnol* 26, 854–866. <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10022>

10 Sirikhachornkit, A., Suttangkakul, A., Vuttipongchaikij, S., Juntawong, P., 2018. De novo
11 transcriptome analysis and gene expression profiling of an oleaginous microalga
12 *Scenedesmus acutus* TISTR8540 during nitrogen deprivation-induced lipid
13 accumulation. *Sci Rep* 8, 3668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22080-8>

14 Sutherland, D.L., Heubeck, S., Park, J., Turnbull, M.H., Craggs, R.J., 2018. Seasonal
15 performance of a full-scale wastewater treatment enhanced pond system. *Water Res*
16 136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.046>

17 Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics
18 Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

19 Van Hannen, E.J., Fink, P., Lüring, M., 2002. A revised secondary structure model for the
20 internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its
21 implication for the phylogeny of these algae. *Eur J Phycol* 37.
22 <https://doi.org/10.1017/S096702620200361X>

23 Walsby, A.E., 1995. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. By E. W. Becker.
24 Cambridge: Cambridge University Press (1994), pp. 230, £40.00, US\$69.95. ISBN 0-
25 521-35020-4. *Exp Agric* 31, 112–112. <https://doi.org/10.1017/S0014479700025126>

26 Wehr, J.D., 2007. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* by Barsanti, L. &
27 Gualtieri, P. *J Phycol* 43, 412–414. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00335.x>

28 Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science* (1979) 329,
29 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>

30 Woolston, B.M., Edgar, S., Stephanopoulos, G., 2013. Metabolic Engineering: Past and
31 Future. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 4, 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>

32
33 Work, V.H., Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Meuser, J.E., Elliott, L.G., Vinyard, D.J.,
34 Laurens, L.M.L., Dismukes, G.C., Posewitz, M.C., 2010. Increased lipid accumulation

- 1 in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased
2 carbohydrate synthesis in complemented strains. Eukaryot Cell 9, 1251–1261.
3 <https://doi.org/10.1128/EC.00075-10>
- 4 Zabawinski, C., Van den Koornhuyse, N., D’Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue,
5 B., Lacroix, J.M., Preiss, J., Ball, S., 2001. Starchless mutants of *Chlamydomonas*
6 *reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose
7 pyrophosphorylase. J Bacteriol 183, 1069–1077.
8 <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.1069-1077.2001>
- 9 Zhang, Y., He, M., Zou, S., Fei, C., Yan, Y., Zheng, S., Rajper, A.A., Wang, C., 2016.
10 Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by Ethylmethane
11 sulfonate-induced mutation. Bioresour Technol 207, 268–275.
12 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.120>
- 13 Zhu, C.J., Lee, Y.K., 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. J
14 Appl Phycol 9, 189–194. <https://doi.org/10.1023/A:1007914806640>

15
16
17

CAPÍTULO 2

Aplicação da ferramenta Delineamento composto central (DCC) na maximização da produção de lipídeos neutros do mutante amido-deficiente tN-30 de *Desmodemus* sp. Petrobras/Furg em cultivo mixotrófico de duas fases

1 RESUMO

2 Em um estudo prévio, nosso grupo de pesquisa produziu um mutante amido-deficiente
3 (tN-30) da microalga oleaginosa *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg, o qual mostrou um aumento
4 significativo na produção de lipídeos neutros e um potencial interessante para a produção de
5 biodiesel de terceira geração. Com o objetivo de maximizar o potencial deste mutante, utilizou-
6 se a ferramenta Delineamento Composto Central (DCC) para otimizar os parâmetros de
7 salinidade e intensidade luminosa, visando maximizar a síntese de lipídeos neutros em
8 condições de presença ou ausência de nitrogênio. Também, foram avaliados o crescimento, a
9 biomassa, o conteúdo de lipídeos neutros, lipídeos totais, carboidratos, proteínas e perfil de
10 ácidos graxos, comparando o mutante tN30 com a cepa selvagem de *Desmodesmus* sp.
11 Petrobras/Furg. Os resultados da DCC apontaram que a intensidade luminosa alta (693
12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) é a mais eficiente tanto para produção de biomassa quanto para acúmulo de lipídeos
13 neutros. No caso da salinidade, a CCD mostrou que para biomassa é melhor salinidade 6,9 g/L,
14 enquanto para acúmulo de lipídeos neutros é 24,5 g/L. Nos ensaios de validação fixou-se a
15 intensidade luminosa em 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e variou-se a salinidade (6,9, 10 e 15,7 g/L) para
16 determinar o ponto de melhor custo-benefício para esse parâmetro na relação
17 crescimento/biomassa/lipídeos neutros. Os resultados para o crescimento, produção de
18 biomassa e lipídeos neutros mostraram que o cultivo em salinidade 10 g/L, associado com a
19 intensidade luminosa de 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, aumenta significativamente o potencial do mutante tN-
20 30, especialmente em condições de ausência de nitrogênio. Nessas condições, análise do perfil
21 de ácidos graxos mostrou um aumento significativo de ácidos graxos saturados e ácidos graxos
22 monoinsaturados na cepa tN-30, em comparação com a cepa controle. Estes resultados sugerem
23 que a cepa tN-30 tem potencial promissor para produção de biodiesel, especialmente sob
24 condições de estresse salino e luminoso. A otimização desses parâmetros de cultivo pode ser
25 crucial para maximizar a produção de lipídeos neutros, essenciais para a fabricação de biodiesel.
26 Em resumo, o estudo demonstrou que a cepa tN-30 é capaz de produzir altos níveis de lipídeos
27 neutros em condições específicas de cultivo, oferecendo uma alternativa viável e promissora
28 para a produção sustentável de biodiesel.

29

30 **Palavras-chave:** Triacilglicerol (TAG); microalga oleaginosa; estresse salino; intensidade
31 luminosa; biodiesel de terceira geração.

32

33

1 **ABSTRACT**

2 In a previous study, our research group produced a starch-deficient mutant (tN-30) of
3 the oleaginous microalga *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg, which showed a significant
4 increase in neutral lipid production and promising potential for third-generation biodiesel
5 production. To maximize this mutant's potential, the Central Composite Design (CCD) tool was
6 used to optimize salinity and light intensity parameters, aiming to maximize neutral lipid
7 synthesis under conditions with or without nitrogen. Also, growth, biomass, neutral lipid
8 content, total lipids, carbohydrates, proteins, and fatty acid profile were evaluated, comparing
9 the tN30 mutant with the wild strain of *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg. The CCD results
10 indicated that high light intensity (693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) is the most efficient for both biomass
11 production and neutral lipid accumulation. For salinity, the CCD showed that 6,9 g/L is better
12 for biomass, while 24,5 g/L is optimal for neutral lipid accumulation. In the validation trials,
13 the light intensity was set at 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, and salinity varied (6,9, 10, and 15,7 g/L) to
14 determine the best cost-benefit point for this parameter in the growth/biomass/neutral lipids
15 relationship. The results for growth, biomass production, and neutral lipids showed that
16 cultivation at 10 g/L salinity, combined with a light intensity of 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, significantly
17 increases the potential of the tN-30 mutant, especially under nitrogen absence conditions. Under
18 these conditions, fatty acid profile analysis showed a significant increase in saturated fatty acids
19 and monounsaturated fatty acids in the tN-30 strain, compared to the control strain. These
20 results suggest that the tN-30 strain has promising potential for biodiesel production, especially
21 under saline and light stress conditions. Optimizing these cultivation parameters can be crucial
22 to maximizing neutral lipid production, essential for biodiesel manufacturing. In summary, the
23 study demonstrated that the tN-30 strain can produce high levels of neutral lipids under specific
24 cultivation conditions, offering a viable and promising alternative for sustainable biodiesel
25 production.

26

27 **Keywords:** Triacylglycerol (TAG); oleaginous microalgae; saline stress; light intensity; third-
28 generation biodiesel

1. INTRODUÇÃO

Microalgas são microrganismos fotoautotróficos que têm a capacidade de crescer em presença de luz e, ao mesmo tempo, produzir moléculas diversas de interesse industrial e elevado valor comercial (e.g. proteínas, carotenoides, lipídeos polissacarídeos) (BRASIL *et al.*, 2017). Entre esses compostos, os lipídeos têm sido foco da indústria energética por serem precursores para a produção de biodiesel de terceira-geração (3G) (ABOMOHR; EL-SHEEKH; HANELT, 2017). A partir dos triacilglicerídeos (TAG), e mediante transesterificação, são obtidos os ésteres metílicos de ácidos graxos, um tipo de biodiesel (ZHU, L. D.; LI; HILTUNEN, 2016). Porém, os custos de produção de biodiesel a partir de microalga ainda é elevado para o mercado atual. É preciso melhorar e otimizar diversas etapas do processo para viabilizar a produção de biodiesel a partir de microalgas. Entre essas melhoras, estão os cultivos e as condições abióticas para aumentar o rendimento de lipídeos e, especificamente, os lipídeos neutros ou TAGs que são as moléculas precursoras para a produção de biodiesel (ZHU, L. D. *et al.*, 2016; ZHU, L. D.; LI; HILTUNEN, 2016).

A composição proximal e os mecanismos metabólicos das microalgas dependem de diversos fatores como temperatura, salinidade, disponibilidade de luz e disponibilidade de nutrientes (RINCON; BEYENAL; ROMERO, 2024). A salinidade é um dos fatores que mais influencia na composição e nos processos bioquímicos das microalgas (HARIS *et al.*, 2022; PANDIT; FULEKAR; KARUNA, 2017). O estresse salino provoca mudanças e reajustes de moléculas no interior celular como resposta adaptativa a pressão osmótica que a salinidade pode causar nas microalgas. Entre essas respostas intrínsecas está a síntese de lipídeos, mudando também a sua composição (ALISHAH ARATBONI *et al.*, 2019; SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012). O efeito da salinidade como indutor da produção de lipídeos tem sido bastante utilizado e documentado (BARTLEY *et al.*, 2013; CHOKSHI *et al.*, 2017; JI *et al.*, 2018; SRIVASTAVA; NISHCHAL; GOUD, 2017).

A luz, e especificamente a intensidade de luz, é um fator importante nas microalgas que afeta diretamente ao crescimento e o armazenamento de lipídeos neutros. Tanto intensidades baixas como muito elevadas podem provocar um crescimento reduzido devido à falta de energia para estimular os fotossistemas no caso das intensidades baixas, ou por provocar fotooxidação e fotoinibição no caso de intensidades altas (ALISHAH ARATBONI *et al.*, 2019). O efeito da intensidade de luz na síntese de lipídeos varia de espécie para espécie mas, no geral, o estresse por intensidade de luz promove a síntese de lipídeos como resposta (SEO *et al.*, 2017; TAKESHITA *et al.*, 2014). Por isso, é importante conhecer e otimizar a intensidade de luz para maximizar as produções de lipídeos e biomassa. Da mesma forma, a modificação da

1 composição de nutrientes também é um sinal de indução para a acumulação de lipídeos
2 (ANANTHI; PUGAZHENDHI; ARUN, 2021; CHU *et al.*, 2020), sendo o déficit de nitrogênio
3 um dos maiores indutores da síntese de lipídeos em microalgas (KAWAMURA *et al.*, 2021;
4 TOUMI; POLITAEVA, 2021; XIN *et al.*, 2010).

5 É possível se obter um aumento adicional dos níveis de lipídeos neutros e de biomassa
6 otimizando as condições de salinidade e intensidade luminosa na qual se cultiva cepas com
7 potencial industrial, tais como o mutante amido-deficiente tN-30 de *Desmodesmus* sp.
8 Petrobras/Furg. Em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (não publicado), esta cepa
9 demonstrou o dobro da capacidade de estocar lipídeos neutros em comparação com a cepa
10 selvagem. Entretanto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre o potencial de produção
11 de lipídeos neutros do mutante tN-30 no que tange as melhores condições abióticas para seu
12 cultivo. Para esse objetivo existem modelos matemáticos de otimização estatística baseados em
13 uma premissa empírica como a metodologia de superfície-resposta (RSM), a qual possibilita a
14 maximização da produção de compostos de interesse em um sistema biológico (MACHADO;
15 DUARTE; SANTOS, 2023; RUGNINI, LORENZA *et al.*, 2020). Atualmente, já se tem
16 conhecimento de estudos de otimização por SRM em microalgas do gênero *Desmodesmus*,
17 onde o cultivo de *Desmodesmus* sp. VV2 foi otimizado para melhorar os teores de lipídeos e o
18 perfil de ácidos graxos para a produção de biodiesel (VIMALI *et al.*, 2022). Zhang e
19 colaboradores (2022) também aplicaram a SRM para otimizar a processo de coleta por auto-
20 floculação de *Desmodesmus* sp. CHX1.

21 O presente estudo tem como objetivo otimizar os parâmetros de salinidade e intensidade
22 de luz para aprimorar a síntese de lipídeos neutros no mutante amido-deficiente tN-30 de
23 *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras. Primeiramente, foi utilizada a ferramenta Delineamento
24 central composto rotacional (DCCR), um tipo específico de planejamento experimental da
25 metodologia superfície-resposta (RSM), para determinar as condições ideais de salinidade e
26 intensidade de luz, com intuito de maximizar a produção de lipídeos neutros do mutante tN-30.
27 Posteriormente, após a determinação das melhores condições de salinidade e intensidade
28 luminosa, foi avaliado o efeito da restrição de nitrogênio em um cultivo de duas fases: I) cultivo
29 com condições que favorecem o crescimento da microalga (em presença de nitrogênio), e II)
30 cultivo que favorece a síntese de moléculas de estoque (utilizando a retirada de nitrogênio como
31 indutor). Ao final dos experimentos foram analisados o crescimento, a biomassa, o conteúdo
32 de lipídeos neutros, lipídeos totais, carboidratos, proteínas e perfil de ácidos graxos,
33 comparando o mutante tN30 com a cepa selvagem de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg.

34

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microalgas, condições de cultivo e desenho experimental

Primeiramente, a microalga alvo do presente estudo foi produzida em um estudo prévio (não publicado) onde a cepa selvagem de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg foi exposta à radiação ultravioleta (UV) para a obtenção de mutantes amido-deficientes. Entre os mutantes selecionados, tN-30 foi o mais promissor pela sua capacidade dobrada de armazenar lipídeos neutros em comparação com a cepa selvagem. Para planejar os experimentos de maximização da produção de lipídeos neutros no mutante tN-30 em função da salinidade e da intensidade luminosa, foi utilizada a ferramenta Delineamento central composto rotacional (DCCR). O planejamento com a DCCR consistiu em onze ensaios em cinco níveis codificados de salinidade (0,5, 4, 12,5, 21, 24,5 g/L) e cinco de intensidade de luz (56,8, 150, 375, 600, 693,2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), utilizando três réplicas nos pontos centrais.

O mutante tN-30 foi cultivado em meio mixotrófico TAP (GORMAN:LEVINE, 1965) com densidade inicial de 250.000 células/mL em frascos Erlenmeyer com volume final de 250 mL. O pH inicial foi de 8,1, temperatura de 30°C com fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro), sendo os cultivos homogeneizados por aeração filtrada em filtro de poros de 0,22 μm de diâmetro por 12 dias. O modelo quadrático foi utilizado para analisar o efeito dos fatores independentes sobre os fatores dependentes (rendimento de biomassa e rendimento da fluorescência dos lipídeos neutros).

No experimento de validação, tanto a cepa mutante tN-30 quanto a cepa selvagem de *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras foram cultivadas em três diferentes salinidades (6,9, 10 e 15,7 g/L) e uma intensidade luminosa (693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Os outros parâmetros de cultivo foram mantidos conforme descrito acima. O experimento começou com seis repetições para cada tratamento e, para observar o efeito da depleção de nitrogênio sob diferentes condições de cultivo, no final da fase de crescimento exponencial as microalgas foram centrifugadas a 2.000 g por 3 minutos, sendo três delas (escolhidas aleatoriamente) ressuspensas em meio N-TAP (sem nitrogênio), e as três restantes ressuspensas em meio TAP (com nitrogênio). Amostras de 2 mL foram coletadas diariamente para monitorar lipídeos neutros (1 mL) e a densidade de células usando um hemocítmetro Neubauer sob um microscópio óptico (MOHEIMANI *et al.*, 2013). Além disso, água doce autoclavada (pH 8,1) foi adicionada diariamente para compensar a perda por evaporação e manter os níveis de salinidade constantes nas culturas. Finalmente, foram coletados 10 mL de cultura a cada dois dias para avaliar os níveis de biomassa.

1 **2.2. Rendimento de biomassa e porcentagem de cinzas**

2 O crescimento da biomassa foi determinado pela análise do peso seco. Dez mL de
3 cultura foram filtrados e concentrados em um filtro GF50/A pré-seco e pesado. Posteriormente,
4 os filtros foram lavados com solução de formiato de amônio 50 mM para remover o excesso de
5 sal (ZHU;LEE, 1997), e depois secos a 60 ° C por 24 horas. A biomassa foi determinada pela
6 diferença de peso entre os filtros secos antes e depois da filtração. Para determinação do peso
7 seco isento de cinzas e do percentual de cinzas, a biomassa contida no filtro foi incinerada a
8 450°C em forno mufla por 5 h. Em seguida, os filtros foram resfriados em dessecador a vácuo
9 e rapidamente pesados. O peso seco livre de cinzas da biomassa (mg/mL) e a porcentagem de
10 cinzas foram calculados de acordo com as seguintes equações (MOHEIMANI *et al.*, 2013):

11

12 $\text{Peso seco (PS)} = [(\text{peso do filtro mais algas}) - (\text{peso do filtro})] / \text{Volume filtrado}$

13

14 $\text{Peso das cinzas (PC)} = [(\text{Peso do filtro mais alga após a incineração}) - (\text{peso do filtro})] / \text{Volume}$
15 filtrado

16

17 $\text{Peso seco sem cinzas (PSSC)} = (\text{Peso seco}) - (\text{Peso das cinzas})$

18

19 $\text{Porcentagem de cinzas} = (\text{peso de cinzas} / \text{peso seco}) * 100$

20

21 **2.3. Análise de lipídeos neutros**

22 Para avaliar a concentração de lipídeos neutros nas microalgas, foi utilizada a coloração
23 com Nile red (CHEN *et al.*, 2009). Três µL de solução de Nile red (0,5 mg/mL em acetona)
24 foram adicionados a 1 mL de cultura e agitados em vórtice por 1 min. Após 15 minutos de
25 incubação no escuro, 200 µL foram adicionados a uma placa preta de 96 poços, e a fluorescência
26 foi medida usando um fluorímetro (BioTek, leitor de microplacas SYNERGY H1) com
27 comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 nm e 568 nm, respectivamente, quando
28 a placa apresentou fluorescência própria foi descontada do valor de fluorescência da amostra
29 medida. Os dados foram normalizados por volume (mL) e, conseqüentemente, a produtividade
30 da fluorescência foi calculada pela seguinte equação:

31

32 $\text{Produtividade de fluorescência (a.u./L/d)} = \text{Fluorescência (t)} - \text{Fluorescência inicial (t}_0) / \text{dias}$
33 (t)

34

2.4. Determinação de carboidratos, lipídeos e proteínas totais

A determinação de carboidratos e proteínas foi realizada com 10 mg de biomassa liofilizada de cada amostra, hidratada com 10 mL de água destilada e submetida à ruptura celular por sonicação (QSonica, modelo Q55, EUA) com programa de 10 ciclos de 1 min (on/off) e frequência de 20 kHz. Os carboidratos totais foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico com curva padrão de glicose (DUBOIS *et al.*, 1956). Para determinação da proteína total foi utilizado o método colorimétrico de Lowry, com prévia solubilização com hidróxido de sódio (NaOH) e utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (LOWRY *et al.*, 1951). Para a extração lipídica, 10 mg de biomassa liofilizada foram tratados com solventes orgânicos metanol-clorofórmio na proporção de 2:1, respectivamente (MARSH; WEINSTEIN, 1966). Posteriormente, para a medição do conteúdo lipídico total, foi utilizada uma curva padrão de tripalmitina (HOLLAND; GABBOTT, 1971).

2.5. Determinação do perfil de ácidos graxos (FAMES)

O preparo das amostras de óleo para determinação do perfil graxo foi realizado seguindo o método proposto por HARTMAN e LAGO (1973), através da pesagem de aproximadamente 30 mg da amostra em uma balança analítica, seguido de adição de 500 μL de KOH 0,1 mol L⁻¹. A solução ficou por 1h e 30 min em banho maria a 60 °C, seguido da adição de 1,5 mL de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹ em banho maria a 60 °C. Em seguida, foi realizado o resfriamento da solução até temperatura ambiente e adicionou-se 2 mL de hexano, que foi agitado em vórtex por 1 min e centrifugado por 5 min a 7.000 rpm para separação das fases. Após a centrifugação, uma alíquota de hexano foi transferida para um vial para posterior análise cromatográfica.

A determinação do teor de ácidos graxos foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série (GC-MS/MS) empregando método proposto por LEMÕES *et al.* (2016), em um cromatógrafo a gás modelo GC-2010, equipado com amostrador automático modelo Combipal AOC 6000 e detector espectrômetro de massa com um analisador do tipo triplo quadrupolo modelo TQ 8050, todos da Shimadzu. O gás de arraste usado foi o hélio (99,999% pureza) a uma taxa de fluxo constante de 1,30 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi 250 °C e 1 μL do extrato foram injetados a uma pressão de 300 kPa no modo *split*, com uma taxa de divisão da amostra de 1:100. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) (Restek, Bellefonte, PA, EUA), empregando uma rampa de temperatura iniciando em 80 °C e permanecendo nesta temperatura por 1 min, seguido por uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 180 °C. Por fim, o forno foi aquecido até 330 °C a 7 °C min⁻¹, com tempo total de análise de 32,43 min. A ionização dos

1 compostos foi realizada por impacto de elétrons (EI) com energia de 70 eV. As temperaturas
2 da interface e da fonte de íons foram 280 °C e 230 °C, respectivamente. As determinações
3 foram realizadas no modo varredura, na faixa entre 50 a 500 m/z. A manipulação do
4 equipamento, coleta e tratamento de dados foram realizados pelo software GCMS solution,
5 versão 4.45 SP1 (Shimadzu).

6

7 **2.6. Análise estatística**

8 O experimento de otimização (CCD) foi avaliado pelo Statistica versão 5 (StatSoft,
9 Tulsa, OK). A normalidade e homogeneidade das curvas de crescimento e fluorescência lipídica
10 neutra foram analisadas pelo teste de D'Agostino & Pearson, enquanto os níveis de biomassa e
11 composição proximal foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk. As curvas de crescimento,
12 fluorescência lipídica neutra e biomassa foram avaliadas por meio de ANOVA de duas vias
13 seguida pelo teste de comparações múltiplas de Šidák. A produtividade da fluorescência lipídica
14 neutra foi avaliada pelo teste não paramétrico "tipo Anova", seguido de comparações múltiplas
15 e intervalos de confiança simultâneos pelo método "tipo Tukey" com os pacotes nparLD e
16 nparcomp do software RStudio, respectivamente. A composição proximal foi analisada por
17 ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey. Os valores foram considerados
18 significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

19

20 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

21

22 **3.1. Influência da salinidade e da intensidade luminosa na biomassa e no acúmulo de** 23 **lipídeos neutros**

24 É conhecida a influência da salinidade e da intensidade de luz no crescimento e no
25 estoque de macromoléculas de reserva, como os triacilgliceróis (TAGs), nas microalgas,
26 podendo ter um efeito positivo ou negativo, dependendo da espécie. Portanto, o DCCR foi
27 utilizado para conhecer o efeito de ambos os fatores no crescimento (biomassa) e no estoque de
28 lipídeos neutros no mutante tN-30. A Tabela 1 mostra a matriz com os diferentes níveis de
29 ambas as variáveis estudadas e também a resposta obtida para a biomassa e a fluorescência de
30 lipídeos neutros.

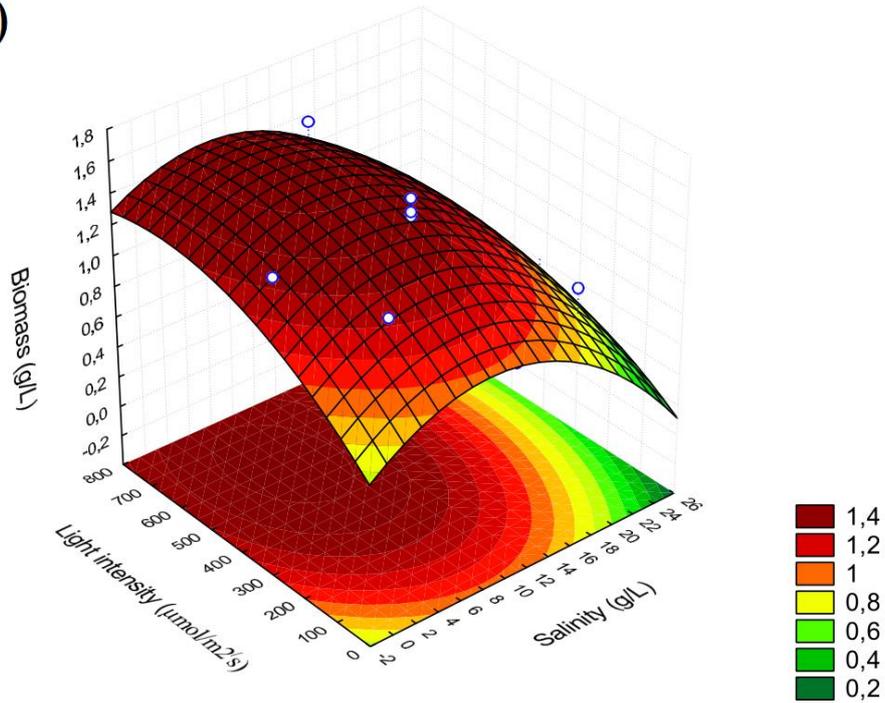
31 Para a biomassa observamos que a salinidade influencia estatisticamente ($p < 0,05$) nos
32 níveis de biomassa tendo um efeito positivo até a salinidade de 6,9 g/L (valor máximo
33 otimizado) e, em salinidades mais altas, passa a ter um efeito negativo no crescimento do
34 mutante tN-30. A intensidade de luz também influencia estatisticamente e positivamente no

1 crescimento da microalga, sendo o ótimo estabelecido de 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (dentro do intervalo
 2 testado), o valor extremo positivo (+1,414) na matriz experimental de otimização (Figura 1a).
 3 Para a resposta de fluorescência de lipídeos neutros, observou-se que tanto a salinidade como a
 4 intensidade de luz foram significativamente positivas, sendo os máximos valores alcançados
 5 (dentro dos intervalos testados) para ambos os extremos positivos (+1,414) de ambas as
 6 variáveis 24,5 g L^{-1} e 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente (Figura 1b).

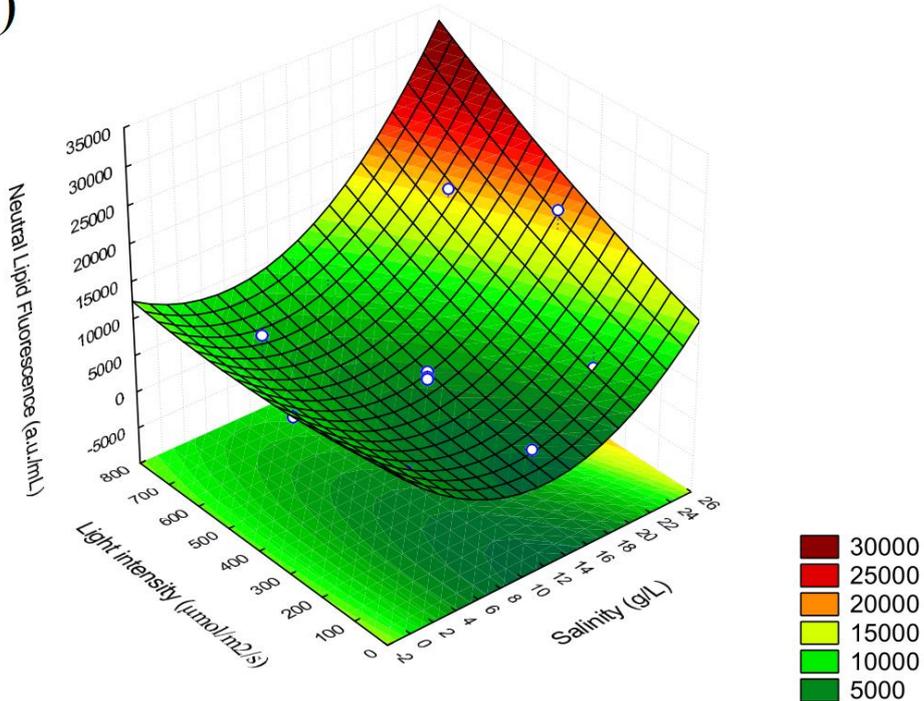
7
 8 **Tabela 1.** A ferramenta Delineamento central composto rotacional (DCCR) 2² representa a
 9 produção de biomassa e fluorescência de lipídeos neutros do mutante tN-30 de *Desmodesmus*
 10 sp. Petrobras/Furg conforme é influenciada pela concentração de salinidade e intensidade de
 11 luz.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Resposta 1	Resposta 2
	Salinidade (g/L)	Intensidade luz ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Biomassa (g/L)	Fluorescência (a.u./mL)
1	-1 (4)	-1 (150)	1,283	4.310
2	+1 (21)	-1 (150)	0,931	6.270
3	-1 (4)	+1 (600)	1,414	9.298
4	+1 (21)	+1 (600)	0,931	18.263
5	-1,414 (0,5)	0 (375)	1,343	7.223
6	+1,414 (24,3)	0 (375)	0,579	19.063
7	0 (12,5)	-1,414 (56,8)	0,848	3.755
8	0 (12,5)	+1,414 (693,2)	1,559	6.560
9	0 (12,5)	0 (375)	1,469	5.018
10	0 (12,5)	0 (375)	1,352	4.353
11	0 (12,5)	0 (375)	1,379	4.038

a)



b)



1

2 **Figura 1.** Gráfico de superfície de resposta do mutante tN-30 de *Desmodesmus* sp.
3 Petrobras/Furg para as duas variáveis dependentes (salinidade e intensidade luminosa). a) efeito
4 da salinidade e intensidade de luz no rendimento da biomassa (g/L), b) efeito da salinidade e
5 intensidade de luz na fluorescência dos lipídeos neutros (a.u./mL).

6

1 **3.2. Ensaio de validação**

2 O ensaio de validação representa uma confirmação empírica dos resultados observados
3 no ensaio de otimização. No caso da biomassa, os melhores resultados previstos segundo o
4 modelo empírico quadrático foram para a salinidade 6,9 g/L e intensidade luminosa de 693
5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, com uma resposta predita de 1,6 g/L. Já para a produção de lipídeos, o melhor
6 resultado foi com salinidade 24,5 g/L e intensidade luminosa de 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Fica nítido que
7 a intensidade luminosa de 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ não é limitante para o mutante tN-30 no que se refere
8 à produção de biomassa e de lipídeos neutros. Ao contrário, a salinidade parece ser um fator
9 limitante, pois não há convergência entre o ótimo de produção de biomassa (salinidade 6,9 g/L)
10 e o ótimo para a produção de lipídeos neutros (salinidade 24,5 g/L). Para manter uma condição
11 com o melhor custo-benefício no ensaio de validação, optamos pela intensidade luminosa de
12 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e uma salinidade que representa o ponto intermediário entre 6,9 e 24,5 g/L, neste
13 caso 15,7 g/L. Além das salinidades 6,9 e 15,7 g/L, foi também incluída no ensaio uma
14 salinidade intermediária (10 g/L), a qual já havia sido testada previamente (manuscrito 1 sob
15 preparação), porém com baixa intensidade luminosa (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Neste ensaio de validação,
16 a salinidade 10 g/L será testada em maior intensidade luminosa (693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), os cultivos
17 serão de volume maior (250 mL), com um tipo de homogeneização diferente e, pela primeira
18 vez, a microalga cultivada nesta condição também será submetida a estresse por déficit de
19 nitrogênio. Todos os resultados a seguir derivam de experimentos realizados em intensidade
20 luminosa de 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, em três salinidades (6,9, 10 e 15,7 g/L), comparando o mutante
21 tN-30 com a cepa selvagem de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg.

22

23 **3.3. Crescimento das microalgas**

24 O crescimento das microalgas depende da disponibilidade de nutrientes, principalmente
25 do tipo de carbono e nitrogênio e da intensidade luminosa. Nesse estudo optamos por utilizar
26 fontes de carbono e nitrogênio orgânicos (acetato e amônio, respectivamente) a fim de
27 maximizar os resultados esperados e, pelo mesmo motivo, aplicou-se a metodologia DCCR
28 para maximizar o efeito da luz na microalga foco desse estudo.

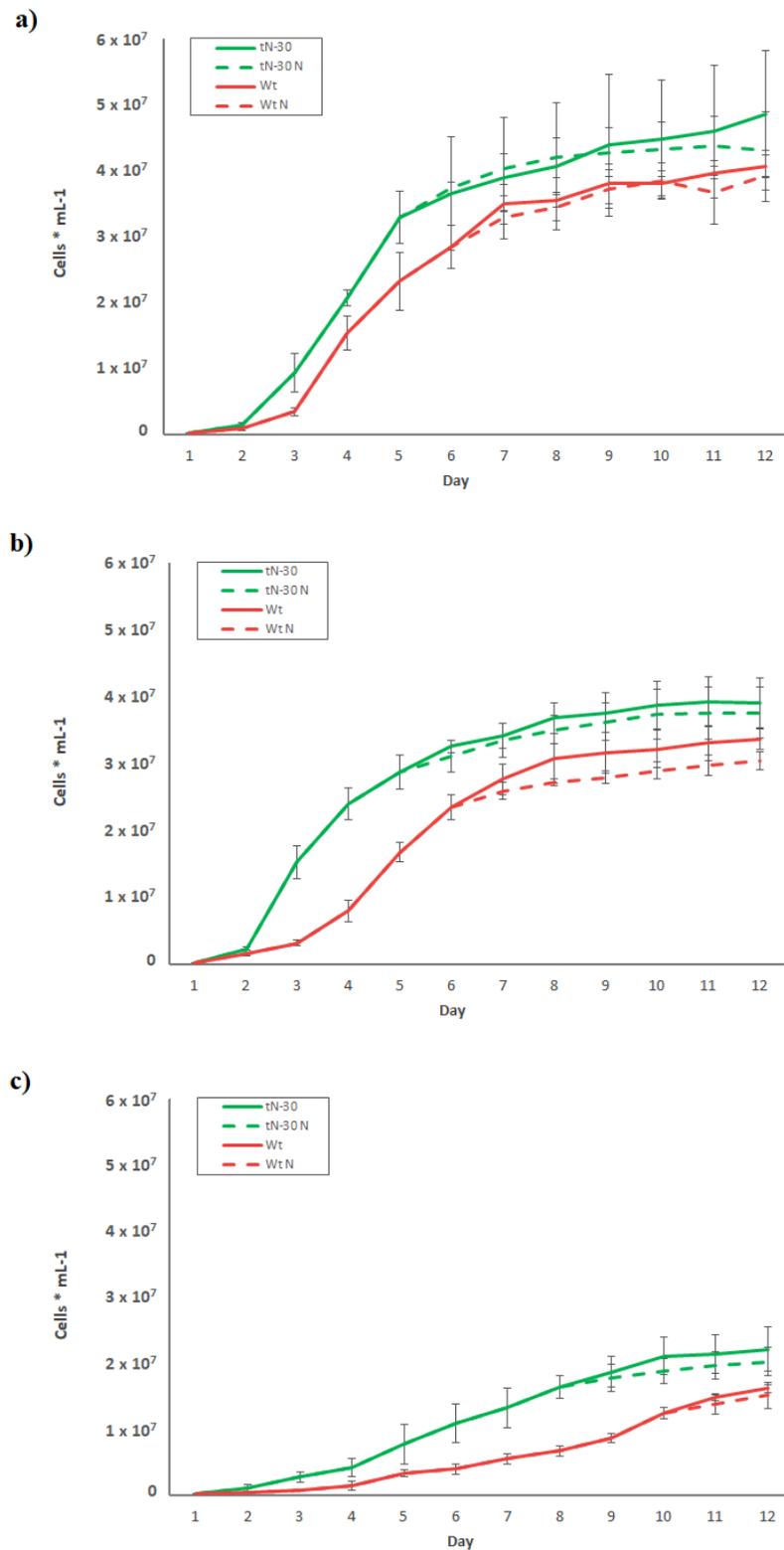
29 As curvas de crescimento estão mostradas na Figura 2. Com relação à salinidade 6,9 g/L
30 (Figura 2a), os resultados revelaram uma melhor performance do mutante tN-30, comparando
31 com a cepa selvagem. Observou-se a melhor taxa de densidade celular para a cepa tN-30 com
32 valores que se aproximavam ao $5 \cdot 10^7$ células/mL na fase estacionária. Por outro lado, a cepa
33 selvagem atingiu apenas $4 \cdot 10^7$ células/mL, também na fase estacionária. Apesar de que tN-30

1 apresentou uma densidade celular sempre maior do que a cepa selvagem, não foram encontradas
2 diferenças estatísticas entre ambas as cepas na fase estacionária. Entretanto, na fase exponencial
3 observou-se um crescimento estatisticamente significativo maior de tN-30 em relação à cepa
4 selvagem, atingindo o final da fase exponencial no quinto dia de cultivo (momento de indução
5 por déficit de nitrogênio). A cepa selvagem atingiu o final da fase exponencial um dia depois,
6 no sexto dia de cultivo. Quando o crescimento de ambas as cepas foi realizado em situação de
7 déficit de nitrogênio, observamos que nenhuma delas foi significativamente diferente ao cultivo
8 com nitrogênio, validando o dia escolhido para a troca de meio sem nitrogênio.

9 Na salinidade 10 (Figura 2b), tN-30 apresentou um crescimento superior do que a cepa
10 selvagem, desde o terceiro dia de cultivo (fase exponencial) até o final do experimento (fase
11 estacionária). Do mesmo jeito do que na salinidade 6,9 g/L, a cepa tN-30 atingiu o final da fase
12 exponencial um dia antes do que a cepa selvagem. Então a indução por déficit de nitrogênio
13 para as cepas tN-30 e selvagem foram nos dias 5 e 6, respectivamente, e não se observou
14 diferenças estatísticas de ambas as cepas entre o cultivo com e sem nitrogênio. Finalmente, na
15 salinidade 10 a cepa tN-30 atingiu densidades de quase $4 \cdot 10^7$ células/mL na fase estacionária,
16 enquanto a cepa selvagem só atingiu os $3,3 \cdot 10^7$ células/mL nessa mesma fase. Na salinidade
17 maior (15,7 g/L) (Figura 2c), novamente a cepa tN-30 se destacou com uma maior densidade e
18 velocidade de crescimento do que a cepa selvagem. A cepa tN-30 foi estatisticamente superior
19 desde o dia 4 de cultivo até o último dia de experimento. O final da fase exponencial e o dia de
20 indução do déficit de nitrogênio foram os dias 8 e 10 para as cepas tN-30 e selvagem,
21 respectivamente. E novamente não se encontrou diferenças estatísticas entre o cultivo com e
22 sem nitrogênio entre ambas as cepas. Por último, as densidades celulares máximas atingidas
23 nessa condição de salinidade foram superiores aos $2 \cdot 10^7$ células/mL para a cepa tN-30,
24 enquanto a cepa selvagem só conseguiu atingir os $1,6 \cdot 10^7$ células/mL (fase estacionária).

25 É claro que a salinidade está tendo uma influência na divisão e densidade celular, sendo
26 esta reduzida conforme aumenta a salinidade. MEHARIYA et al. (2022) avaliaram também o
27 crescimento celular de duas cepas do gênero *Desmodesmus* em diferentes salinidades e em
28 condição de intensidade de luz otimizada. Eles observaram que para ambas as cepas de
29 microalgas a salinidade teve um efeito de redução do crescimento, porém a cepa *Desmodesmus*
30 sp. (RUC-2) apresentou uma alta tolerância a baixas e médias salinidades (2 e 4 g/L). Em
31 comparação, o mutante tN-30 também apresentou uma certa tolerância a salinidade, uma vez
32 que atinge a mesma densidade celular em salinidade 10 g/L do que a cepa selvagem em
33 salinidade de 6,9 g/L.

34



1

2 **Figura 2.** Curvas de crescimento do mutante tN-30 e da cepa selvagem (Wt) de *Desmodesmus*
 3 sp. Petrobras/Furg cultivadas a 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e nas diferentes condições de salinidade: a) 6,9
 4 g/L, b) 10 g/L, c) 15,7 g/L. As linhas contínuas representam crescimento em meio de cultivo
 5 com nitrogênio e as linhas tracejadas representam a ausência de nitrogênio no meio de cultivo.

1 Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos por
2 cada unidade de tempo determinadas por two-way-Anova ($p < 0,05$).

3
4 É interessante como o estresse salino tem um maior efeito na cepa selvagem, que atinge
5 densidades menores do que o mutante tN-30 nas condições de salinidades superiores (10 e 15,7
6 g/L). Ou seja, a cepa tN-30 está tendo uma maior adaptabilidade a salinidade, e é provável que
7 as mutações obtidas mediante irradiação UV (manuscrito 1 sob preparação) não sejam
8 unicamente em genes da síntese de amido, e sim também em outros genes que direta ou
9 indiretamente estejam envolvidos com a homeostase para esse tipo de estresse. Essa melhor
10 adaptabilidade pode se observar também na velocidade de crescimento (divisão celular), pois
11 tN-30, além de atingir maiores densidades celulares quando aumenta a salinidade, também
12 atinge antes a fase estacionária do que a cepa selvagem. Este resultado outorga ao mutante tN-
13 30 uma característica especial, porque normalmente para as microalgas nas condições que
14 aumentam a síntese de moléculas de estoque como os lipídeos neutros, se tem uma redução do
15 crescimento, e isso é devido ao fato de que normalmente os indutores de acumulação de lipídeos
16 são estresses que afetam o crescimento da microalga (XIN *et al.*, 2010; ZARRINMEHR *et al.*,
17 2020). De fato, existem situações nas quais o aumento dos TAGs não afeta o crescimento,
18 porém estas não são comuns (DE JAEGER *et al.*, 2014; SIRIKHACHORNKIT *et al.*, 2016).
19 No caso do presente estudo, o mutante tN-30 além de apresentar um maior conteúdo de lipídeos
20 neutros do que cepa selvagem, também apresenta uma maior e mais rápida dinâmica de
21 crescimento, conferindo uma característica pouco comum e vantajosa para este mutante frente
22 a esse tipo de estresse abiótico.

23

24 **3.4. Produção de biomassa**

25 Diferentes salinidades foram testadas para avaliar o melhor crescimento (biomassa) do
26 mutante tN-30, incluindo o valor otimizado da DCCR obtida em 6,9 g/L, e as salinidades de 10
27 e 15,7 g/L. Como controle, utilizou-se a cepa selvagem de *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg.
28 Os resultados da produção de biomassa são mostrados na Figura 3. Para a salinidade de 6,9 g/L
29 (Figura 3a), observou-se uma maior biomassa do mutante tN-30 sobre a cepa selvagem na
30 presença de nitrogênio, sendo significativamente diferente desde o dia 4 até o último dia do
31 experimento, quando atingiram os valores máximos de 1,743 e 1,303 g/L respectivamente. O
32 nível da biomassa da cepa tN-30 (1,743 g/L) superior ao valor predito pelo modelo (1,6 g/L)
33 valida o nosso modelo para a variável biomassa. Em ausência de nitrogênio, ambas as cepas
34 apresentaram níveis de biomassa superiores e significativamente diferentes em comparação

1 com as condições de cultivo com nitrogênio. tN-30 (-N) apresentou uma biomassa de 2,260 g/L
2 no último dia do experimento (dia 12), enquanto a cepa selvagem (-N) teve valores de 1,743
3 g/L. A restrição de nitrogênio induziu um aumento nos níveis de biomassa da cepa selvagem (-
4 N) até se igualar com a cepa tN-30 (+N), com a qual não houve diferenças estatísticas desde o
5 início da restrição de nitrogênio.

6 Na salinidade de 10 g/L (Figura 3b), em condições de nitrogênio, ambas as cepas
7 apresentaram um crescimento de biomassa semelhante, não havendo diferenças estatísticas
8 entre ambas ao longo do experimento, exceto no dia 4 (fase exponencial de crescimento). O
9 valor máximo de biomassa obtido para as cepas tN-30 (+N) e selvagem (+N) foi de 1,627
10 (novamente a biomassa observada foi igual à predita) e 1,423 g/L, respectivamente. Em
11 ausência de nitrogênio, ambas as cepas aumentaram significativamente seus níveis de biomassa.
12 A cepa tN-30 (-N) atingiu o valor máximo para essa salinidade no dia 12, com 2,203 g/L, sendo
13 estatisticamente superior a todos os outros tratamentos na salinidade de 10. A cepa selvagem (-
14 N) atingiu o valor máximo também no dia 12 de cultivo, com 1,803 g/L; o acréscimo da indução
15 pelo déficit de nitrogênio permitiu a cepa selvagem (-N) atingir valores de biomassa próximos
16 a cepa tN-30 (+N) com a qual não foram encontradas diferenças estatísticas.

17 Surpreendentemente, na condição de salinidade de 15,7 g/L (Figura 3c) e em presença
18 de nitrogênio, não houve diferenças estatísticas entre ambas as cepas ao longo do experimento,
19 atingindo nesse último dia os valores máximos de biomassa de 1,240 e 1,258 g/L para tN-30
20 (+N) e selvagem (+N), respectivamente. Embora o nível de biomassa nessa salinidade é menor
21 do que o valor predito (1.4 g/L), ainda está dentro do intervalo de confiança que prediz o
22 modelo. Em ausência de nitrogênio, o mutante tN-30 (-N) foi estatisticamente superior à cepa
23 selvagem (-N), com valores máximos no dia 12 de 1,750 e 1,465 g/L, respectivamente. Ambas
24 as cepas foram significativamente superior aos tratamentos em presença de nitrogênio.

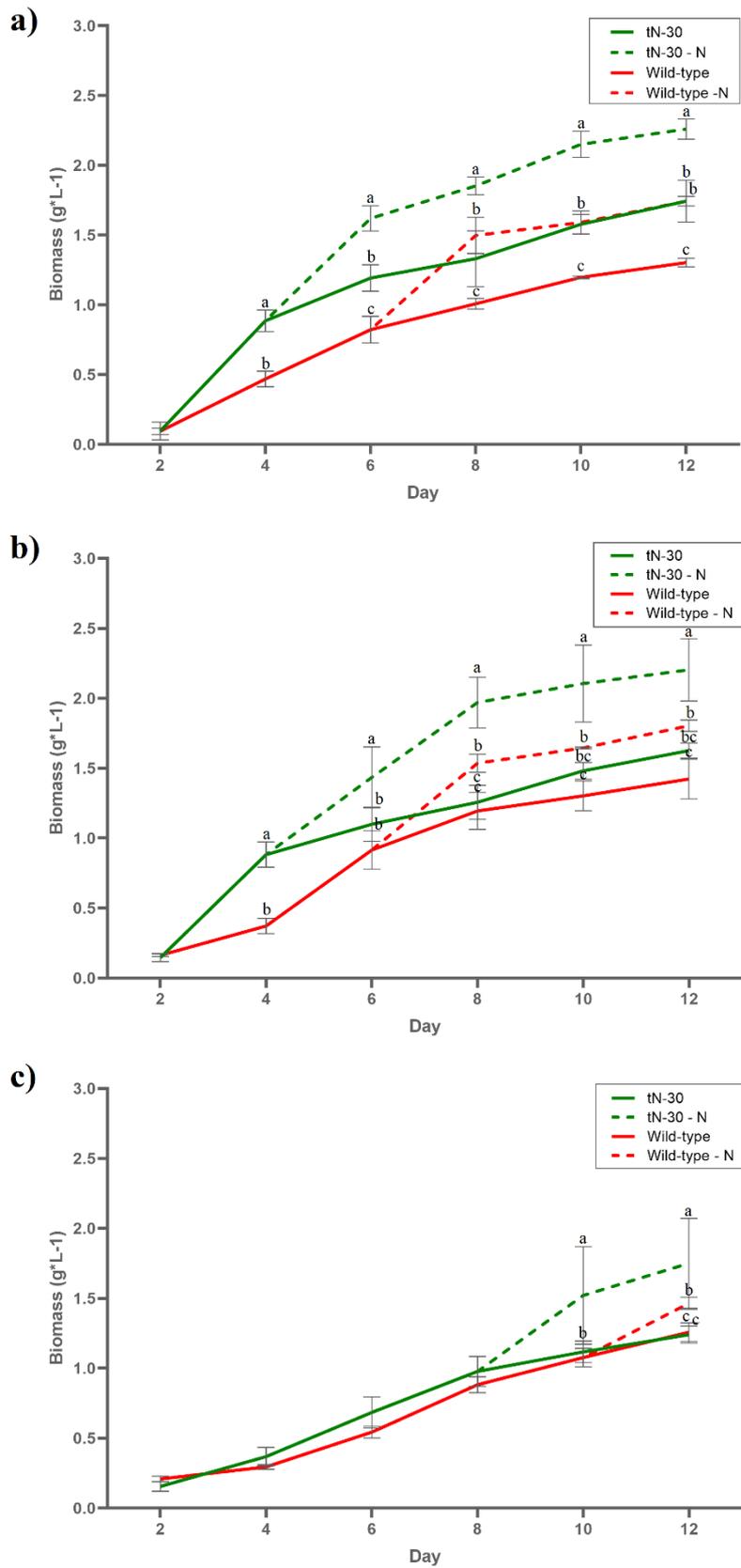
25 Para a cepa tN-30, como a DCCR previu, os melhores valores de biomassa tanto em
26 presença como em ausência de nitrogênio foram na salinidade de 6,9 g/L. A cepa tN-30
27 apresentou um aumento de 34% e 30% em condições de presença e ausência de nitrogênio,
28 respectivamente, comparado com a cepa selvagem. No entanto, para a cepa selvagem, os
29 melhores índices de biomassa foram alcançados na salinidade de 10, onde o aumento de tN-30
30 em comparação com a cepa selvagem foi reduzido para 14% e 22% em presença e ausência de
31 nitrogênio, respectivamente. Finalmente, para a salinidade de 15,7, o aumento da cepa tN-30
32 em ausência de nitrogênio em relação à cepa selvagem foi de 19%. É evidente que salinidade
33 tem um efeito indutor da biomassa até um determinado valor. No caso de tN-30 é 6,9 g/L e para
34 a cepa selvagem é 10 g/L. Em valores de salinidade acima desses, a produção de biomassa tende

1 a diminuir. Dinâmicas semelhantes têm sido relatadas para a *Desmodesmus* sp. WC08, que
2 atingiu os valores mais altos de biomassa na faixa de salinidade de 15 – 20 g/L, a qual foi se
3 reduzindo conforme aumentava a salinidade (ZHAO *et al.*, 2016). MEHARIYA *et al.*, 2022,
4 trabalhando com *Desmodesmus* sp. (RUC-2), também observaram um aumento da biomassa
5 quando a microalga foi submetida a estresse por salinidade (2 g/L), com gradual decaimento
6 em salinidades superiores. Para espécies de outros gêneros têm-se observado o mesmo
7 comportamento. *Chlorella vulgaris* YH703 apresentou um aumento dos níveis de biomassa a
8 1,7 g/L de NaCl, enquanto concentrações mais altas de NaCl tiveram um efeito negativo (YUN
9 *et al.*, 2019).

10 Finalmente, o estresse por déficit de nitrogênio teve um efeito significativo em todos os
11 tratamentos, mostrando acréscimos para ambas as cepas de microalgas em todas as condições
12 de cultivo. Uma das consequências do déficit de nitrogênio nas microalgas é a redução do
13 crescimento (divisão) celular e isso se traduz com uma redução também da biomassa
14 (MALTSEV; KULIKOVSKIY; MALTSEVA, 2023). Porém, nos cultivos de duas fases onde
15 primeiramente se potencializa o crescimento celular, o posterior estresse por déficit de
16 nitrogênio não tem um efeito significativo no crescimento, pois com cultivos com densidades
17 celulares praticamente saturadas a redução do crescimento ou divisão celular é irrelevante.
18 Dessa forma, se potencializa o acúmulo de moléculas de estoque ou de interesse para outras
19 áreas biológicas ou industriais como consequência da privação do nitrogênio. Esse tipo de
20 estratégia é amplamente utilizada para potencializar a síntese de diversos compostos e, ao
21 mesmo tempo, se aumentam os níveis de biomassa. Com vistas ao escalonamento progressivo
22 de cultivos, os níveis de nitrogênio do meio podem ser formulados com ênfase em esgotar-se
23 quando as densidades celulares do cultivo estiverem próximas da fase estacionária de
24 crescimento. Para *Neochloris oleoabundans* HK-129 o sistema de cultivo de duas fases,
25 primeiro com uma concentração maior de nitrogênio e segundo com uma concentração reduzida
26 e alta intensidade luminosa, melhorou significativamente a produção de TAGs e carboidratos
27 (SUN *et al.*, 2014). Este tipo de cultivo é muito utilizado para a obtenção de produtos
28 nutracêuticos como o pigmento astaxantina em *Haematococcus pluvialis*, na qual a redução ou
29 déficit de nitrogênio é um dos principais indutores na segunda fase de cultivo (OSLAN *et al.*,
30 2021; ZHANG, Wen-wen *et al.*, 2018).

31

32



1

2 **Figura 3.** Rendimento da biomassa do mutante tN-30 e da cepa selvagem (Wt) de
 3 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg cultivadas a 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e nas diferentes condições de
 4 salinidade: a) 6,9 g/L, b) 10 g/L, c) 15,7 g/L. As linhas contínuas representam crescimento em

1 meio de cultivo com nitrogênio e as linhas pontilhadas representam a ausência de nitrogênio no
2 meio de cultivo. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre
3 os tratamentos por cada unidade de tempo determinadas por two-way-Anova ($p < 0,05$).

5 **3.5. Produção de lipídeos neutros**

6 Os resultados das análises de Nile Red são mostrados na Figura 4. Para a salinidade de
7 6,9 g/L, o mutante tN-30 mostrou uma maior fluorescência, sendo estatisticamente superior à
8 cepa selvagem desde o dia 3 até o final do cultivo, exceto no dia 6. No último dia (12), a cepa
9 tN-30 (+N) obteve um valor de fluorescência de 7.821 a.u./mL (dentro do intervalo de confiança
10 que prediz o modelo), um aumento de 95% em relação à cepa selvagem (+N), que atingiu uma
11 fluorescência de 4.003 a.u./mL (Figura 4a). A indução por restrição de nitrogênio ocorreu nos
12 dias 5 e 6 para as cepas tN-30 e selvagem, respectivamente, indicando uma melhor adaptação
13 da cepa tN-30 a essa condição de cultivo, atingindo o final da fase exponencial um dia antes do
14 que a cepa selvagem. Em restrição de nitrogênio, observamos que ambas as cepas apresentaram
15 um crescimento significativo em comparação com o cultivo com nitrogênio. A cepa tN-30 (-N)
16 apresentou o valor de fluorescência mais alto (9.242 a.u./mL) no dia 12, significativamente
17 superior ao resto dos tratamentos. Já a cepa selvagem (-N) atingiu 6.879 a.u./mL, um valor
18 similar e sem diferenças estatísticas com a cepa tN-30 (+N). Quando comparamos as
19 produtividades das cepas, observamos claramente o melhor desenvolvimento da cepa tN-30,
20 significativamente superior à cepa controle tanto na presença como na ausência de nitrogênio.
21 Especificamente, a cepa tN-30 (-N) obteve os melhores valores de produtividade de
22 fluorescência, atingindo o valor máximo no dia 6 de cultivo com uma produtividade de 976.667
23 a.u./L/d. Para a cepa selvagem, o melhor valor de produtividade foi alcançado no dia 7, em
24 ausência de nitrogênio, com 720.000 a.u./L/d (Figura 4b).

25 Para a salinidade de 10 g/L, observou-se um comportamento semelhante à salinidade de
26 6,9 g/L. Na presença de nitrogênio, a cepa tN-30 (+N) foi significativamente superior à cepa
27 selvagem (+N) desde o dia 3 até o dia 12, exceto nos dias 6 e 7, onde as análises estatísticas
28 não revelaram diferenças significativas entre ambas as cepas. No último dia de cultivo, a cepa
29 tN-30 (+N) atingiu um valor máximo de fluorescência de 8.593 a.u./mL, e a cepa selvagem
30 (+N) de 5.888 a.u./mL, respectivamente (Figura 4c). Nessas condições, a cepa tN-30 validou
31 novamente o valor predito pelo modelo (8255 a.u./mL). A cepa tN-30 novamente alcançou o
32 final da fase exponencial um dia antes da cepa selvagem (dia 5 e 6, respectivamente),
33 apresentando uma velocidade de crescimento maior. Em deficiência de nitrogênio, ambas as
34 cepas apresentaram um aumento significativo da fluorescência, sendo a cepa tN-30 (-N) quem

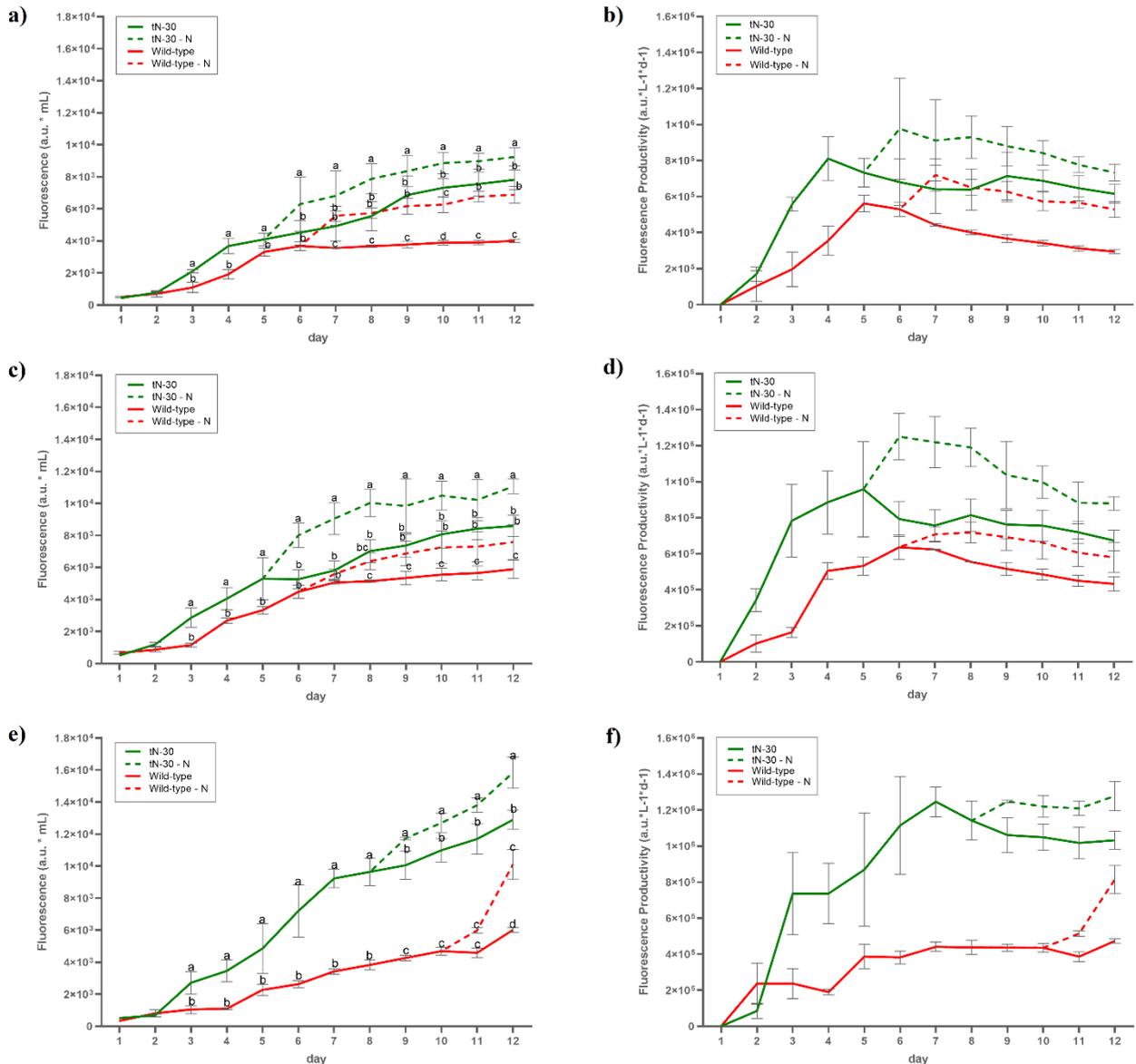
1 atingiu o valor máximo de fluorescência com 11.064 a.u./mL, enquanto a cepa selvagem (-N)
2 em ausência de nitrogênio obteve um valor máximo de 7.588 a.u./mL. Os valores de
3 produtividade foram estatisticamente diferentes entre todas as condições de cultivo, sendo as
4 melhores produtividades da cepa tN-30, que em ausência de nitrogênio atingiu o valor máximo
5 de 1.250.139 a.u./L/d no dia 6 de cultivo. Para a cepa selvagem, a produtividade máxima
6 atingida foi 2 dias depois (dia 8), e também em ausência de nitrogênio, com 719.063 a.u./L/d
7 (Figura 4d).

8 Para a salinidade de 15,7 g/L, novamente observou-se uma maior fluorescência por parte
9 da cepa tN-30 (+N) sobre a cepa selvagem (+N) com valores máximos de 12.897 a.u./mL e
10 6.015 a.u./mL respectivamente no dia 12 de cultivo. Nessas condições, novamente a cepa tN-
11 30 validou o valor predito pelo modelo (10836 a.u./mL). Observou-se, também, que para ambas
12 as cepas uma maior salinidade teve um efeito negativo na velocidade de crescimento, sendo
13 que a cepa tN-30 atingiu o final da fase exponencial no dia 8 de cultivo e a cepa selvagem no
14 dia 10. Em ausência de nitrogênio, ambas as cepas alcançaram seu valor máximo de
15 fluorescência no último dia de cultivo, com 15.844 a.u./mL para a cepa tN-30 (-N) e 10113
16 a.u./mL para a cepa selvagem (-N), obtendo diferenças significativas entre ambas as cepas e
17 entre todas as condições de presença/ausência de nitrogênio (Figura 4e). Quando olhamos para
18 produtividade, observamos um padrão semelhante à fluorescência (a.u./mL), obtendo
19 diferenças significativas entre todos os tratamentos, sendo em ordem de maior a menor
20 produtividade tN-30 (-N): 1.247.496 a.u./L/d, tN-30 (+N): 1.246.367 a.u./L/d, selvagem (-N):
21 814.861 a.u./L/d e selvagem (+N): 473.333 a.u./L/d. Embora o valor máximo conseguido para
22 a salinidade de 15,7 g/L seja da cepa tN-30 (-N) no dia 9 de cultivo, no dia 7 e em presença de
23 nitrogênio, obteve-se um valor de produtividade parecido (1.246.367 a.u./mL) pela mesma cepa
24 (Figura 4f).

25 Em termos gerais, a cepa tN-30 apresentou maiores níveis de lipídeos neutros do que a
26 cepa selvagens em todas as condições de salinidade, tanto em ausência como em presença de
27 nitrogênio. Na presença de nitrogênio, a cepa tN-30 (+N) mostrou valores que, para algumas
28 condições, rondam o dobro da cepa selvagem, com acréscimos de 95%, 46% e 114% para as
29 salinidades de 6,9, 10 e 15,7 g/L, respectivamente. Cabe destacar que, conforme aumenta a
30 salinidade, também aumenta a quantidade de fluorescência para ambas as cepas. O aumento da
31 síntese de lipídeos neutros devido ao aumento da salinidade é conhecido nas microalgas como
32 um ajuste metabólico que implica não só a síntese de ácidos de cargas negativas (ácidos graxos),
33 se não também todo um ajuste das substâncias de reserva e do fluxo dos canais iônicos, além de
34 outros processos com o objetivo de manter a homeostase celular ante o estresse salino (ARORA

1 *et al.*, 2019). O acréscimo dos lipídeos neutros devido ao aumento da salinidade tem se
2 documentado em microalgas como por exemplo *Nannochloropsis oceanica* e *Scenedesmus*
3 *obliquus* BHU1 (PAL *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2023). Em deficiência de nitrogênio, a cepa
4 tN-30 (-N) continua mostrando uma superioridade na hora de estocar lipídeos neutros, como
5 indicam seus níveis superiores de fluorescência em relação à cepa selvagem (-N). No entanto,
6 nessas condições, os acréscimos reduziram-se para valores de 34% e 57% para as condições de
7 6,9 e 15,7 g/L, respectivamente, enquanto o acréscimo na condição de salinidade 10 g/L se
8 manteve novamente em 46%.

9 Quando analisamos a produtividade da fluorescência dos lipídeos neutros, observamos
10 que o maior valor foi para a cepa tN-30 na salinidade 10 g/L em condições de restrição de
11 nitrogênio (1.250.139 a.u./L/d), que, embora não consiga estocar tanta quantidade de lipídeos
12 como na salinidade de 15,7 g/L, o rápido crescimento comparado com essa salinidade
13 compensa, obtendo uma produtividade similar e em menos tempo (6 dias). Essa melhor
14 produtividade foi 74% maior do que a produtividade de fluorescência da cepa selvagem.
15 BOUGARAM *et al.* (2012) obtiveram resultados parecidos para os mutantes de *Isochrysis*
16 *affinis galbana* clon Tahiti (T-Iso) obtidos também por exposição da microalga a irradiação
17 com luz UV que resultou também em um acréscimo da produtividade de lipídeos neutros de
18 80% comparado com o cultivo controle.



1

2 **Figura 4.** Rendimento da fluorescência de lipídeos neutros e a produtividade da fluorescência
 3 dos lipídeos neutros do mutante tN-30 e da cepa selvagem (Wt) de *Desmodesmus* sp.
 4 Petrobras/Furg cultivadas a 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e nas diferentes condições de salinidade. Gráficos
 5 de Fluorescência: a) 6,9 g/L, c) 10 g/L, e) 15,7 g/L. Gráficos da produtividade: b) 6,9 g/L, d)
 6 10 g/L, f) 15,7 g/L. As linhas contínuas representam crescimento em meio de cultivo com
 7 nitrogênio e as linhas pontilhadas representam a ausência de nitrogênio no meio de cultivo.
 8 Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos por
 9 cada unidade de tempo determinadas por two-way-Anova ($p < 0,05$).

10

11 3.6. Composição proximal

12 O conteúdo bioquímico (lipídeos, carboidratos e proteínas) de *Desmodesmus* tN-30 e a
 13 cepa selvagem sofreu variações com as diferentes salinidades testadas e com a intensidade de

1 luz. Sabe-se que, em geral, as microalgas acumulam lipídeos como resposta ao estresse salino
2 e armazenam esses compostos de alto valor energético até conseguir voltar a uma situação
3 ambiental favorável onde serão utilizados como fonte de energia (SHETTY; GITAU e
4 MARÓTI, 2019). Na Figura 5 podemos observar que, para os lipídeos totais, a cepa tN-30
5 apresentou uma maior porcentagem do que a cepa selvagem em todas as condições de
6 salinidade, tanto em presença como em ausência de nitrogênio. Os valores máximos foram
7 observados para a salinidade de 10, com porcentagens de 36% e 41% em presença e ausência
8 de nitrogênio, respectivamente. Para a salinidade de 6,9 g/L, foram 34% e 37%, enquanto para
9 a salinidade de 15,7 g/L foram 28% e 36%, respectivamente. Comparadas com a cepa selvagem,
10 na melhor condição de salinidade 10 em ausência de nitrogênio, a cepa tN-30 teve aumento de
11 35% de lipídeos totais. *Desmodesmus* sp. (6-2) e *Desmodesmus* sp. (RUC-2) apresentaram
12 também as maiores porcentagens de lipídeos com 32,5% e 43,3% respectivamente, numa
13 salinidade intermediária (8 g/L) e posteriormente a uma salinidade maior ambas as cepas
14 apresentaram uma redução das porcentagens de lipídeos totais (MEHARIYA *et al.*, 2022).
15 Esses dados indicam que um estresse moderado pode favorecer a sínteses de lipídeos, porém
16 um estresse excessivo (salinidade maior) pode terminar reduzindo as porcentagens de lipídeos
17 totais. É conhecido que o excesso de íons Na⁺ no meio pode danificar o aparato fotossintético
18 ao provocar o desligamento da proteína PsbP do fotosistema II devido à diminuição da taxa de
19 troca de elétrons provocada pelo excesso de íons de Na⁺ (SRIVASTAVA; NISHCHAL;
20 GOUD, 2017). *Desmodesmus* sp. GS12 também apresentou um incremento da porcentagens de
21 lipídeos totais quando foi submetida na condição de estresse de salinidade (SRIVASTAVA;
22 NISHCHAL; GOUD, 2017). Outro estudo mostrou que a microalga *Scenedesmus* sp. BHU1
23 incrementa os níveis de lipídeos com o aumento do estresse salino (SINGH *et al.*, 2023).

24 Os carboidratos são utilizados como osmoprotetores em condições de estresse salino
25 para manter a homeostase celular (TIETEL *et al.*, 2020). Em relação aos níveis de carboidratos,
26 observamos diferentes situações. Nas salinidades de 10 e 15,7 g/L, a cepa selvagem obteve os
27 maiores valores, em alguns casos com diferenças estatísticas (Figura 5). Especificamente na
28 salinidade 10, a cepa selvagem (+N) obteve 33%, significativamente superior aos 29% e 28%
29 da cepa tN-30 em presença e ausência de nitrogênio, respectivamente (Figura 5b). Na salinidade
30 de 15,7 g/L, a cepa selvagem (-N) atingiu a porcentagem máxima de carboidratos para essa
31 salinidade, com 40%, estatisticamente superior aos 31% da cepa tN-30 (+N), enquanto a cepa
32 tN-30 (-N) e a cepa selvagem (+N) mostraram porcentagens de 34% e 35%, respectivamente,
33 sem diferenças significativas com nenhum dos tratamentos (Figura 5c). Na salinidade de 6,9
34 g/L, embora a cepa selvagem tenha apresentado os maiores valores de carboidratos, com 39%

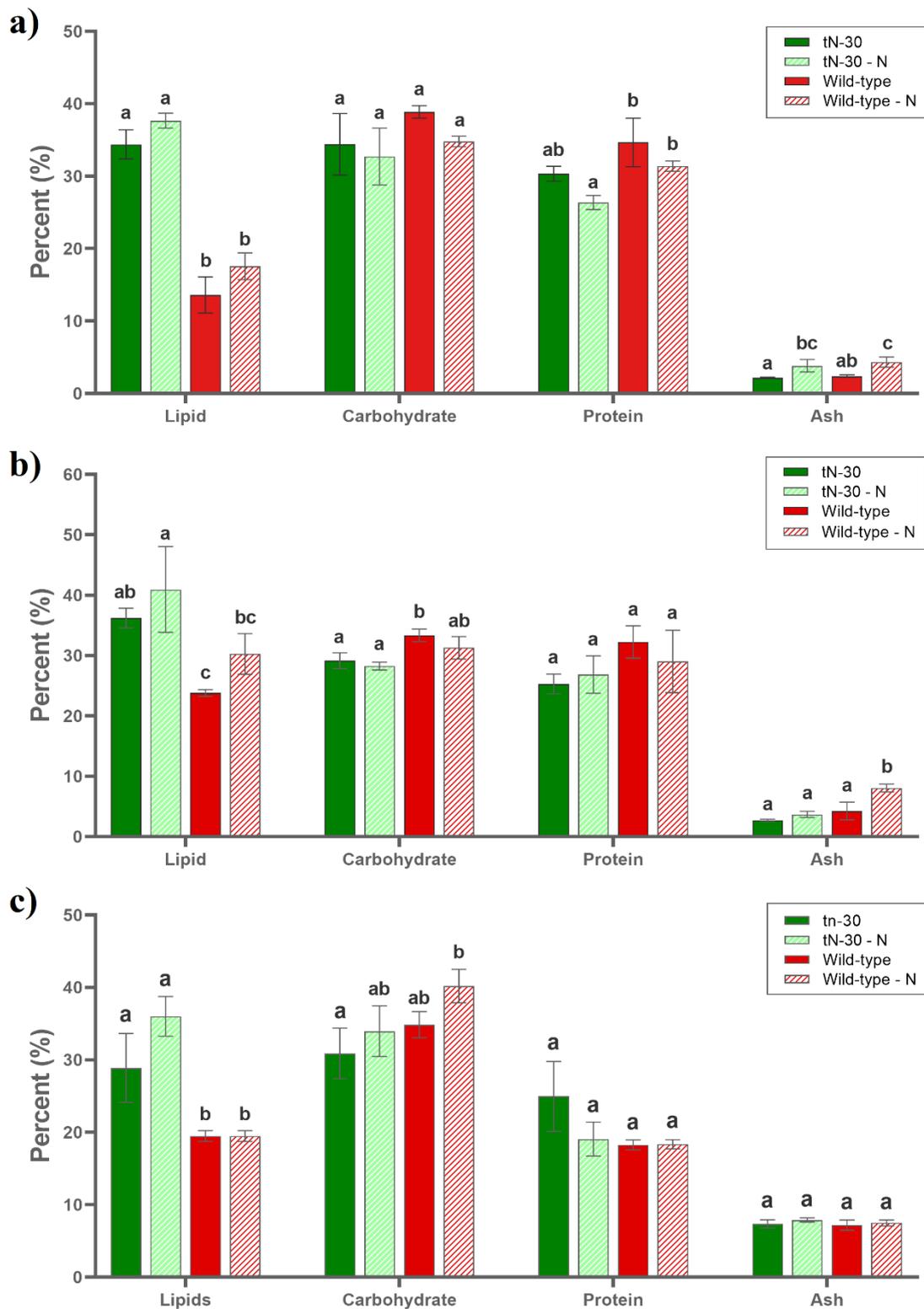
1 e 35% em presença e ausência de nitrogênio, respectivamente, não houve diferenças
2 significativas com a cepa tN-30, que obteve as porcentagens de 34% e 33% em condições de
3 presença e ausência de nitrogênio (Figura 5a). Para todas as condições de salinidade a cepa tN-
4 30 apresentou menor teor de carboidratos do que a cepa selvagem, tanto em presença como em
5 ausência de nitrogênio, comprovando novamente o fluxo de carbono desde os carboidratos a
6 favor dos TAGs, devido às mutações provavelmente ocasionadas em genes relacionados com a
7 síntese de amido (manuscrito 1 sob preparação). Também foi observado que, em geral, o
8 aumento moderado da salinidade provoca uma redução das porcentagens de carboidratos, e isto
9 foi observado quando comparamos a evolução de todas as cepas nas salinidades de 6,9
10 e 10 g/L. Porém, quando o mudamos para um estresse salino maior (salinidade 15,7 g/L)
11 porcentagens de carboidratos totais aumentam novamente. Este comportamento dinâmico é
12 inversamente proporcional ao observado para os lipídeos totais que comprova uma vez mais o
13 fluxo competitivo entre a síntese de lipídeos e a síntese de carboidratos, especificamente a inter-
14 relação entre amido e TAGs. BOUSSIBA e VONSHAK (1991) observaram que o cultivo
15 *Haematococcus pluvialis*, com 0,8% de NaCl, aumentou o índice de carboidratos totais até 45%
16 da biomassa total comparado com a situação controle (sem adição de NaCl), a qual apresentou
17 39% de carboidratos. Da mesma forma, para *Dunaliella salina*, o aumento da salinidade no
18 cultivo (desde 0,5 até 5,5 M de NaCl) aumentou significativamente o teor de carboidratos totais,
19 atingindo uma concentração de ($250\mu\text{g}/10^5$ células) (MISHRA; MANDOLI; JHA, 2008).

20 Para os níveis de proteínas, foi observado que para todas as condições experimentais as
21 porcentagens de proteínas totais diminuem conforme aumenta a salinidade. As maiores
22 porcentagens de proteínas totais foram para a cepa selvagem na salinidade 6,9 g/L, tanto em
23 presença como ausência de nitrogênio (35% e 31%, respectivamente), e foram
24 significativamente maiores em comparação com a cepa tN-30 em condições de restrição de
25 nitrogênio (26%), a cepa tN-30 (+N) teve um 30% sem diferenças estatísticas (Figura 5). Nas
26 salinidades de 10 e 15,7 g/L, não houve diferenças estatísticas entre nenhuma das cepas e
27 nenhuma das condições de presença/ausência de nitrogênio, e só foi observado um decréscimo
28 dos níveis de proteínas ao aumentar a concentração de salinidade, como enunciado
29 anteriormente (Figuras 5b e 5c). No manuscrito 1 (sob preparação), o cultivo da cepa tN-30 em
30 salinidade 10 g/L e $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidade luminosa mostrou um aumento significativo
31 no conteúdo proteico em comparação com a cepa selvagem, determinando que as mutações
32 adquiridas por parte da cepa tN-30 não só redirecionavam o fluxo de carbono a favor dos
33 lipídeos, mas também em favor das proteínas. Porém, na condição de $693\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de
34 intensidade luminosa não foi observado o mesmo resultado em nenhuma das condições de

1 salinidade testadas e, inclusive, na condição de 6,9 g/L, a cepa tN-30 apresentou uma
2 porcentagem de proteínas estatisticamente menor do que a cepa controle em ausência de
3 nitrogênio. Entretanto, é preciso deixar claro que essa porcentagem menor por parte da cepa
4 tN-30 é devida ao acréscimo do estoque de lipídeos neutros e totais que reduzem a porcentagem
5 de proteínas no cômputo total da composição proximal. Diante desses resultados, não podemos
6 concluir ou corroborar que as mutações adquiridas por parte da cepa tN-30 redirecionam o
7 carbono orgânico assimilado a favor da síntese de proteínas. O efeito negativo da salinidade
8 sobre os níveis de proteínas tem sido observado em outras espécies de microalgas. Para
9 *Chlorella vulgaris*, o estresse salino provocou um decréscimo proporcional dos níveis de
10 proteínas totais ao aumento da salinidade, tanto em presença ou ausência de bicarbonato (
11 ADAV; GUPTA; SINGH, 2022). Por outro lado, o efeito contrário foi observado em
12 *Pterocladia capillacea*, a qual aumentou a concentração de aminoácidos totais em resposta
13 ao estresse salino (SCHMIDT *et al.*, 2016).

14 Finalmente, os níveis de cinzas foram diferentes para ambas as cepas nas diferentes
15 condições estudadas. Na salinidade de 6,9 g/L, ambas as cepas mostraram diferenças
16 significativas quando comparadas entre si em presença e ausência de nitrogênio. Em presença
17 de nitrogênio, as cepas tN-30 e selvagem apresentaram um teor de cinzas de 2,1% e 2,4%, sem
18 diferenças estatísticas entre elas. Em ausência de nitrogênio, esses valores foram de 3,8% e
19 4,3%, respectivamente. Na salinidade de 10, os teores da cepa tN-30 (+N), tN-30 (-N) e
20 selvagem (N+) não apresentaram diferenças significativas. No entanto, a cepa selvagem (-N)
21 apresentou os teores de cinzas mais altos (8,1%), sendo significativamente superior ao resto dos
22 tratamentos nessa salinidade. Finalmente, para a salinidade de 15,7 g/L, apresentaram-se os
23 maiores níveis de cinzas. Para a cepa tN-30, em presença e ausência de nitrogênio, foram de
24 7,4% e 7,9%, respectivamente, e para a cepa selvagem, de 7,2% e 7,5%. Não foram encontradas
25 diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos. O teor de cinza contém as quantidades
26 totais de minerais que tem as microalgas e nos dão a informação da riqueza mineral na qual as
27 microalgas foram desenvolvidas. Os minerais que contém as cinzas de microalgas podem ser
28 utilizados como suplemento alimentar para animais de consumo como frangos, aportando
29 nutrientes como Ca, K, Mg, Na, P e S (COSTA; SPÍNOLA; PRATES, 2024).

30
31
32



1
 2 **Figura 5.** Composição proximal (lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas totais) do mutante
 3 tN-30 e da cepa selvagem (Wt) de *Desmodemus* sp. Petrobras/Furg cultivadas a 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
 4 e nas diferentes condições de salinidade: a) 6,9 g/L, b) 10 g/L, c) 15,7 g/L. Letras diferentes
 5 representam diferenças estatisticamente significativas determinadas por one-way-Anova ($p <$
 6 0,05).

1 3.7. Perfil de ácidos graxos

2 Em geral, ácidos graxos podem apresentar nenhuma, uma ou mais de uma instauração,
3 sendo denominados como ácidos graxos saturados (SFA), ácido graxo monoinsaturado
4 (MUFA) e ácido graxo poliinsaturado (PUFA), respectivamente. À vista dos resultados obtidos,
5 podemos comprovar que ambos os estresses (salinidade e supressão de nitrogênio) induzem a
6 produção de SFAs e MUFAs em contraposição dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), em
7 ambas as cepas (Tabela 2). Observamos que a salinidade induziu a síntese dos SFAs e MUFAs,
8 os ácidos graxos mas desejados para a formação de biodiesel, e reduziu os PUFAs, os menos
9 aptos. Ácidos graxos saturados são ideais para gerar biodiesel de qualidade, preferindo-se o
10 ácido palmítico (C16:0), pois uma alta porcentagem de SFAs favorece uma melhor viscosidade
11 (propriedades de fluxo) e a aplicabilidade do biodiesel em baixas temperaturas. Por outro lado,
12 os MUFAs são também importantes para obter um biodiesel de qualidade devido ao aumento
13 da estabilidade oxidativa em condições de frio (MANDOTRA *et al.*, 2014; RUGNINI, L. *et al.*,
14 2018). Já os PUFAs são normalmente desconsiderados devido a que apresentam sítios reativos
15 que apresentam certa sensibilidade a ataques nos seus radicais livres, o que afeta a estabilidade
16 oxidativa do biodiesel, diminuindo a sua qualidade (PEREIRA *et al.*, 2013).

17 Para ambas as cepas, na presença de nitrogênio, os valores mais altos de SFAs e MUFAs
18 foram na maior salinidade testada (15,7 g/L), com porcentagens de SFAs = 30,85% e MUFAs
19 = 41,52% para a cepa tN-30. Nesta mesma condição, a cepa selvagem produziu SFAs = 29,38%
20 e MUFAs = 41,34%. Para as cepas tN-30 e selvagem na presença de nitrogênio, os maiores
21 níveis de SFAs foram do ácido palmítico (C16:0) com 27,38% e 25,57%, respectivamente.
22 Quando observamos os MUFAs na maior salinidade, a maior representação foi do ácido oleico
23 (C18:1) com porcentagens de 37,26% para tN-30 e 35,14% para a cepa selvagem. Opostamente,
24 os PUFAs foram menores na salinidade 15,7 g/L e atingiram as maiores porcentagens nas
25 salinidades menores. Para a cepa tN-30 foi na salinidade 6,9 g/L com uma porcentagem de
26 37,05% e para a cepa selvagem foi na salinidade 10 g/L com 46,37%. Do mesmo modo do que
27 para as cepas tN-30 e selvagem, as cepas *Desmodesmus* sp. (2-6) e *Desmodesmus* sp. (RUC-2)
28 também tiveram o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1) como os ácido graxos mais
29 significativos (MEHARIYA *et al.*, 2022).

30

31

32 **Tabela 2.** Perfil de ácidos graxos do mutante tN-30 e da cepa selvagem (Wt) de *Desmodesmus*
33 sp. Petrobras/Furg cultivadas a 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, nas diferentes condições de salinidade (6,9, 10,
34 e 15,7 g/L), e na presença e ausência de nitrogênio.

	Salinidade 6,9 g/L				Salinidade 10 g/L				Salinidade 15,7 g/L			
	tN-30		Wild-type		tN-30		Wild-type		tN-30		Wild-type	
	(+N)	(-N)	(+N)	(-N)	(+N)	(-N)	(+N)	(-N)	(+N)	(-N)	(+N)	(-N)
C14:0	0,19	0,22	0,29	0,27	0,19	0,25	0,27	0,28	0,24	0,35	0,24	0,25
C15:0	0,07	0,06	0,18	0,08	0,05	-	0,13	0,08	0,12	-	0,09	0,06
C16:0	23,76	28,40	21,98	28,15	23,12	31,96	22,04	26,22	27,38	29,31	25,57	28,68
C16:1n7	1,16	0,44	1,53	0,19	0,73	-	2,33	0,79	0,54	0,24	0,52	0,19
C16:1n9t	5,22	5,56	3,34	4,14	5,79	4,69	3,14	4,80	3,36	3,93	5,00	4,73
C16:1n14t	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:2n6	1,12	1,06	1,25	1,21	1,22	0,81	0,88	1,78	0,67	1,19	1,13	1,38
C16:3n6	-	-	0,55	0,16	-	-	-	0,41	0,49	-	0,51	0,30
C16:4n3	10,11	5,07	10,91	4,17	10,27	3,36	16,32	7,17	5,20	3,97	6,83	3,91
C17:0	-	-	0,19	0,19	0,17	-	-	0,14	0,16	0,15	0,16	0,12
C17:1n7	-	-	0,21	0,19	0,13	-	-	-	0,17	0,09	0,22	-
C18:0	1,64	2,43	2,16	3,69	1,73	2,22	1,58	3,92	2,50	2,84	2,48	2,85
C18:0-OH	0,12	0,12	0,10	-	0,24	-	0,29	0,20	-	-	0,16	0,08
C18:1n9c	30,25	39,49	21,12	33,11	31,51	42,31	21,64	31,59	37,26	42,66	35,14	38,08
C18:2n6c	12,50	10,29	14,52	13,88	11,94	8,45	10,15	15,30	9,44	9,18	11,21	10,49
C18:3n3	9,38	4,53	16,27	7,31	9,13	4,44	16,35	3,71	10,40	4,94	7,61	6,48
C18:3n6	1,30	0,53	0,74	0,47	1,05	0,27	0,96	0,56	0,31	0,16	0,38	0,25
C18:4n3	2,64	1,26	2,13	1,14	2,24	0,85	3,32	1,46	1,13	0,63	1,61	0,92
C20:0	0,09	0,13	0,13	0,32	0,10	0,11	-	0,25	0,08	0,12	0,14	0,16
C20:1n9	0,20	0,32	0,19	0,52	0,19	0,28	-	0,46	0,19	0,15	0,46	0,48
C22:0	0,24	0,09	0,73	0,30	0,23	-	0,59	0,37	0,20	0,09	0,24	0,16
C24:0	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C26:0	-	-	0,38	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-
C28:0	-	-	0,54	0,53	-	-	-	0,42	0,17	-	0,30	0,43
ΣSFA	26,11	31,45	26,89	33,53	25,83	34,54	24,90	31,97	30,85	32,86	29,38	32,79
ΣMUFA	36,83	45,81	26,74	38,15	38,35	47,28	27,11	37,64	41,52	47,07	41,34	43,48
ΣPUFA	37,05	22,74	46,37	28,34	35,85	18,18	47,98	30,39	27,64	20,07	29,28	23,73

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

O estresse por déficit de nitrogênio aumentou os níveis de SFAs e MUFAs em todas as condições testadas e para ambas as cepas de microalgas. Para a cepa selvagem, as maiores porcentagens de SFAs e MUFAs em condições de déficit de nitrogênio foram na salinidade maior (15,7 g/L), com valores do 32,79% 43,48%, respectivamente. Surpreendentemente, as porcentagens mais altas de SFAs e MUFAs para a cepa tN-30 em condições de déficit de nitrogênio não foram na salinidade maior, mas sim na salinidade 10 g/L com porcentagens de 34,54% e 47,28%, respectivamente. Porém, é preciso destacar que essas porcentagens são levemente superiores a salinidade 15,7 g/L. Para ambas as cepas, novamente os ácidos graxos mais representativos de SFAs e MUFAs em déficit de nitrogênio foram o ácido palmítico (C16:0) com 31,96% e 28,68 para as cepas tN-30 e selvagem, respectivamente, e o ácido oleico (C18:1) com 42,31% e 38,08%, respectivamente. O acréscimo de MUFAs por déficit de nitrogênio tem sido relatado em outras microalgas como *Scenedesmus rubescense* que em déficit de nitrogênio apresentou um incremento do ácido oleico (C18:1) de 430% (Li; LIN, 2012). Finalmente, quanto às porcentagens de PUFA em déficit de nitrogênio, os valores mais altos foram para a cepa selvagem na salinidade 10 g/L com 30,39%, e o mais baixo foi para a

1 cepa tN-30, nessa mesma salinidade. Um perfil de resposta similar foi observado para
2 *Scenedesmus obliquus* e *Desmodesmus abundans*, cujo perfil de ácidos graxos também
3 experimentou um aumento dos SFAs e MUFAs em condições de déficit de nitrogênio, quando
4 comparados na presença de nitrogênio no meio de cultivo. Observou-se, também, o efeito
5 contrário para os níveis de PUFAs que, para ambas as cepas, foi maior em presença de
6 nitrogênio do que na ausência, e para ambas as cepas o ácido graxo mais representativo foi o
7 ácido palmítico (16:0) (RUGNINI *et al.*, 2020).

8

9 **4. CONCLUSÕES**

10 Utilizou-se a CCD para determinar a influência ou efeito do estresse de salinidade e da
11 intensidade de luz e, posteriormente, se validou as condição ótimas de ambos os parâmetros
12 (salinidade 10 g/L e 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) para otimizar a produção de lipídeos neutros no cultivo da
13 cepa mutante tN-30, a qual foi obtida a partir de mutação aleatória por irradiação com luz UV
14 na cepa *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras. Ao mesmo tempo, testou-se o efeito do estresse
15 por déficit de nitrogênio mediante cultivo em duas fases, resultado que aprimorou ainda mais a
16 produção de lipídeos neutros sensíveis a conversão de biodiesel (em déficit de nitrogênio).
17 Finalmente, pela primeira vez, foi avaliado e descrito o perfil de ácidos graxos das cepas tN-30
18 e selvagem da microalga *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras, que mostrou um perfil de ácidos
19 graxos com maiores taxas de SFAs e MUFAs e representações de C16:0 e 18:1 sensíveis a
20 conversão de biodiesel de melhor qualidade do que a cepa original.

21

22

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2
3 ABOMOHRRA, Abd El-Fatah; EL-SHEEKH, Mostafa; HANELT, Dieter. Screening of marine
4 microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock. **Renewable**
5 **Energy**, vol. 101, p. 1266–1272, Feb. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.10.015>.

6
7 ALISHAH ARATBONI, Hossein; RAFIEI, Nahid; GARCIA-GRANADOS, Raul;
8 ALEMZADEH, Abbas; MORONES-RAMÍREZ, José Rubén. Biomass and lipid induction
9 strategies in microalgae for biofuel production and other applications. **Microbial Cell**
10 **Factories**, vol. 18, no. 1, p. 178, 21 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>.

11
12 ANANTHI, V.; PUGAZHENDHI, Arivalagan; ARUN, Alagarsamy. Efficacy of chemical
13 factors on production and extraction of biodiesel by microalgae. **International Journal of**
14 **Energy Research**, vol. 45, no. 12, p. 17080–17093, 10 Oct. 2021.
15 <https://doi.org/10.1002/er.6097>.

16
17 ARORA, Neha; KUMARI, Poonam; KUMAR, Amit; GANGWAR, Rashmi; GULATI,
18 Khushboo; PRUTHI, Parul A.; PRASAD, Ramasare; KUMAR, Dinesh; PRUTHI, Vikas;
19 POLURI, Krishna Mohan. Delineating the molecular responses of a halotolerant microalga
20 using integrated omics approach to identify genetic engineering targets for enhanced TAG
21 production. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 12, no. 1, p. 2, 4 Dec. 2019.
22 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1343-1>.

23
24 BARTLEY, Meridith L.; BOEING, Wiebke J.; CORCORAN, Alina A.; HOLGUIN, F. Omar;
25 SCHAUB, Tanner. Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga
26 *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Biomass and Bioenergy**, vol. 54, p. 83–88,
27 Jul. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.026>.

28
29 BOUGARAN, Gaël; ROUXEL, Catherine; DUBOIS, Nolwenn; KAAS, Raymond; GROUAS,
30 Sophie; LUKOMSKA, Ewa; LE COZ, Jean-René; CADORET, Jean-Paul. Enhancement of
31 neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-
32 selection procedure. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 109, no. 11, p. 2737–2745, 4
33 Nov. 2012. <https://doi.org/10.1002/bit.24560>.

1
2 BOUSSIBA, Sammy; VONSHAK, Avigad. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga
3 *Haematococcus pluvialis*1. **Plant and Cell Physiology**, vol. 32, no. 7, p. 1077–1082, Oct. 1991.
4 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>.
5
6 HEN, Wei; ZHANG, Chengwu; SONG, Lirong; SOMMERFELD, Milton; HU, Qiang. A high
7 throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae.
8 **Journal of microbiological methods**, vol. 77, no. 1, p. 41–7, Apr. 2009.
9 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>.
10
11 CHOKSHI, Kaumeel; PANCHA, Imran; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Salinity induced
12 oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green
13 microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, vol. 244, p. 1376–1383, Nov.
14 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.003>.
15
16 CHU, Feifei; CHENG, Jun; LI, Ke; WANG, Yangang; LI, Xi; YANG, Weijuan. Enhanced
17 Lipid Accumulation through a Regulated Metabolic Pathway of Phosphorus Luxury Uptake in
18 the Microalga *Chlorella vulgaris* under Nitrogen Starvation and Phosphorus Repletion. **ACS**
19 **Sustainable Chemistry & Engineering**, vol. 8, no. 22, p. 8137–8147, 8 Jun. 2020.
20 <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07447>.
21
22 COSTA, Mónica M.; SPÍNOLA, Maria P.; PRATES, José A. M. Microalgae as an Alternative
23 Mineral Source in Poultry Nutrition. **Veterinary Sciences**, vol. 11, no. 1, p. 44, 20 Jan. 2024.
24 <https://doi.org/10.3390/vetsci11010044>.
25
26 DE JAEGER, Lenny; VERBEEK, Ruben EM; DRAAISMA, René B; MARTENS, Dirk E;
27 SPRINGER, Jan; EGGINK, Gerrit; WIJFFELS, René H. Superior triacylglycerol (TAG)
28 accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and
29 characterization. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 7, no. 1, p. 69, 2014.
30 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-69>.
31
32 DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred.
33 Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical**
34 **Chemistry**, vol. 28, no. 3, p. 350–356, 1 Mar. 1956. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

1
2 GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the
3 photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. **Proceedings of the**
4 **National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 54, no. 6, 1965.
5 <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>.
6
7 HARIS, Noorazilah; MANAN, Hidayah; JUSOH, Malinna; KHATOON, Helena;
8 KATAYAMA, Tomoyo; KASAN, Nor Azman. Effect of different salinity on the growth
9 performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species.
10 **Aquaculture Reports**, vol. 22, p. 100925, Feb. 2022.
11 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100925>.
12
13 HARTMAN, L; LAGO, R C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids.
14 **Laboratory practice**, vol. 22, no. 6, p. 475–6 passim, Jul. 1973. .
15
16 HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. A. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of
17 Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. **Journal of the**
18 **Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 51, no. 3, p. 659–668, 11 Aug.
19 1971. <https://doi.org/10.1017/S0025315400015034>.
20
21 JI, Xiang; CHENG, Jie; GONG, Donghui; ZHAO, Xiujuan; QI, Yun; SU, Yongning; MA,
22 Wenchao. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in
23 freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. **Science of The Total Environment**,
24 vol. 633, p. 593–599, Aug. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>.
25
26 KAWAMURA, Koji; NISHIKAWA, Suzune; HIRANO, Kotaro; ARDIANOR, Ardianor;
27 NUGROHO, Rudy Agung; OKADA, Shigeru. Large-scale screening of natural genetic
28 resource in the hydrocarbon-producing microalga *Botryococcus braunii* identified novel fast-
29 growing strains. **Scientific Reports**, vol. 11, no. 1, p. 7368, 2 Apr. 2021.
30 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86760-8>.
31
32 LEMÕES, Juliana S.; ALVES SOBRINHO, Rui C.M.; FARIAS, Sabrina P.; DE MOURA,
33 Renata R.; PRIMEL, Ednei G.; ABREU, Paulo C.; MARTINS, Ayrton F.; MONTES D'OCA,
34 Marcelo G. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification.

1 **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, vol. 3, p. 33–38, Jun. 2016.
2 <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.01.002>.
3
4 LI, Ping; LIN, Junda. Effect of ultraviolet radiation on photosynthesis, biomass, and fatty acid
5 content and profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology**, vol.
6 111, p. 316–322, May 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.179>.
7
8 LOWRY, O H; ROSEBROUGH, N J; FARR, A L; RANDALL, R J. Protein measurement with
9 the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, vol. 193, no. 1, p. 265–75,
10 Nov. 1951. .
11
12 MACHADO, Bruno Roswag; DUARTE, Susan Hartwig; SANTOS, Lucielen Oliveira.
13 Extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* under magnetic fields. **World Journal**
14 **of Microbiology and Biotechnology**, vol. 39, no. 11, p. 290, 31 Nov. 2023.
15 <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03732-y>.
16
17 MAHESHWARI, Neha; KRISHNA, Pushpa K; THAKUR, Indu Shekhar; SRIVASTAVA,
18 Shaili. Biological fixation of carbon dioxide and biodiesel production using microalgae isolated
19 from sewage waste water. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 27, no. 22,
20 p. 27319–27329, 17 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05928-y>.
21
22 MALTSEV, Yevhen; KULIKOVSKIY, Maxim; MALTSEVA, Svetlana. Nitrogen and
23 phosphorus stress as a tool to induce lipid production in microalgae. **Microbial Cell Factories**,
24 vol. 22, no. 1, p. 239, 20 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02244-6>.
25
26 MANDOTRA, S.K.; KUMAR, Pankaj; SUSEELA, M.R.; RAMTEKE, P.W. Fresh water green
27 microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production.
28 **Bioresource Technology**, vol. 156, p. 42–47, Mar. 2014.
29 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.127>.
30
31 MARSH, J B; WEINSTEIN, D B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal**
32 **of lipid research**, vol. 7, no. 4, p. 574–6, Jul. 1966. .
33

1 MEHARIYA, Sanjeet; PLÖHN, Martin; LEON-VAZ, Antonio; PATEL, Alok; FUNK,
2 Christiane. Improving the content of high value compounds in Nordic *Desmodesmus* microalgal
3 strains. **Bioresource Technology**, vol. 359, p. 127445, Sep. 2022.
4 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127445>.
5
6 MISHRA, Avinash; MANDOLI, Amit; JHA, Bhavanath. Physiological characterization and
7 stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. **Journal of**
8 **Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol. 35, no. 10, p. 1093–1101, 5 Oct. 2008.
9 <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0387-9>.
10
11 MOHEIMANI, Navid Reza; BOROWITZKA, Michael A.; ISDEPSKY, Andreas; SING,
12 Sophie Fon. Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. **Algae**
13 **for Biofuels and Energy**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 265–284.
14 https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_16.
15
16 OSLAN, Siti Nur Hazwani; SHOPARWE, Noor Fazliani; YUSOFF, Abdul Hafidz; RAHIM,
17 Ainihayati Abdul; CHANG, Chang Shen; TAN, Joo Shun; OSLAN, Siti Nurbaya;
18 ARUMUGAM, Kavithraashree; ARIFF, Arbakariya Bin; SULAIMAN, Ahmad Ziad;
19 MOHAMED, Mohd Shamzi. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization
20 of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin.
21 **Biomolecules**, vol. 11, no. 2, p. 256, 10 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>.
22
23 PAL, Dipasmita; KHOZIN-GOLDBERG, Inna; COHEN, Zvi; BOUSSIBA, Sammy. The
24 effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp.
25 **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 90, no. 4, p. 1429–1441, 23 May 2011.
26 <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>.
27
28 PANDIT, Priti Raj; FULEKAR, Madhusudan H.; KARUNA, Mallampalli Sri Lakshmi. Effect
29 of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties
30 in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution**
31 **Research**, vol. 24, no. 15, p. 13437–13451, 7 May 2017. [https://doi.org/10.1007/s11356-017-](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8875-y)
32 [8875-y](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8875-y).
33

1 PEREIRA, Hugo; BARREIRA, Luísa; CUSTÓDIO, Luísa; ALROKAYAN, Salman;
2 MOUFFOUK, Fouzi; VARELA, João; ABU-SALAH, Khalid; BEN-HAMADOU, Radhouan.
3 Isolation and Fatty Acid Profile of Selected Microalgae Strains from the Red Sea for Biofuel
4 Production. **Energies**, vol. 6, no. 6, p. 2773–2783, 30 May 2013.
5 <https://doi.org/10.3390/en6062773>.
6
7 RINCON, Sandra Milena; BEYENAL, Haluk; ROMERO, Hernán Mauricio. A Response
8 Surface Methodology Study for *Chlorella vulgaris* Mixotrophic Culture Optimization.
9 **Microorganisms**, vol. 12, no. 2, p. 379, 12 Feb. 2024.
10 <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020379>.
11
12 RUGNINI, L.; COSTA, G.; CONGESTRI, R.; ANTONAROLI, S.; SANITÀ DI TOPPI, L.;
13 BRUNO, L. Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green
14 microalga *Desmodesmus* sp.: An integrated approach. **Plant Physiology and Biochemistry**,
15 vol. 125, p. 45–51, Apr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.01.032>.
16
17 RUGNINI, Lorenza; ROSSI, Catia; ANTONAROLI, Simonetta; RAKAJ, Arnold; BRUNO,
18 Laura. The Influence of Light and Nutrient Starvation on Morphology, Biomass and Lipid
19 Content in Seven Strains of Green Microalgae as a Source of Biodiesel. **Microorganisms**, vol.
20 8, no. 8, p. 1254, 18 Aug. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081254>.
21
22 SEO, Seong-Hyun; HA, Ji-San; YOO, Chan; SRIVASTAVA, Ankita; AHN, Chi-Yong; CHO,
23 Dae-Hyun; LA, Hyun-Joon; HAN, Myung-Soo; OH, Hee-Mock. Light intensity as major factor
24 to maximize biomass and lipid productivity of *Ettlia* sp. in CO₂-controlled photoautotrophic
25 chemostat. **Bioresource Technology**, vol. 244, p. 621–628, Nov. 2017.
26 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.020>.
27
28 SHARMA, Kalpesh K.; SCHUHMANN, Holger; SCHENK, Peer M. High Lipid Induction in
29 Microalgae for Biodiesel Production. **Energies**, vol. 5, no. 5, p. 1532–1553, 18 May 2012.
30 <https://doi.org/10.3390/en5051532>.
31
32 SHETTY, Prateek; GITAU, Margaret Mukami; MARÓTI, Gergely. Salinity Stress Responses
33 and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. **Cells**, vol. 8, no. 12, p. 1657, 17
34 Dec. 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8121657>.

1
2 SINGH, Rahul Prasad; YADAV, Priya; KUMAR, Ajay; HASHEM, Abeer; AVILA-
3 QUEZADA, Graciela Dolores; ABD_ALLAH, Elsayed Fathi; GUPTA, Rajan Kumar. Salinity-
4 Induced Physiochemical Alterations to Enhance Lipid Content in Oleaginous Microalgae
5 *Scenedesmus* sp. BHU1 via Two-Stage Cultivation for Biodiesel Feedstock. **Microorganisms**,
6 vol. 11, no. 8, p. 2064, 11 Aug. 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082064>.
7
8 SCHMIDT, Éder C.; FELIX, Marthiellen R. de L.; KREUSCH, Marianne G.; PEREIRA,
9 Débora T.; COSTA, Giulia B.; SIMIONI, Carmen; OURIQUES, Luciane C.; STEINER,
10 Neusa; CHOW, Fungyi; FLOH, Eny S. L.; RAMLOV, Fernanda; MARASCHIN, Marcelo;
11 BOUZON, Zenilda L. Profiles of carotenoids and amino acids and total phenolic compounds
12 of the red alga *Pterocladia capillacea* exposed to cadmium and different salinities. **Journal**
13 **of Applied Phycology**, vol. 28, no. 3, p. 1955–1963, 31 Jun. 2016.
14 <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0737-8>.
15
16 SIRIKHACHORNKIT, Anchalee; VUTTIPONGCHAIKIJ, Supachai; SUTTANGKAKUL,
17 Anongpat; YOKTHONGWATTANA, Kittisak; JUNTAWONG, Piyada; POKETHITIYOOK,
18 Prayad; KANGVANSACHOL, Kunn; MEETAM, Metha. Increasing the Triacylglycerol
19 Content in *Dunaliella tertiolecta* through Isolation of Starch-Deficient Mutants. **Journal of**
20 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 26, no. 5, p. 854–866, 28 May 2016.
21 <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10022>.
22
23 SRIVASTAVA, Garima; NISHCHAL; GOUD, Vaibhav V. Salinity induced lipid production
24 in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047). **Bioresource Technology**, vol. 242, p.
25 244–252, Oct. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.175>.
26
27 SUN, Xian; CAO, Yu; XU, Hui; LIU, Yan; SUN, Jianrui; QIAO, Dairong; CAO, Yi. Effect of
28 nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and
29 fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource**
30 **Technology**, vol. 155, p. 204–212, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.109>.
31
32 TAKESHITA, Tsuyoshi; OTA, Shuhei; YAMAZAKI, Tomokazu; HIRATA, Aiko;
33 ZACHLEDER, Vilém; KAWANO, Shigeyuki. Starch and lipid accumulation in eight strains
34 of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture

1 conditions. **Bioresource Technology**, vol. 158, p. 127–134, Apr. 2014.
2 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.135>.

3

4 TOUMI, A; POLITAEVA, N A. Impact of the nitrate concentration on the biomass growth and
5 the fatty acid profiles of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **IOP Conference Series: Earth
6 and Environmental Science**, vol. 689, no. 1, p. 012026, 1 Mar. 2021.
7 <https://doi.org/10.1088/1755-1315/689/1/012026>.

8

9 VIMALI, Elamathi; SENTHIL KUMAR, Arumugasamy; SAKTHI VIGNESH, Nagamalai;
10 ASHOKKUMAR, Balasubramaniam; DHAKSHINAMOORTHY, Amarajothi; UDAYAN,
11 Aswathy; ARUMUGAM, Muthu; PUGAZHENDHI, Arivalagan; VARALAKSHMI, Perumal.
12 Enhancement of lipid accumulation in microalga *Desmodesmus* sp. VV2: Response Surface
13 Methodology and Artificial Neural Network modeling for biodiesel production. **Chemosphere**,
14 vol. 293, 1 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133477>.

15

16 WALSBY, A. E. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. By E. W. Becker. Cambridge:
17 Cambridge University Press (1994), pp. 230, £40.00, US\$69.95. ISBN 0-521-35020-4.

18 **Experimental Agriculture**, vol. 31, no. 1, p. 112–112, 3 Jan. 1995.
19 <https://doi.org/10.1017/S0014479700025126>.

20

21 XIN, Li; HONG-YING, Hu; KE, Gan; YING-XUE, Sun. Effects of different nitrogen and
22 phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a
23 freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, vol. 101, no. 14, p. 5494–
24 5500, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.

25

26 YADAV, Nisha; GUPTA, Neha; SINGH, D. P. Ameliorating Effect of Bicarbonate on Salinity
27 Induced Changes in the Growth, Nutrient Status, Cell Constituents and Photosynthetic
28 Attributes of Microalga *Chlorella vulgaris*. **Bulletin of Environmental Contamination and
29 Toxicology**, vol. 108, no. 3, p. 491–499, 17 Mar. 2022. [https://doi.org/10.1007/s00128-021-
30 03135-5](https://doi.org/10.1007/s00128-021-03135-5).

31

32 YUN, Chol-Jin; HWANG, Kum-Ok; HAN, Song-Su; RI, Hyong-Guan. The effect of salinity
33 stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703.

1 **Biomass and Bioenergy**, vol. 127, p. 105277, Aug. 2019.
2 <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105277>.
3
4 ZARRINMEHR, Mohammad Javad; FARHADIAN, Omidvar; HEYRATI, Fatemeh Paykan;
5 KERAMAT, Javad; KOUTRA, Eleni; KORNAROS, Michael; DANESHVAR, Ehsan. Effect
6 of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga,
7 *Isochrysis galbana*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, vol. 46, no. 2, p. 153–158,
8 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>.
9
10 ZHANG, Bangxi; LIU, Linhai; LIN, Xiaoai; XU, Zhicheng; LUO, Wenhai; LUO, Longzao.
11 Response surface methodology to optimize self-flocculation harvesting of microalgae
12 *Desmodesmus* sp.CHX1. **Environmental Technology**, vol. 43, no. 17, p. 2647–2655, 29 Jul.
13 2022. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1892831>.
14
15 ZHANG, Wen-wen; ZHOU, Xue-fei; ZHANG, Ya-lei; CHENG, Peng-fei; MA, Rui; CHENG,
16 Wen-long; CHU, Hua-qiang. Enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*
17 by coupled light intensity and nitrogen starvation in column photobioreactors. **Journal of**
18 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 28, no. 12, p. 2019–2028, 28 Dec. 2018.
19 <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07008>.
20
21 ZHAO, Zhenyu; MA, Shasha; LI, Ang; LIU, Pinghuai; WANG, Meng. Effects of Trophic
22 Modes, Carbon Sources, and Salinity on the Cell Growth and Lipid Accumulation of Tropic
23 Ocean Oilgae Strain *Desmodesmus* sp. WC08. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol.
24 180, no. 3, p. 452–463, 5 Oct. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2109-5>.
25
26 ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal**
27 **of Applied Phycology**, vol. 9, no. 2, p. 189–194, 1997.
28 <https://doi.org/10.1023/A:1007914806640>.
29
30 ZHU, L. D.; LI, Z. H.; HILTUNEN, E. Strategies for Lipid Production Improvement in
31 Microalgae as a Biodiesel Feedstock. **BioMed Research International**, vol. 2016, p. 1–8,
32 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8792548>.
33

1 ZHU, L. D.; XU, Z. B.; QIN, L.; WANG, Z. M.; HILTUNEN, E.; LI, Z. H. Oil production from
2 pilot-scale microalgae cultivation: An economics evaluation. **Energy Sources, Part B:
3 Economics, Planning, and Policy**, vol. 11, no. 1, p. 11–17, 2 Jan. 2016.
4 <https://doi.org/10.1080/15567249.2015.1052594>.

5

6

CAPÍTULO 3

CRISPR/Cas 9 RNP na edição gênica de *Desmodesmus* sp. e *Scenedesmus obliquus* da coleção PETROBRAS/FURG: evidências de resistência à ação do complexo nuclease/gRNA

1 **RESUMO**

2 Otimizar os processos de produção de biodiesel de terceira geração é essencial para aumentar
3 a eficiência na obtenção de triacilgliceróis (TAGs), cruciais para a produção de biodiesel. A
4 aplicação de tecnologias de edição genética em microalgas promissoras como a tecnologia
5 CRISPR/Cas9 RNP, é essencial para aumentar os níveis de TAG e adaptar o perfil das cepas
6 para esse fim. Neste estudo, foram obtidas as sequências parciais do gene AGPS1 (ADP-glicose
7 pirofosforilase), responsável pela síntese de amido, em duas cepas de microalgas. Além disso,
8 desenvolvemos um protocolo unificado de extração de RNA e validamos RNAs guia, cuja
9 sequência é complementar a sequências correspondentes aos genes das AGPS1, para a
10 endonuclease Cas9. A partir desses RNAs guia, e junto com a Cas9, se criou um complexo
11 ribonucleoproteico livre de DNA com potencial de manipulação genética precisa e livre de
12 transgenia, cuja atividade foi validada *in vitro*. Diversas tentativas em diferentes condições
13 evidenciaram uma possível incompatibilidade ou resistência de ambas as cepas à edição
14 mediante essa tecnologia. É destacada a importância da implementação da tecnologia
15 CRISPR/Cas9 para permitir modificações genéticas específicas e eficazes, abrindo caminho
16 para melhorias significativas na produção de biodiesel a partir de microalgas. Além disso,
17 demonstramos a viabilidade celular de microalgas sob condições de estresse elétrico
18 (eletroporação), fornecendo informações para futuras aplicações biotecnológicas.

19

20 **Palavras-chave:** Microalgas, complexo ribonucleoproteico; RNA guia; mutagênese dirigida;
21 eletroporação.

1 **ABSTRACT**

2 Optimizing third-generation biodiesel production processes is essential for increasing
3 efficiency in obtaining triacylglycerols (TAGs), which are crucial for biodiesel production. The
4 application of genetic editing technologies in promising microalgae, such as CRISPR/Cas9
5 RNP technology, is essential for increasing TAG levels and adapting strain profiles for this
6 purpose. In this study, partial sequences of the AGPS1 gene (ADP-glucose pyrophosphorylase),
7 responsible for starch synthesis, were obtained and confirmed in two microalgae strains.
8 Additionally, we validated guide RNAs, whose sequences are complementary to sequences
9 corresponding to AGPS1 genes, for the Cas9 endonuclease. Using these guide RNAs, along
10 with Cas9, a DNA-free ribonucleoprotein complex with potential for precise genetic
11 manipulation and transgene-free was created, whose activity was validated in vitro. Several
12 attempts under different conditions revealed a possible incompatibility or resistance of both
13 strains to editing using this technology. The importance of implementing CRISPR/Cas9
14 technology to allow specific and effective genetic modifications is highlighted, paving the way
15 for significant improvements in biodiesel production from microalgae. Additionally, we
16 demonstrated the cellular viability of microalgae under electrical stress conditions
17 (electroporation), providing valuable insights for future biotechnological applications.

18

19 **Keywords:** Microalgae, ribonucleoprotein complex; guide RNA, targeted mutagenesis,
20 electroporation.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos com capacidade de produzir matéria orgânica mediante fotossíntese e que podem viver em diferentes ambientes (DOLGANYUK *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2018). As microalgas desempenham um papel vital na aquicultura sendo a base da cadeia trófica na criação de animais aquáticos, como moluscos, camarões e peixes em diferentes estágios de crescimento (BOROWITZKA, 1998). O crescimento da pesquisa, bem como do uso biotecnológico das microalgas nas últimas décadas, desenvolve e expande a área de ação da aquicultura da indústria alimentícia para novas áreas como a biorremediação, nutracêutica, farmacêutica ou bioenergética, graças ao uso desses microrganismos (ROY; PAL, 2015). Um exemplo dessas novas áreas de desenvolvimento é a produção de biocombustíveis, como o biodiesel de 3ª geração (3G) que utiliza as microalgas como matéria-prima para sua produção.

As microalgas apresentam um grande potencial para a geração de biodiesel graças à sua grande capacidade fotossintética, sua alta taxa de crescimento e sua considerável produção de lipídeos, que pode atingir até 50% de sua biomassa seca (CHISTI, 2007; KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2013). O uso de microalgas para a geração de biodiesel apresenta grandes vantagens como a formação de biomassa a partir de compostos inorgânicos como CO₂, nitrogênio e fosfatos, os quais podem ser encontrados como resíduos no meio ambiente pelas atividades antrópicas. Microalgas podem, assim, reduzir o efeito “*greenhouse*” da atmosfera (RODOLFI *et al.*, 2009). Outra vantagem é que o seu cultivo não compete com as terras utilizadas para a produção de alimentos, tendo nenhum efeito sobre a economia da agricultura (BRENNAN; OWENDE, 2013).

As espécies de *Scenedesmus* e *Desmodesmus* são microalgas oleaginosas pertencentes às clorofíceas (HEGEWALD; BRABAND, 2017; HU *et al.*, 2008), as quais possuem alto conteúdo lipídico (ABOU-SHANAB *et al.*, 2011; LI, Yantao *et al.*, 2011; YANG; ZHANG; HU, 2020). Na última década, espécies de *Scenedesmus* têm despertado um grande interesse devido às suas qualidades, como crescimento rápido e produção de moléculas de interesse comercial, como carotenóides e astaxantina (KIM, Eun Song *et al.*, 2023; QIN; LIU; HU, 2008), ou luteína (FERNÁNDEZ-SEVILLA; ACIÉN FERNÁNDEZ; MOLINA GRIMA, 2010; SÁNCHEZ *et al.*, 2008). *Scenedesmus* e *Desmodesmus* também apresentam uma alta capacidade de tratamento de água, eliminando uma grande quantidade de nutrientes inorgânicos e compostos residuais provenientes de diferentes indústrias (DAS; DUNFORD; DEKA, 2022; SILAMBARASAN *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023; XIN *et al.*, 2010). Em situações ambientais desfavoráveis ou de estresse, como deficiência de nitrogênio ou fósforo,

1 *Scenedesmus* e *Desmodesmus* podem produzir uma grande quantidade de lipídeos (LI, Zhi *et*
2 *al.*, 2021; MANDAL; MALLICK, 2009), o que as torna fortes candidatas para a produção de
3 biodiesel. Além de disso, algumas cepas pertencentes a esses gêneros podem crescer em
4 temperaturas que variam de 4 a 35°C, como é o caso de *Scenedesmus* sp. NJ-1 (CHEN, Zhuo
5 *et al.*, 2012), e outras como *Scenedesmus abundans* e *Desmodesmus* sp. que toleram até 45°C
6 (GUPTA *et al.*, 2016; PAN *et al.*, 2011).

7 Uma alta produção de lipídeos neutros, como os triacilgliceróis (TAGs), é um pré-
8 requisito fundamental quando se busca uma microalga para a produção de biodiesel. Amido e
9 TAGs são substâncias de reserva produzidas pelas microalgas a partir de condições ambientais
10 desfavoráveis. Essas moléculas energéticas servem também como “drenos” de elétrons
11 produzidos em excesso pelos fotossistemas, os quais poderiam gerar espécies reativas de
12 oxigênio (EROS) e causar estresse foto-oxidativo (HU *et al.*, 2008). Sabe-se que a acumulação
13 de amido ou TAGs em condições limitantes de crescimento é espécie-específica. Espécies de
14 microalgas que tendem a acumular mais TAGs do que outras, o que as classificam como
15 microalgas oleaginosas. Estas apresentam um alto potencial para a produção de biodiesel e,
16 entre elas, estão incluídos os gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus*. Entretanto, BREUER *et al.*
17 (2013) mostraram que *S. obliquus* pode acumular mais carboidratos (40 a 60% do peso seco)
18 do que TAGs (30 a 45% do peso seco), mostrando que o fluxo de carbono, mesmo em uma
19 microalga considerada oleaginosa, é desfavorável em relação ao acúmulo de carboidratos.

20 Poucos estudos incluem engenharia genética ou modificações genéticas usando técnicas
21 moleculares em *Scenedesmus* e *Desmodesmus*. A maior parte deste tipo de trabalho em
22 microrganismos fotossintéticos é realizada em organismos modelo como a microalga
23 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella* sp. ou *Nannochloropsis* sp. (DORON; SEGAL;
24 SHAPIRA, 2016; MUSSGUG, 2015; POLINER; FARRÉ; BENNING, 2018). Apesar disso,
25 há relatos de modificações genéticas no gênero *Scenedesmus* como a produção de cepas amido-
26 deficientes de *Scenedesmus obliquus* CPC2, as quais foram obtidas por mutação randômica
27 usando luz UV (DE JAEGER *et al.*, 2014). Há, também, estudos de transformações genéticas
28 de *Scenedesmus* por eletroporação (CHEN, Chun-Yen *et al.*, 2017, 2016). Um estudo recente
29 mostra a compatibilidade de *Scenedesmus* com a transformação por *Agrobacterium tumefaciens*
30 (SUTTANGKAKUL *et al.*, 2019).

31 Embora espécies de *Scenedesmus* e *Desmodesmus* sejam bastante promissoras para a
32 produção de biodiesel, existe uma carência no desenvolvimento de técnicas moleculares
33 avançadas e otimizadas para estas microalgas. Um exemplo disso é a tecnologia conhecida por

1 *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR). Originalmente, o
2 sistema CRISPR foi descoberto há trinta anos em genomas de bactérias por ISHINO e
3 colaboradores em 1987 (ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018), os quais apenas
4 descreveram uma estrutura não usual flanqueando a região 3' do gene alvo do estudo (*iap*), o
5 qual codifica para uma enzima proteolítica envolvida na conversão de fosfatases alcalinas. Esta
6 estrutura nucleotídica estava constituída de cinco sequências altamente homólogas de 29
7 nucleotídeos, organizadas em repetições com 32 nucleotídeos de espaçamento entre elas. Os
8 autores concluíram o artigo afirmando que o significado biológico daquelas sequências não era,
9 até então, conhecido.

10 Hoje sabe-se com detalhes que o sistema CRISPR representa um ou mais loci presentes
11 nos genomas de Bacteria e Archaea, constituído de múltiplas sequências palindrômicas curtas,
12 as quais são espaçadas por sequências exógenas também pequenas (27 a 72 pb). Essas
13 sequências espaçadoras, em geral, têm origem no DNA de bacteriófagos ou plasmídios
14 invasores e constituem a base de um sistema imune adaptativo de procariontes. Associado ao
15 locus CRISPR foi identificado outro locus, denominado Cas (*CRISPR-associated*), cujos genes
16 codificam para nucleases de DNA (GASIUNAS *et al.*, 2012; JINEK *et al.*, 2012; MAKAROVA
17 *et al.*, 2020). O sistema funciona a partir da transcrição do locus CRISPR, cujos transcritos são
18 processados por endonucleases Cas para gerar pequenos RNAs CRISPR (crRNAs). Estes
19 crRNAs interagirão com RNAs auxiliares transativadores chamados tracrRNAs, formando um
20 RNA duplex ou RNA guia (gRNA). Os gRNAs formarão complexos com uma nuclease Cas
21 em especial, a Cas9. O tracrRNA ativa a Cas9 a clivar qualquer DNA que seja compatível com
22 o gRNA que carrega, produzindo quebras de fita dupla no DNA-alvo. Assim, genomas
23 invasores que tenham parte da sua informação genética anteriormente incorporada no locus
24 CRISPR poderão ser eliminados numa segunda invasão através da ação da Cas9 direcionada
25 por gRNA.

26 O sistema CRISPR-Cas9 representa uma das técnicas mais promissoras para a edição
27 de genes e genomas, uma vez que basta sintetizar um gRNA e expressar uma Cas9 para produzir
28 um corte em uma região específica do genoma da célula-alvo. Se o sistema for utilizado apenas
29 para fazer uma quebra na dupla fita do DNA, as falhas naturais do sistema de reparo de DNA
30 pela inserção de “*indels*” (inserções ou deleções) ocasionarão uma perda de função para aquele
31 gene. Se for introduzida, junto com o sistema CRISPR-Cas9, uma molécula de DNA homóloga
32 à região do corte, mas com alguma alteração desejada, o sistema de recombinação homóloga
33 poderá substituir o gene original por uma versão modificada daquela região, havendo uma
34 verdadeira “edição” da informação original (KIM, Hyongbum; KIM, 2014).

1 A tecnologia CRISPR-Cas9 já foi aplicada com sucesso em algumas microalgas como
2 *Nannochloropsis oceanica* e *Thalassiosira pseudonana*, nas quais proporcionaram a obtenção
3 de mutantes para o gene da nitrato redutase (NR). Nesses estudos foi inserida toda a informação
4 genética (DNA) para sintetizar o sistema CRISPR/Cas9, os guides e os agentes de seleção
5 (BELSHAW *et al.*, 2023; POLINER *et al.*, 2018). Existem outras edições em microalgas
6 mediante a tecnologia CRISPR/Cas que não implicam a utilização de DNAs exógenos na célula
7 editada evitando a transgenia. Essa variante é denominada CRISPR/Cas9 RNP
8 (Ribonucleoproteína), tecnologia que apenas utiliza o produto do sistema CRISPR (proteína
9 Cas + RNA guia) complexados *in vitro* e, posteriormente, introduzido na célula alvo, evitando
10 desse modo a introdução de DNA no interior celular. Um exemplo da aplicação da tecnologia
11 CRISPR/Cas9 RNP em microalgas é na diatomácea *Tetraselmis* spp. KCTC12432BP, na qual
12 se obteve um knockout para a ADP-glucose pirofosforilase (AGP) que mostrou uma produção
13 aumentada de lipídeos (CHANG *et al.*, 2020). Para *Porphyridium purpureum* também mediante
14 CRISPR/Cas9 RNP foi produzido um knockout para o gene da chlorophyll synthase (CHS1)
15 que levou a um aumento nos níveis de ficoeritrina (JEON *et al.*, 2021).

16 É evidente que a utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição
17 gênica é precisa e aplicável para a indústria por não necessitar inserir DNA exógeno na célula.
18 Isto permite o desenvolvimento de cepas com características desejadas e não transgênicas que
19 podem se aplicadas aos cultivos em escala industrial, sem as restrições ou proibições que os
20 organismos transgênicos apresentam. O desenvolvimento da tecnologia CRISPR/Cas9 RNP nos
21 gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus* parece ser, até o momento, inédito em ambos os gêneros.
22 A implementação dessa tecnologia levaria ao desenvolvimento de uma ferramenta capaz de
23 modificar o metabolismo celular, possibilitando aumentar a produção de lipídeos sem a
24 implicação de transgenia; o que poderia ser aplicado posteriormente para a obtenção de diversas
25 biomoléculas de grande interesse comercial nas diversas indústrias. Em resumo, há uma
26 necessidade de desenvolver essa metodologia molecular direcionada e específica a fim de
27 aumentar o desenvolvimento biotecnológico em ambas as cepas de microalgas.

28

29 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

30

31 **2.1. Microalgas e condições de cultivo**

32 As microalgas usadas neste estudo, *Scenedesmus obliquus* Petrobras/Furg e
33 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg, foram adquiridas da coleção CENPES/PETROBRAS.
34 Ambas as microalgas foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 ml de meio

1 Tris-Acetato-Fosfato (GORMAN; LEVINE, 1965), salinidade de 10 g/L, pH = 8,0, a 30 °C,
2 com agitação a 100 rpm, 50 µmol/m²/s e um fotoperíodo de 12:12 horas luz/escuro.

3

4 **2.2. Identificação dos genes-alvo**

5 Em um estudo prévio (não publicado), foi realizado sequenciamento de nova geração
6 (NGS) a partir de amostras de DNA genômico de *Scenedesmus obliquus* e *Desmodesmus* sp.,
7 utilizando a plataforma Illumina na empresa GenOne (<https://geneone.com.br/>). Este
8 sequenciamento gerou, para cada cepa, pacotes de dados de, aproximadamente, 50 milhões de
9 sequências de 150 nucleotídeos cada. Estes pacotes de dados foram utilizados para identificar
10 leituras compatíveis com a sequência do gene-alvo, no caso, o gene que codifica para a para a
11 enzima ADP-glicose pirofosforilase (AGPS1), principal enzima envolvida na síntese de amido.
12 Para isso foi utilizada a ferramenta “Map to Reference” da versão trial do software Geneious
13 Prime (<https://www.geneious.com>). O pacote de dados do sequenciamento NGS foi, então,
14 utilizado para mapear sobre o gene de referência da AGPS1 de *Scenedesmus* sp. PABB004
15 disponível no GenBank (JABVCE010000001.1). Dessa forma foi possível identificar
16 sequências parciais da AGPS1 tanto para *Scenedesmus obliquus* Petrobras/Furg, quanto para
17 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg.

18

19 **2.3. Desenho de primers específicos para o sequenciamento dos genes-alvo**

20 A partir das sequências parciais dos genes das AGPS1 foi realizado o desenho de
21 primers específicos para o sequenciamento da zona de edição para *S. obliquus* e *Desmodesmus*
22 sp. Além disso, foram desenhados primers para o sequenciamento do éxon 8 de *Desmodesmus*
23 sp, o qual não foi obtido a partir do sequenciamento NGS.

24

25 **Tabela 1.** Primers desenhados para o sequenciamento dos genes AGPS1 de *S. obliquus* e
26 *Desmodesmus* sp.

	Primers	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5'- 3')
<i>S. obliquus</i>	seqAGPase1(S3)-F seqAGPase1(S3)-R	tgtcacaagcatacaacagcag	atgacctattcccaaagtc
<i>Desmodesmus</i> sp.	seqAGPase1(D4)-F13 seqAGPase1(D4)-R13	agtacatgtggctgttgagga	gttaccaaagtcgttgctct

seqAGPase1(D4)-F2 ctgatgaagatcgacaggag catggtctcgtagtagtcgctg
seqAGPase1(D4)-R2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

2.4. Extração de RNA e síntese de cDNA de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.

Para a extração do RNA total das microalgas, 150 mg de biomassa fresca de cada uma das cepas, na fase log de crescimento para *S. obliquus* e fase estacionária para *Desmodesmus* sp., foram submetidas à quebra mecânica em um morteiro com adição de nitrogênio líquido e 150 mg de *beads* de sílica (1:1). O RNA foi extraído através do kit RNeasy Plant Minikit (Quiagen), quantificado no fluorímetro Qubit (Life Technologies) e tratado com DNaseI (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Todos os protocolos foram realizados seguindo as recomendações dos fabricantes.

2.5. Sequenciamento dos genes alvos de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.

Para verificar e validar as sequências dos genes alvo que serão utilizadas para a síntese dos RNAs guia (sgRNA) do sistema CRISPR/Cas9 e o fragmento referente ao éxon 8 da cepa *Desmodesmus* sp., o cDNA de ambas as cepas foi utilizado como molde para a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR, realizada com os primers descritos na Tabela 1, teve a seguinte condição: 94°C/2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/90 s e uma extensão final 72°C/5 min. O resultado foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados (QIAquick PCR Purification Kit - QIAGEN), quantificados no fluorímetro Qubit (Life Technologies) e enviados para a empresa ACTGene Análises Moleculares (<https://actgene.com.br>) para a realização do sequenciamento.

2.6. Estudo *in silico* e desenho dos CRISPR-sgRNA

Após a identificação das sequências dos genes-alvos, foi utilizada a ferramenta online CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no>) para o desenho dos RNAs guia (sgRNAs), utilizando as opções “Past Target”, “CRISPR/Cas9” e “Knock-out”. Esses sgRNAs são complementares e tem como alvos os genes da enzima AGPS1 de ambas as espécies de microalgas. As melhores sequências (Tabela 2) foram encaminhadas para síntese na empresa Thermo Fisher Scientific (Brasil).

1 **Tabela 2.** Primers desenhados para a síntese dos CRISPR-sgRNA complementares a AGPS1
 2 de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.

	Primers	Forward primer (5' - 3')
<i>Scenedemus obliquus</i>	sgAGPase1(S3)-1	aatacgactcactataggctgttgaggaggcaatgagtttagagctagaa
	sgAGPase1(S3)-2	aatacgactcactataggagttgtgcgcaagcacaggttagagctaga
	sgAGPase1(S3)-3	aatacgactcactatagggtacaagtggcactgacagtttagagctaga
<i>Desmodesmus</i> sp.	sgAGPase1(D4)-1	aatacgactcactataggcctgatgaagatcgacaggttagagctagaa
	sgAGPase1(D4)-2	aatacgactcactataaccgtcacgtctgcaacggaggttagagctaga
	sgAGPase1(D4)-3	aatacgactcactataaggcgaccactgtaccgatgttagagctaga

3

4 **2.7. Síntese dos gRNAs**

5 Após a análise do sequenciamento do gene que codifica para AGPS1 de *S. obliquus* e
 6 *Desmodesmus* sp., e a confirmação e validação dos *primers* desenhados para sintetizar os
 7 gRNAs do sistema CRISPR/Cas9 RNP, foi realizada a síntese dos moldes dos gRNAs. Para
 8 tanto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada, tendo como moldes os *primers*
 9 descritos na Tabela 2. A PCR, utilizando o *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher),
 10 teve a seguinte condição: 94°C/2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30s, 45°C/30s, 72°C/30s e
 11 uma extensão final 72°C/5 min. O resultado foi visualizado através da eletroforese em gel de
 12 agarose 2%. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados (*QIAquick PCR*
 13 *Purification Kit* - QIAGEN), quantificados no fluorímetro *Qubit* (Life Technologies) e
 14 utilizados para síntese dos gRNAs.

15 Os gRNAs foram sintetizados com o *MEGAscript™ T7 Transcription Kit* (Thermo
 16 Fisher Scientific, Brasil), tratados com DNase I (Thermo Fisher Scientific, Brasil), precipitados
 17 com acetato de sódio 3M, quantificados no fluorímetro *Qubit* (Life Technologies, Brasil) e
 18 visualizados em gel de agarose 2%. Todos os protocolos foram seguidos de acordo com as
 19 recomendações dos fabricantes.

20

21 **2.8. Montagem do complexo gRNA/Cas9**

1 Para a formação do complexo gRNA/Cas9, se utilizou a proporção de 5:1 µg de *Cas9*
2 *Protein V2* (Thermo Fisher Scientific, Brasil) e gRNAs, respectivamente. Testou-se também a
3 influência do buffer *10x NEBuffer 3.1* 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100
4 µg/mL BSA, pH 7,9. *New England BioLabs*) na formação dos complexos. O tempo de
5 incubação para formação do complexo foi de 20-30 min, à temperatura ambiente. A reação foi
6 realizada momentos antes do protocolo de eletroporação.

8 **2.9. Estabelecimento do protocolo de eletroporação**

9 Para determinar as condições ótimas de eletroporação, *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.
10 foram eletroporadas com o complexo gRNA/Cas9 n as seguintes condições de voltagem: 150,
11 300, 550, 750, 1000, 1200 V. Amostras de 500 µL do cultivo de *Scenedesmus obliquus* e
12 *Desmodesmus* sp. contendo 10⁶ células/mL, foram centrifugadas a temperatura ambiente por 2
13 min a 3.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de
14 meio TAP-Sacarose 40 mM. Após esse processo, 50 µL foram transferidos para cubetas de
15 eletroporação de 0,2 cm de afastamento entre os eletrodos e foram submetidos a eletroporação
16 no eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation Systems* (Bio-Rad, Brasil). Quando foram
17 utilizados pulsos únicos do tipo decaimento exponencial com intensidades correspondentes a
18 campos de 150, 550, 700, 1.000, 1.200 V/cm, a capacitância e a resistência foram fixadas em
19 50 µF e a ∞, respectivamente. Quando foram testados pulsos duplos, as condições de
20 eletroporação foram as mostradas na Tabela 3. Após a eletroporação, as células foram
21 transferidas para uma placa de 24 poços transparente contendo 1 mL de meio TAP (salinidade
22 10) e incubadas a 30 °C por 6 horas, sob luz fluorescente fria de 50 µmol/m²/s, fotoperíodo
23 12:12 e homogeneizadas em mesas agitadoras, antes de seu plaqueamento. Para os cultivos em
24 meio sólido, as microalgas foram cultivadas em meio TAP como descrito por GORMAN e
25 LEVINE (1965), com adição de ágar 15 g/L, pH = 8,1, salinidade 10 g/L, sob luz fluorescente
26 fria de 50 µmol/m²/s, fotoperíodo 12:12 e temperatura 30 °C. O experimento foi realizado em
27 triplicata e as células se encontravam na fase exponencial de crescimento.

28
29 **Tabela 3.** Parâmetros de eletroporação para a cepa *Scenedesmus obliquus* e *Desmodesmus* sp.
30 A cepa controle foi eletroporada apenas com água ultrapura no lugar do complexo
31 sgRNA:Cas9.

Poring pulse	Controle	150 V	550 V	750 V	1000 V
Voltagem (V)	550	150	550	750	1000

Pulser lenght (ms)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
No. of pulse	2	2	2	2	2
Pulse intervals (sec)	5.0	0.1	5.0	5.0	5.0

Transfer pulse	Controle	150 V	550 V	750 V	1000 V
Voltagem (V)	20	20	20	20	20
No. of pulse	5	5	5	5	5
Pulse intervals (sec)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

1

2

3 **2.10. Seleção dos mutantes mediante coloração com vapor de I₂**

4 Para o *screening* dos mutantes com uma possível edição no gene da AGPS1 de ambas
5 as cepas, utilizou vapor de iodo (I₂) como agente de seleção (WORK *et al.*, 2010). O I₂ é um
6 elemento que reage com o amido corando-o de roxo escuro, servindo como repórter para a
7 síntese de amido. Para a otimização da metodologia para *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.,
8 colônias de ambas as cepas de microalgas foram cultivadas em placas com meio TAP sem
9 nitrogênio (NH₄Cl foi substituído por uma quantidade equimolar de KCl) por 5 dias a
10 temperatura de 30°C, sob luz fluorescente fria de 2.300 Lux e fotoperíodo constante, para
11 induzir a produção de moléculas de reserva nas células como TAG e amido
12 (SIRIKHACHORNKIT *et al.*, 2018). Após esse período, as microalgas foram expostas ao vapor
13 de I₂ por 24 horas. Colônias que não apresentem uma coloração roxa após a exposição foram
14 consideradas como possíveis cepas editadas.

15

16 **2.11. Estabelecimento de um método diagnóstico por PCR em mutantes editados por** 17 **CRISPR-Cas9 RNP**

18 Para o estabelecimento de um método diagnóstico de mutantes editados por CRISPR-
19 Cas9 RNP, a técnica de PCR a partir de biomassa de microalga foi testada e implementada.
20 Primeiramente avaliou-se o uso direto de biomassa na reação de PCR e o sobrenadante obtido
21 de colônias de microalgas preaquecidas em 10 µL de água UltraPure™ DNase/RNase-Free
22 Distilled (Invitrogen) em tubos eppendorfs de 200 µL à 95°C durante 10 minutos. Foram
23 testadas três quantidades de sobrenadante (1, 3 e 5 µL) como molde de DNA na reação de PCR.
24 Todas as condições testadas foram realizadas em triplicata. Após otimização do protocolo de
25 diagnóstico por PCR, as colônias de microalgas que cresceram após o processo de eletroporação

1 com o complexo gRNA/Cas9 foram selecionadas e submetidas a esta análise para procurar uma
 2 possível edição. A PCR foi realizada no termociclador ProFlex PCR System (Life
 3 Technologies, Brasil) com condições de amplificação de: 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C
 4 por 30 segundos, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e 30 s e uma extensão final 72 °C por 5 min.
 5 Após a PCR, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

6

7 **2.12. Desenho de novos primers específicos para síntese de novos gRNAs**

8 Em virtude do insucesso nos testes com os primeiros gRNAs produzidos, foi realizado
 9 o desenho de novos primers específicos para a síntese de novos de gRNAs para o gene que
 10 codifica para AGPS1 de *Scenedesmus obliquus* e *Desmodesmus* sp., no programa CHOPCHOP
 11 (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). A Tabela 4 apresenta as sequências dos novos primers, os quais
 12 foram desenhados através do *software Primer Express 3.0* (Applied Biosystems) e sintetizados
 13 pela empresa Biogen (Brasil).

14

15 **Tabela 4.** Primers desenhados para a síntese dos novos CRISPR-sgRNA de *S. obliquus* e
 16 *Desmodesmus* sp.

	<i>Primers</i>	<i>Forward primer (5' - 3')</i>
<i>Scenedesmus obliquus</i>	gRNASE6(1)	taatacgactcactatagctgatgaagatagatgagagtgggttttagagctaga
	gRNASE6(2)	taatacgactcactatagctcagcaactcaatcacgcgggttttagagctaga
	gRNASE6(3)	taatacgactcactataggagttgctgagaaaccaagggttttagagctaga
<i>Desmodesmus</i> sp.	gRNADE6(1)	taatacgactcactatagctcagcaactccaccacgcgggttttagagctaga
	gRNADE6(2)	taatacgactcactataggtgcgcaaggagtggttccaggggttttagagctaga
	gRNADE6(3)	taatacgactcactatagtgccctgatgaagatcgacgagggttttagagctaga

17

18

19 **2.13. Síntese dos novos gRNAs e montagem dos novos complexos gRNA/Cas9**

20 A partir da síntese dos novos primers, foi realizada a síntese dos moldes dos novos
 21 gRNAs e utilizados para a formação dos novos complexos gRNA/Cas9. Para tanto, foram
 22 utilizadas as mesmas condições descritas anteriormente.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2.14. Ensaio *in vitro* da atividade dos novos gRNAs

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar uma região que contém o exón 6 do gene AGPS1 para ambas as espécies de microalgas. Para a *S. obliquus*, foram utilizados os *primers* FW:5'- agtacatgtggctgtttgagga-3' e RV:5'-atgacctcattcccaaagtcatt-3', e para *Desmodesmus* sp., os *primers* FW:5'-gtaccgcatggactacaaggag-3' e RV:5'-gttaccaaagtcgtttgcgtct-3'. Para ambas PCRs foram utilizados os seguintes parâmetros: 94 °C-2'; {94 °C - 30'', 60 °C - 30'', 72 °C - 60''} 35X; 72 °C - 5'. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop, seguindo as indicações do fabricante. Os fragmentos gerados foram utilizados como “alvo” para o teste o ensaio de atividade catalítica da enzima Cas9.

Para cada espécie de microalga, foram testados os três novos gRNAs (Tabela 4). Para a formação do complexo sgRNA/Cas9 foram utilizados 500 ng de cada gRNA, 250 ng de Cas9, NEB buffer 3.1 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/mL BSA, pH 7,9) e H₂O ultrapura até completar 10 µL de volume de reação. Posteriormente, a reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Para cada complexo formado (Cas9 + sgRNA) foram adicionados 150 ng do amplicon purificado correspondente à cepa de microalga para a qual foi desenhado o gRNA. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Posteriormente, cada reação foi tratada com 1,5 µL de RNase A (37°C por 60 minutos) e 1 µL de Proteinase K (37°C por 30 minutos). O resultado do ensaio da atividade catalítica foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1%, visualizado em transiluminador de luz UV

2.15. Eletroporação com os novos complexos gRNA/Cas9

Scenedesmus obliquus e *Desmodesmus* sp. foram eletroporadas com o novo complexo gRNA/Cas9 nas mesmas condições estabelecidas anteriormente.

2.16. Desenvolvimento de um método diagnóstico de edição por qPCR

Para o estabelecimento de um método diagnóstico de mutantes editados por CRISPR-Cas9 que possa abranger um maior número de colônias ao mesmo tempo, foram desenhados primers que, além da utilização para o diagnóstico mediante PCR convencional, também possam ser utilizados na técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) (Tabela 5). Além disso, foram desenhados um par de primers para amplificar e sequenciar a região de edição dos novos gRNAs para cada cepa. As colônias de microalgas que cresceram após o processo de eletroporação com o complexo sgRNA/Cas9 foram selecionadas e transferidas para tubos

1 eppendorfs de 200 µL contendo 10 µL de água UltraPure DNase/RNase-Free Distilled
 2 (Invitrogen, Brasil). O DNA genômico foi extraído por aquecimento à 95 °C durante 10 min.
 3 A qPCR foi realizada no 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Brasil)
 4 com PowerUp SYBR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Brasil).

5

6 **Tabela 5.** Sequências de primers utilizadas no método diagnóstico por PCR para os novos
 7 gRNAs do sistema CRISPR-Cas9 RNP.

	Sequenciamento	Sequência (5' - 3')
	seqXE6-F	gtgcgcaaggagtgggtccaggg
	seqSE6-R	gtttgtgggtccactcccagga
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Diagnóstico	Sequência (5' - 3')
	diagSE6(1)-F	ctgatgaagatagatgagagtgg
	diagSE6(2)-R	ttcagcaaactcaatcacgcgg
	diagSE6(3)-F	ttcagcaaactcaatcacgcgg
	Sequenciamento	Sequência (5' - 3')
	seqXE6-F	gtgcgcaaggagtgggtccaggg
	seqDE6-R	gttttctcgtccacgccagca
<i>Desmodesmus sp.</i>	Diagnóstico	Sequência (5' - 3')
	diagDE6(1)-R	ttcagcaaactccaccacgcgg
	diagDE6(2)-R	gtgcgcaaggagtgggtccaggg
	diagDE6(3)-F	tggcctgatgaagatcgacgagg

8

9

10 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11

12 3.1. Identificação dos genes AGPS1 de *S. obliquus* e *Desmodesmus sp.*

13 O mapeamento dos dados do sequenciamento NGS permitiu a identificação parcial dos
 14 genes AGPS1 para ambas as microalgas. Entretanto, como observado nas sequências
 15 disponíveis no GenBank, o gene AGPS1 está constituído de 10 éxons, intercalado por 9 íntrons.
 16 Os resultados permitiram identificar as sequências dos éxons 4, 5, 6, 7 e 9 de ambas as cepas.
 17 A sequências obtidas somando esses 5 éxons totalizaram aproximadamente 1.000 nucleotídeos

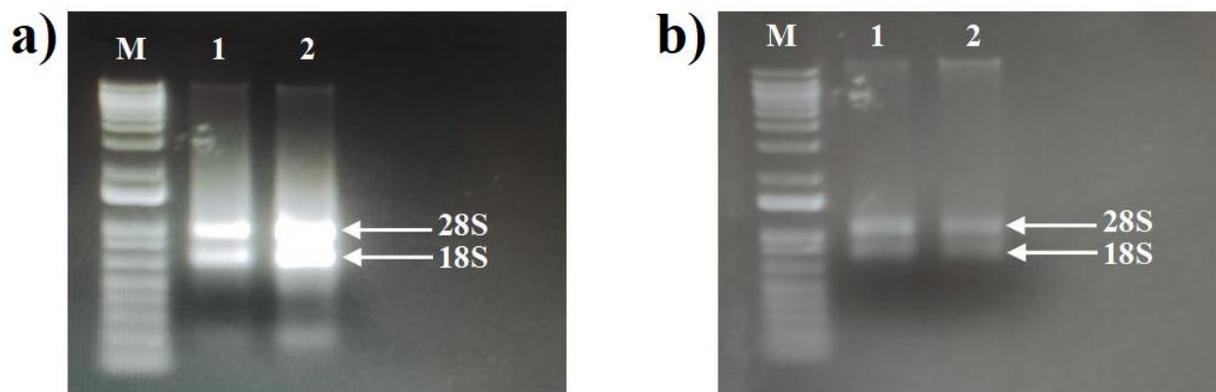
1 (nt) tanto para *S. obliquus* quanto para *Desmodesmus* sp. É importante informar que estas
2 sequências estão protegidas por confidencialidade determinada em convênio formal
3 estabelecido entre a PETROBRAS e a FURG (Convênio 5900.0113234.19.9) e, por isso, não
4 serão publicizadas aqui. A análise de identidade dessas sequências parciais traduzidas para
5 aminoácidos de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp. obtidas com a ferramenta BLAST do GenBank
6 apontou índices de 98,25% e 89,95%, respectivamente, com sequências de aminoácidos de
7 *Scenedesmus* sp. disponíveis no GenBank. Cabe ressaltar que o gene AGPS1 não está anotado
8 para *Desmodesmus* sp. no GenBank.

9

10 3.2. Extração de RNA e sequenciamento dos genes-alvo de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.

11 O estabelecimento de um protocolo para extração de RNA com alta concentração e
12 qualidade pode ser observado em gel de agarose para as duas espécies. Na Figura 1 é possível
13 visualizar a fragmentos que correspondem aos RNAs ribossomais 18S e 28S, característicos de
14 células eucariontes, confirmando a integridade do RNA extraído. Quando medidos mediante
15 fluorescência com o kit Qubit[®] RNA assay kit (Invitrogen), as amostras de *S. obliquus*
16 apresentaram uma maior concentração de RNA total (aproximadamente 800 ng/μL) quando
17 comparadas com as amostras de *Desmodesmus* sp. (aproximadamente 140 ng/μL).
18 Provavelmente, essa diferença ocorreu devido ao fato de *Desmodesmus* sp. estar na fase
19 estacionária de crescimento no momento da extração, o que não ocorreu com *S. obliquus*, que
20 se encontrava na fase exponencial de crescimento. A fase estacionária se caracteriza pela
21 diminuição da divisão celular e acúmulo de moléculas de estoque (amidos e lipídeos), podendo
22 apresentar uma parede celular mais rígida e resistente, como foi observado para *Chlorella*
23 *vulgaris* (CANELLI *et al.*, 2021).

24

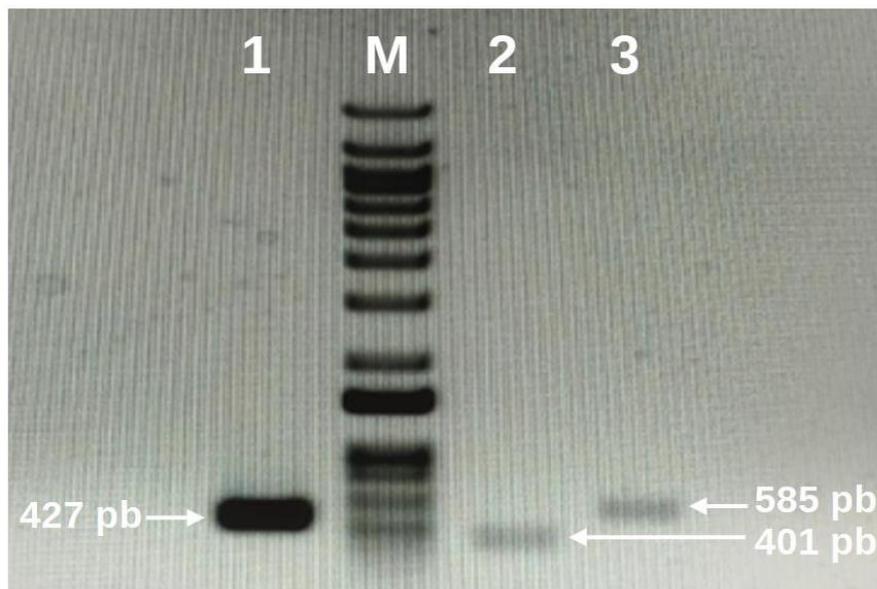


25

26 **Figura 1.** Eletroforeses em gel de agarose do RNA extraído de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp.

27 A) *S. obliquus*, B) *Desmodesmus* sp. M: Marcador Molecular; 1: Réplica 1; 2: Réplica 2.

1 Depois da extração do RNA de ambas as cepas de microalga, 1 µg de RNA foi utilizada
2 para a obtenção do cDNA por meio de retrotranscrição que, posteriormente, foi utilizado como
3 molde para amplificar as regiões alvos do gene AGPS1 de ambas as cepas e o éxon 8 da cepa
4 *Desmodesmus* sp. O resultado da PCR, realizada para amplificar a região onde se localizam as
5 sequências utilizadas para desenhar os sgRNA do sistema CRISPR/Cas9 RNP e a zona de
6 edição, mostrou a amplificação da região do gene AGPS1 no tamanho esperado, tanto para *S.*
7 *obliquus* (427 pb) como para *Desmodesmus* sp. (401 pb) (Figura 2). Também foram testados e
8 validados os primers para o sequenciamento do éxon 8 de *Desmodesmus* sp. com a amplificação
9 de um fragmento do tamanho esperado (585 pb) (Figura 4). O resultado preliminar do
10 sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR mostra total similaridade com as
11 sequências parciais dos genes das AGPS1, confirmando que todos os primers desenhados para
12 sintetizar os sgRNA estão corretos e possibilita a estratégia do silenciamento dos genes das
13 AGPS1 mediante a edição dirigida pela metodologia CRISPR/Cas9 RNP.
14



15
16 **Figura 2.** Resultado da PCR para amplificação da região onde se localizam as sequências
17 utilizadas para desenhar os sgRNA do sistema CRISPR/Cas9 RNP e a zona de edição. 1)
18 Sequenciamento da zona de edição da AGPS1 de *S. obliquus*, 2) Sequenciamento da zona de
19 edição da AGPS1 de *Desmodesmus* sp. e 3) PCR incluindo o éxon 8 da AGPS1 de
20 *Desmodesmus* sp. M: Marcador molecular.

21

22 3.3. Eletroporação de microalgas

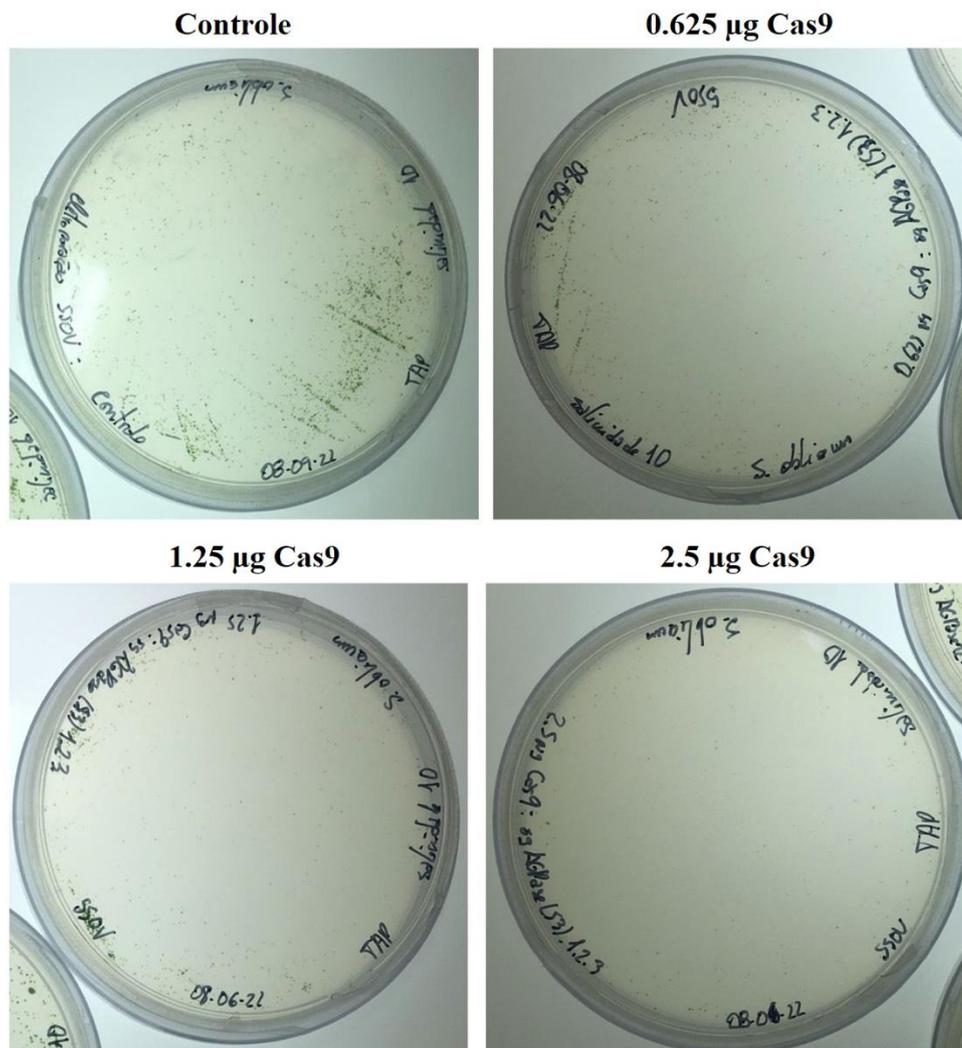
1 Tanto *S. obliquus* como *Desmodesmus* sp. apresentaram sobrevivência e crescimento
2 em placas nas diferentes voltagens de pulso único de 150V, 550V, 750V, 1000V e 1200V. As
3 condições de capacitância (50 μ F) e a resistência (∞) foram mantidas fixas a fim de diminuir o
4 número de variáveis no experimento. Essa alta sobrevivência nos permitiu submeter a ambas
5 as microalgas a um maior estresse (choque elétrico mais intenso), aumentando as nossas
6 possibilidades de alcançar o nosso objetivo sem comprometer demasiado a viabilidade das
7 células. Entretanto, quando realizado o *screening* com o vapor de iodo (I₂) para seleção das
8 potenciais cepas produtoras de lipídeos, todas as colônias, de ambas as cepas, apresentaram
9 coloração roxa, sendo reprovadas no teste de *screening*, inclusive nas colônias obtidas das
10 maiores voltagem como 1000V e 1200V, tratamento no qual esperávamos obter uma maior
11 quantidade de possíveis mutantes, pois uma maior voltagem significaria microporos maiores
12 facilitando a incorporação do complexo gRNA:Cas9 no interior celular.

13 Posteriormente foi testado outra programação de eletroporação com multiplex pulsos
14 (*poring pulse + transfer pulse*) a fim de melhorar a eletroporação e obter os possíveis mutantes
15 editados. Nesta nova tentativa as microalgas e o complexo gRNA:Cas9 iniciavam com um pulso
16 duplo de diferentes voltagens (150, 550, 750 e 1000V) com a finalidade de introduzir o
17 complexo no interior celular (*poring pulse*). Posteriormente, a solução foi submetida a 5 pulsos
18 consecutivos a baixa voltagem (20V) com o objetivo transferir os possíveis complexos que
19 tenham sido introduzidos no interior celular desde o citosol ao núcleo celular (*transfer pulse*)
20 para poder exercer ali a sua função de clivagem no alvo desejado. Posteriormente, as colônias
21 obtidas foram categorizadas ou etiquetadas numa placa nova (grid) e submetidas às análises de
22 diagnóstico molecular por PCR de colônia.

23 Em vista que um dos possíveis fatores determinantes na falta de sucesso que possa ser
24 a toxicidade da enzima de clivagem Cas9, ou do tampão utilizado, foram testadas, na cepa *S.*
25 *obliquus*, diferentes concentrações da enzima Cas9 (2.5, 1.25 e 0.625 μ g). Nesse experimento,
26 foi retirado o tampão utilizado na formação do complexo e mantendo a proporção de 5:1 μ g de
27 Cas9 e gRNA, respectivamente. Existem diferentes trabalhos que aplicam a metodologia
28 CRISPR/Cas9 em outros organismos sem o uso do tampão ou com prévia filtração da enzima
29 para retirada do tampão (NADUTHODI et al., 2021). Para não ter o efeito de outras variáveis,
30 a eletroporação foi realizada para todos os tratamentos a voltagens de 2 x 550 V + 5 x 20 V
31 (*poring pulse + transfer pulse*). Quanto ao surgimento das colônias, foi observado um maior
32 número de colônias para as placas controle (eletroporadas sem o complexo gRNA:Cas9) e uma
33 redução conforme aumentava a concentração da Cas9 (Figura 3). Embora todas as placas
34 tenham apresentado surgimento de colônias, essa redução proporcional indica uma possível

1 toxicidade da Cas9 na cepa *S. obliquus*. A toxicidade da Cas9 já tem sido relatada em outros
2 microrganismos fotoautotróficos (NADUTHODI; BARBOSA; VAN DER OOST, 2018).
3 Diante os resultados obtidos, nas próximas tentativas de eletroporação a quantidade de Cas9
4 utilizada foi reduzida de 5 µg para 2.5 µg.

5



6

7 **Figura 3.** Placas com colônias resultantes da eletroporação de *S. obliquus* a 2 x 550V + 5 x
8 20V, e diferentes concentrações de Cas9 utilizadas: Controle (0 µg), 0,625 µg, 1,25 µg e 2,5
9 µg.

10

11 3.4. Screening mediante coloração com vapor de I₂

12

13 Lamentavelmente, a metodologia de *screening* por exposição ao vapor de I₂ que reporta
14 cepas de microalgas com déficit ou supressão da síntese de amido, não revelou nenhuma colônia
com déficit de amido. De todas as colônias analisadas mediante esta metodologia (Figura 4),

1 não foi observada nenhuma colônia que não reagiu ao vapor de I₂, sendo que nenhuma colônia
2 foi identificada como possível cepa editada.

3



4

5 **Figura 4.** Placa submetida a teste de vapor de I₂ como método para o *screening* de colônias
6 com redução da síntese de amido e, possivelmente, editadas mediante ação do complexo
7 gRNA:Cas9 de ambas as cepas: *S. obliquus* (esquerda) e *Desmodesmus* sp. (direita).

8

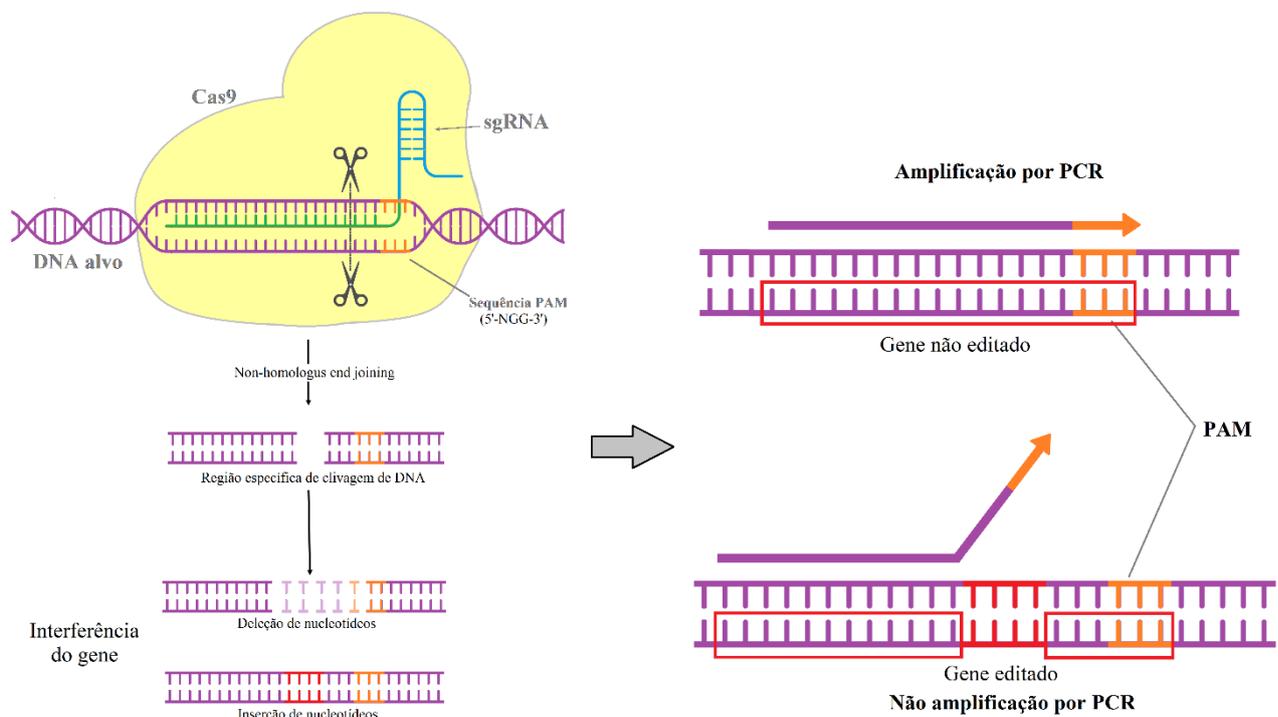
9 De fato, o *screening* por vapor de iodo (I₂) é uma metodologia que pode ser empregada
10 para a seleção de cepas de microalgas com déficit total ou redução de amido (DE JAEGER *et*
11 *al.*, 2014; SIRIKHACHORNKIT *et al.*, 2016; WORK *et al.*, 2010). A premissa da aplicação
12 desse método baseia-se no fato de que a produção de amido pelas microalgas está inversamente
13 relacionada com a produção de lipídeos, ou seja, quanto menor o acúmulo de amido, maior será
14 o de lipídeos. Uma vez que esse teste detecta a presença de amido e, na edição por CRISPR-
15 Cas9 RNP, propomos fazer uma deleção em uma região de um gene específico que codifica a
16 AGPS1 a fim de inativá-lo e bloquear/ou diminuir a via de síntese de amido, não podemos
17 garantir que a edição realizada terá um impacto a nível de inibir a produção total de amido a
18 ponto de ser detectado visivelmente pelo método do vapor de iodo (I₂). Portanto, talvez essa
19 metodologia não seja a melhor a ser aplicada para a seleção de mutantes editados por CRISPR-
20 Cas9 RNP. Deste modo, foi necessário o desenvolvimento ou utilização de uma metodologia
21 de *screening* de maior precisão e focada diretamente na edição que possa ser produzida pela
22 tecnologia CRISPR/Cas9, e não pela medição ou avaliação de efeitos indiretos produzidos pela
23 edição.

24

1 3.5. Método diagnóstico por PCR em mutantes editados por CRISPR-Cas9 RNP

2 Como alternativa ao teste de vapor de I₂, foi desenvolvido um método de diagnóstico
3 por PCR, onde foram utilizados primers específicos que anelam na região de corte prevista para
4 o complexo gRNA/Cas9. As microalgas que tenham sido editadas pelo complexo gRNA:Cas9
5 não apresentam amplificação por PCR, devido a que a região de corte onde anela o primer terá
6 mudado a sua sequência devido a adição de inserções ou deleções (*indels*) mediante “*Non-*
7 *homologus end joining*” (NHEJ). Essas *indels* aleatórias de nucleotídeos ocorrem à medida que
8 a célula liga a ruptura do DNA, resultando na modificação da sequência original, impedindo o
9 anelamento do primer diagnóstico. Por outro lado, as microalgas que não tenham sido editadas
10 apresentam amplificação por PCR devido ao anelamento correto do primer na região de corte
11 (veja esquema geral na Figura 5 e mais detalhamento na Figura 6).

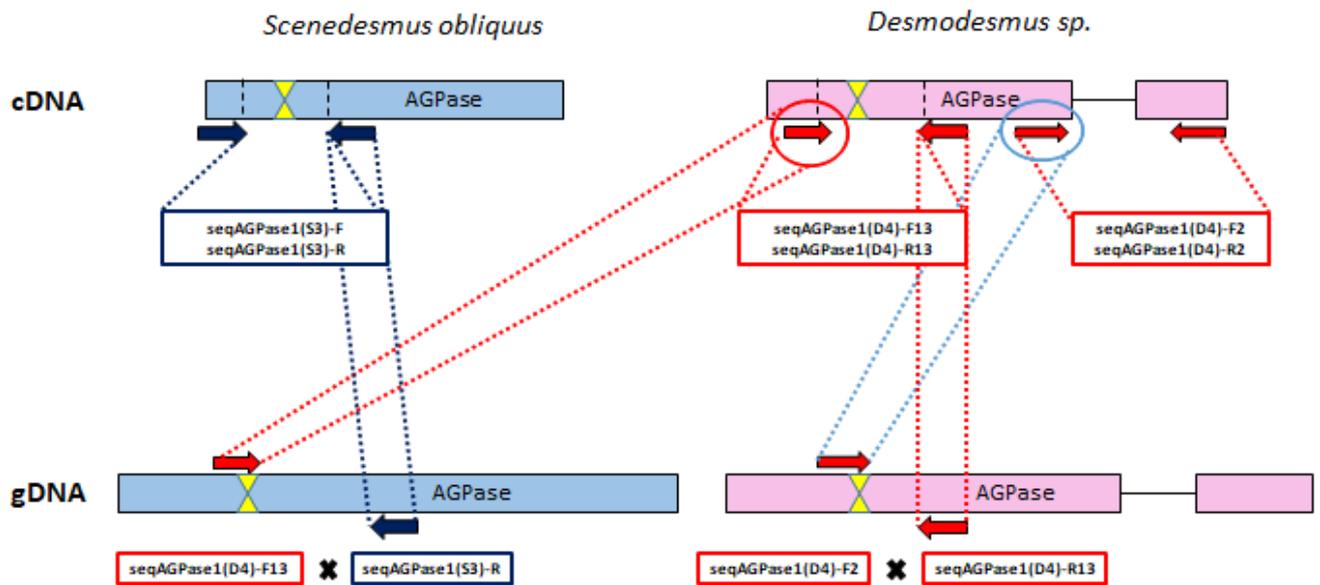
12



13

14 **Figura 5.** Esquema geral do PCR diagnóstico para edição gênica. Ilustração do anelamento de
15 primers na região de corte do sistema CRISPR/Cas9. NHEJ é induzido por CRISPR/Cas9. Após
16 o DNA ser clivado pela Cas9, a célula repara a quebra de dupla fita por NHEJ. PAM:
17 protospacer adjacent motif; sgRNA: single guide RNA.

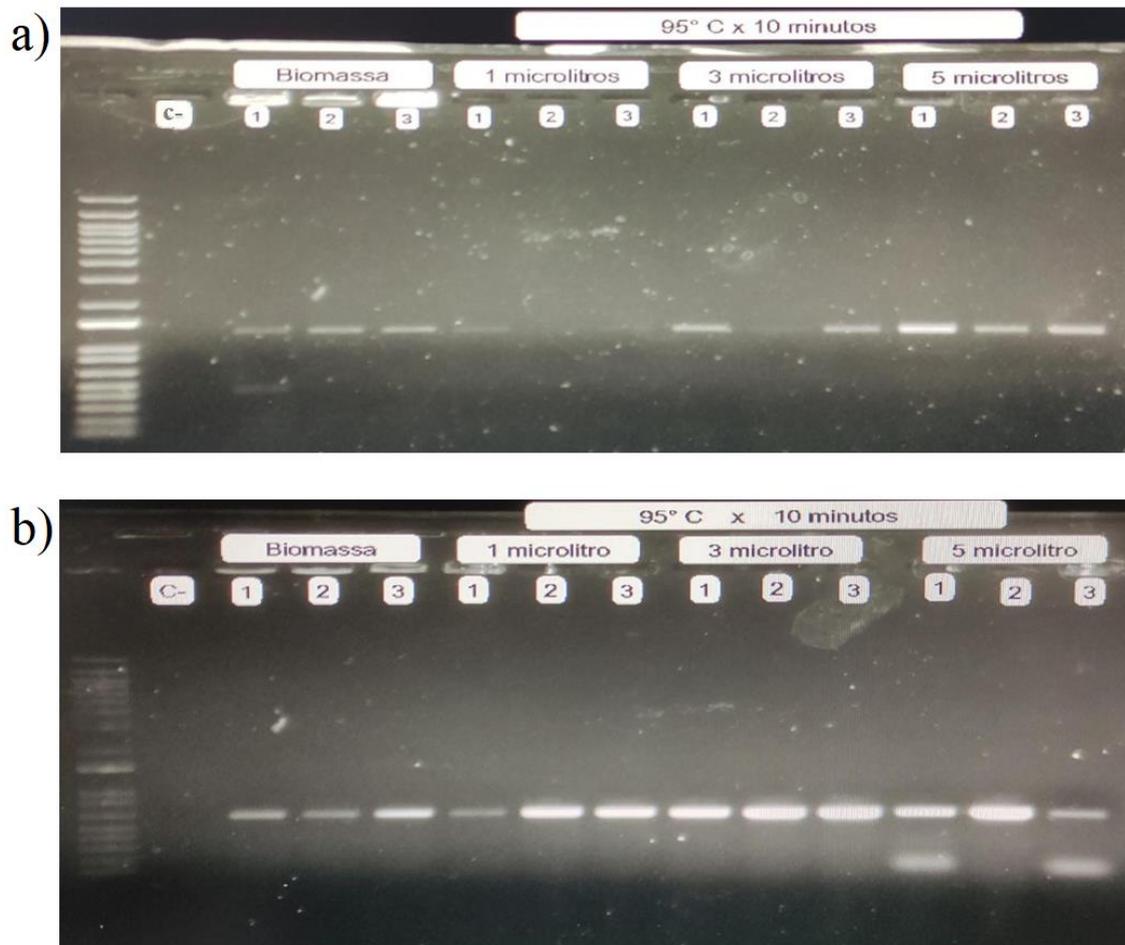
18



1
 2 **Figura 6.** Esquema de primers utilizados como *screening* de cepas editadas mediante PCR
 3 diagnóstico. Caixas azuis simbolizam a sequência parcial da AGPS1 de *S. obliquus* e caixas
 4 vermelhas simbolizam as sequências parciais da AGPS1 de *Desmodesmus sp.* As setas
 5 simbolizam os primers e os triângulos amarelos a região de corte do complexo gRNA:Cas9.
 6

7
 8 O resultado do teste para a otimização do diagnóstico por PCR de colônia revelou ser
 9 eficiente para ambas as cepas de microalgas. Porém, especificamente para *S. obliquus*, os
 10 melhores resultados obtidos foram para os tratamentos com preaquecimento e utilizando
 11 maiores quantidades de sobrenadante (5 μ L) como molde de DNA na reação de PCR. Já os
 12 tratamentos de 1 μ L e de uso direto de biomassa exibiram pouca amplificação e, em algumas
 13 réplicas, imperceptíveis. Por outro lado, a cepa *Desmodesmus sp.* mostrou uma melhor
 14 sensibilidade a estas análises com bandas bem visíveis em todas as condições de
 15 preaquecimento de biomassa (1, 3, e 5 μ L). O uso de biomassa direta na reação de PCR mostrou
 16 também amplificação, porém as bandas exibidas eram de menor intensidade (Figura 7). É
 17 provável que o tamanho das células tenha uma influência direta na sensibilidade desse análises.
 18 Com um tamanho maior, *S. obliquus* poderia precisar de uma maior energia para a ruptura de
 19 uma única célula comparada com a cepa *Desmodesmus sp.* que tem um tamanho menor, além
 20 disso, a composição da parede/membrana de ambas as cepas poderia também ter uma influência
 21 direta na hora da quebra celular. Esse fato poderia explicar a maior intensidade das bandas dos
 22 tratamentos preaquecidos de *Desmodesmus sp.* que conseguiria extrair maior quantidade de
 DNA genômico, que estaria disponível para a amplificação por PCR. Baseado nos dados

1 obtidos, ficou estabelecido que para a PCR diagnóstico de colônia da cepa *S. obliquus* a melhor
2 opção é utilizar biomassa preaquecida e 5 µL de sobrenadante como molde na reação de PCR.
3 Já para a cepa *Desmodesmus* sp. pode-se utilizar qualquer dos três volumes de sobrenadante
4 obtido a partir de biomassa preaquecida como molde na reação de PCR diagnóstico.
5



6
7 **Figura 7.** Eletroforeses da PCR diagnóstico para as cepas a) *S. obliquus* e b) *Desmodesmus* sp.
8 O marcador molecular (1Kb Plus DNA Ladder) se localiza na esquerda de ambas as
9 eletroforeses; C-: Controle negativo. Biomassa: tratamento que utiliza biomassa diretamente
10 como molde na reação de PCR, e 1, 3 e 5 µL indicam o volume de sobrenadante de biomassa
11 preaquecida, utilizado como molde na reação de PCR. 1, 2 e 3 indicam o número da réplica de
12 cada tratamento experimental

13
14 Apesar de ambas as cepas de microalgas apresentarem crescimento em placas em todas
15 as condições de voltagens testadas e também nas diferentes quantidades de Cas9 utilizadas
16 (Tabela 6), das 100 colônias analisadas para cada tratamento, todas apresentaram amplificação,

1 o que significa que não tem inserção de nucleotídeos, e por tanto, são reprovadas no teste de
2 diagnóstico.

3

4 **Tabela 6.** Número de colônias analisadas para as diferentes condições de eletroporação
5 (Voltagem e quantidade de Cas9 utilizada) mediante teste de vapor de I₂ e PCR diagnóstico de
6 colônias para o *screening* de possíveis edições na AGPS1 de ambas as cepas *S. obliquus* e
7 *Desmodesmus* sp.

Voltagem	µg Cas9/eletroporação							
	<i>S. obliquus</i>				<i>Desmodesmus</i> sp.			
	5	2,50	1,25	0,625	5	2,5	1,25	0,625
150 V	100	-	-	-	100	-	-	-
550 V	100	100	100	100	100	-	-	-
750 V	100	-	-	-	100	-	-	-
1000 V	100	-	-	-	100	-	-	-
1200 V	100	-	-	-	100	-	-	-
2x150 V	-	100	-	-	-	100	-	-
2x550 V	-	100	-	-	-	100	-	-
2x750 V	-	100	-	-	-	100	-	-
2x1000 V	-	100	-	-	-	100	-	-

8

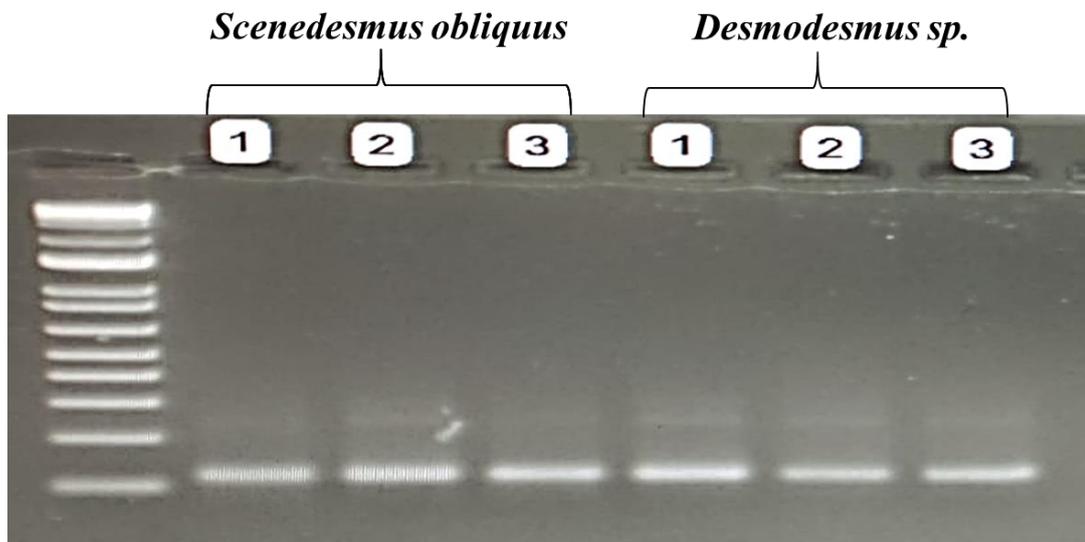
9

10 3.6. Síntese dos novos gRNAs

11 Após a análise dos resultados das eletroporações de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp., não
12 obtivemos nenhuma colônia positiva para edição por CRISPR-Cas9 RNP, tanto pelo teste de
13 *screening* por vapor de iodo (I₂) como pelo método diagnóstico por PCR. Assim, novos primers
14 foram desenhados para a síntese de novos RNAs guias, onde foi modificada a região de corte
15 do gene da AGPS1 com o intuito de encontrar uma região “mais favorável” para a Cas9 realizar
16 a edição. Nesta situação, foram desenhados também primers diagnósticos específicos para cada
17 novo gRNA desenhado. Para cada cepa de microalga, foram desenhados três novos gRNAs e,
18 portanto, três novos primers diagnósticos também.

19 O resultado da PCR realizada para amplificar os novos moldes dos gRNAs, mostrou
20 amplificação na altura esperada, tanto para *S. obliquus* como para *Desmodesmus* sp. (Figura 8).
21 Após a purificação e quantificação dos fragmentos, estes foram utilizados para síntese dos
22 novos gRNAs (Figura 9).

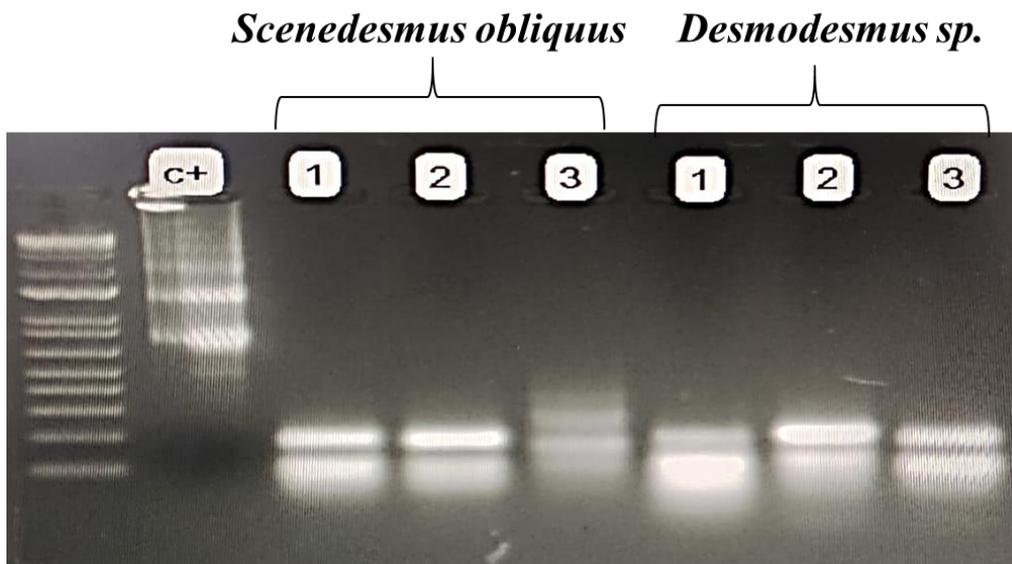
1



2

3 **Figura 8.** Resultado da PCR para amplificação das regiões onde se localizam as sequências
4 utilizadas para desenhar os novos gRNAs do sistema CRISPR/Cas9 RNP de *S. obliquus* e
5 *Desmodesmus sp.*. 1 Kb Plus DNA Ladder (Marcador molecular) está localizado à esquerda.

6



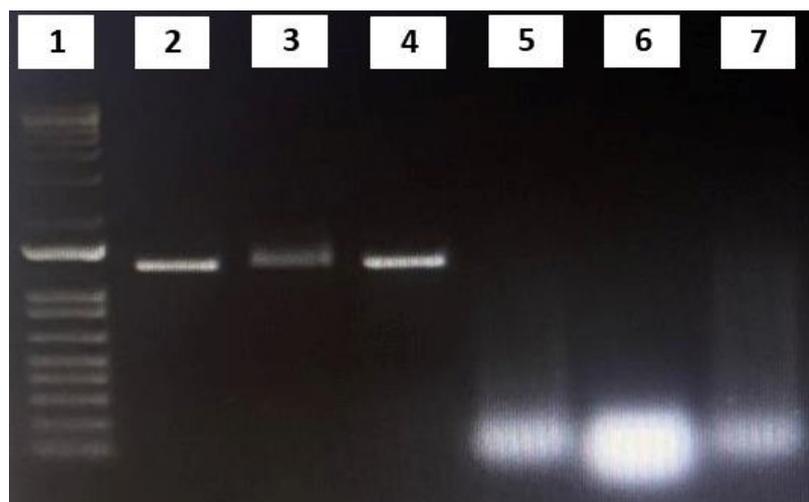
7

8 **Figura 9.** Resultado da síntese dos três novos gRNAs para o gene da AGPS1 de *Scenedesmus*
9 *obliquus* e *Desmodesmus sp.*, sintetizados com o MEGAscript™ T7 Transcription Kit. 1 Kb
10 Plus DNA Ladder (marcador molecular) está localizado à esquerda. C+: Controle positivo
11 fornecido pelo próprio Kit.

12

13 **3.7. Ensaio de eficácia de clivagem dos sgRNAs**

1 Os resultados do ensaio in vitro da atividade de clivagem da Cas9 dirigida pelos novos
2 gRNAs desenhados para *Scenedesmus obliquus* mostraram que os três tipos de complexos RNP
3 foram efetivos na degradação do amplicon que contém a região de edição para os três guias,
4 indicando que para *S. obliquus* os gRNAs foram corretamente desenhados e, quando associados
5 a Cas9, clivam a sequência alvo do gene que codifica a AGPS1 (Figura 10). O controle negativo
6 (somente o amplicon de PCR) manteve o tamanho inicial sem sinal de degradação ou clivagem,
7 indicando que nos tratamentos contendo o complexo Cas9/gRNAs, a clivagem do amplicon foi
8 realizada pela Cas9. Para os outros controles (amplicon + Cas9), novamente não foi observada
9 degradação do amplicon, confirmando que a enzima Cas9, por si mesma, não possui a
10 capacidade de clivar o fragmento de DNA, necessitando de um “guia” para exercer sua
11 atividade catalítica. Por último, não foi observada nenhuma diferença entre os controles de
12 amplicon+Cas9 com e sem tratamento com Proteinase K, determinando que a Cas9 não tem
13 nenhuma interferência nos resultados observados na eletroforese.
14

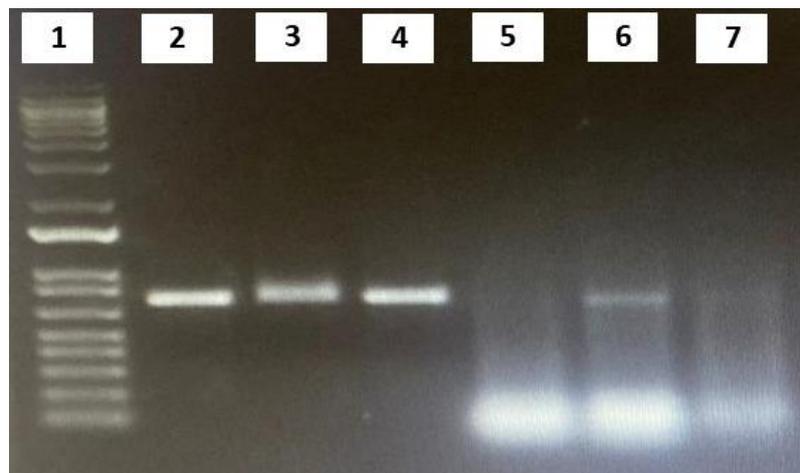


15
16 **Figura 10.** Gel de eletroforese mostrando os resultados do teste de clivagem dos complexos
17 Cas9/gRNA (1, 2 e 3) para amplicon do gene AGPS1 de *Scenedesmus obliquus*: **1)** Marcador
18 molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen), **2)** Controle – (amplicon), **3)** Amplicon+Cas9
19 tratado com Proteinase K, **4)** Amplicon+Cas9 sem tratamento com Proteinase K, **5)** Amplicon
20 + Cas9:gRNA-1, **6)** Amplicon + Cas9:gRNA-2, **7)** Amplicon + Cas9:gRNA-3.
21

22 Observando o resultado da eletroforese para *Desmodesmus sp.* mostrado na Figura 11,
23 observamos que os complexos Cas9/gRNAs 1 e 3 apresentaram degradação do amplicon
24 utilizado como alvo. Por outro lado, o gRNA 2 mostrou pouca efetividade de clivagem, não
25 conseguindo degradar totalmente o amplicon correspondente. Existem duas possibilidades para

1 esta redução da atividade: 1) o gRNA não foi produzido adequadamente, ou 2) A região
2 escolhida para o desenho do gRNADE6-2 da AGPS1 não é uma região favorável para a
3 aplicação do sistema CRISPR/Cas9 RNP e que impede o correto pareamento do complexo por
4 homologia com a sua sequência alvo. Os controles negativos (somente o amplicon e amplicon
5 + Cas9) não apresentaram degradação e não foram observadas diferenças entre os controles
6 tratados com e sem Proteinase K (Figura 11).

7
8
9



10

11 **Figura 11.** Gel de eletroforese mostrando os resultados do teste de clivagem dos complexos
12 Cas9/gRNA (1, 2 e 3) para amplicon do gene AGPS1 de *Desmodemus* sp.: **1)** Marcador
13 molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen, **2)** Controle – (amplicon), **3)** Amplicom+Cas9
14 tratado com Proteinase K, **4)** Amplicon+Cas9 sem tratamento com Proteinase K, **5)** Amplicon
15 + Cas9:gRNA-1, **6)** Amplicon + Cas9:gRNA-2, **7)** Amplicon + Cas9:gRNA-3.

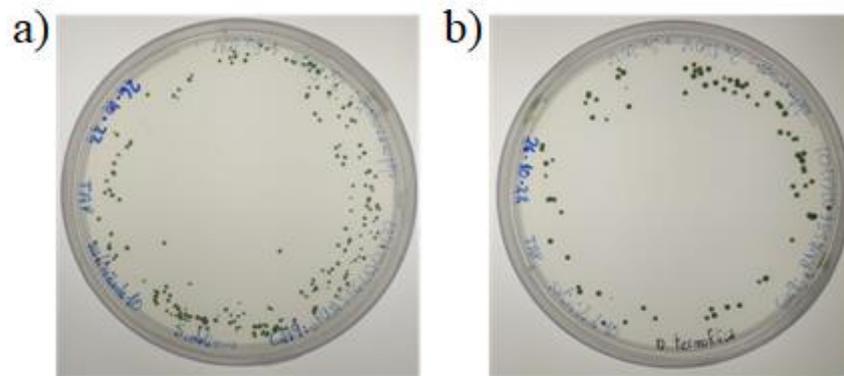
16

17 **3.8. Eletroporação de microalgas com os novos gRNAS**

18 A eletroporação de ambas as cepas com o complexo formados com os novos primers
19 foi feita nas seguintes condições de voltagem: pulso duplo de 150, 550, 750 e 1000V como é
20 descrito na Tabela 6 para os antigos RNAs guias. Nessa situação, as quantidades de Cas9
21 empregadas foram de 1,25 µg de Cas9 para cada RNA guia. *S. obliquus* foi eletroporada com
22 complexos que carregam três tipos de gRNAs, o que significa que por cada cubeta de
23 eletroporação/tratamento foram eletroporadas com 3.75 µg de Cas9 totais (1.25 µg x 3). Para a
24 cepa *Desmodemus* sp., as eletroporações foram feitas apenas com complexos carregados com
25 dois tipos de guias (gRNADE6-1 e gRNADE6-3), o guia gRNADE6-2 foi descartado devido à
26 falta de uma PCR diagnóstico para a sua região de clivagem. *S. obliquus* como *Desmodemus*

1 sp. apresentaram sobrevivência quando eletroporadas com o novo complexo gRNA/Cas9 em
2 todas as condições de eletroporação testadas. A Figura 12 mostra o surgimento de colônias em
3 placas após uma semana da eletroporação.

4



5

6 **Figura 12.** Placas com colônias de *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp. após uma semana da
7 realização do experimento de eletroporação. A) *Scenedesmus obliquus* na condição de
8 eletroporação de 2x550 V + 5x20 V e B) *Desmodesmus* sp. na condição de eletroporação de
9 2x150 V + 5x20 V.

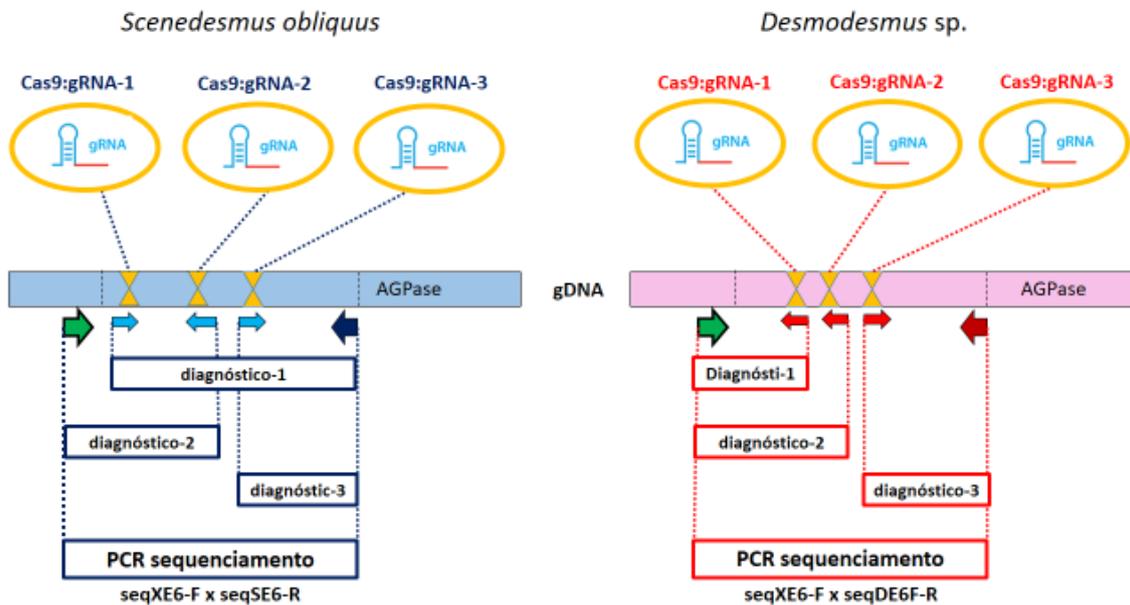
10

11 **3.9. Diagnóstico de colônias para os novos primers mediante PCR e qPCR**

12 Para o *screening* ou diagnóstico de cepas possivelmente editadas com os novos
13 complexos, utilizou-se exclusivamente metodologias moleculares, especificamente PCR
14 convencional e qPCR. Os novos primers diagnósticos foram desenhados para anelar na região
15 de corte prevista para a Cas9 e junto com um dos primers exteriores (primers de sequenciamento
16 da região de edição) foram utilizados para a PCR diagnóstico amplificando a região de corte
17 com um produto de PCR de tamanho aproximado de 200 pb, como indica o esquema da Figura
18 13. Primeiramente, foram validadas as PCRs diagnósticos para as três regiões de edição dos
19 três RNAs guias de ambas as cepas utilizando DNA genômico como molde. O resultado foi
20 visualizado em gel de agarose ao 1% (Figura 14). Para a cepa *S. obliquus* foi observado
21 amplificação na altura esperada para as três PCRs diagnóstico. Ao mesmo tempo, também se
22 observou correta amplificação e sem interferências quando as PCRs diagnóstico foram
23 combinadas com a PCR que amplifica a região de sequenciamento, servindo como controle
24 positivo de reação para as três PCR diagnóstico de *S. obliquus* (Figura 14a). Para a cepa
25 *Desmodesmus* sp. também foi observada correta amplificação para as PCRs diagnóstico
26 correspondentes aos guias gRNADE6-1 e gRNADE6-3 (Figura 14b).

27

1
2



3

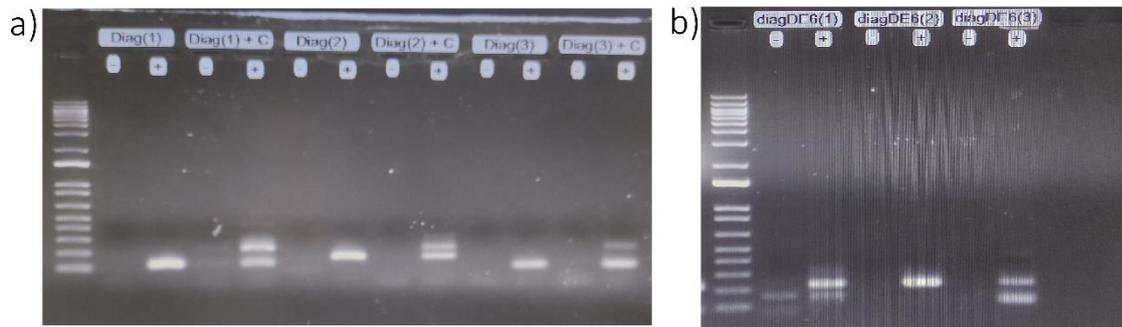
4 **Figura 13.** Esquema de primers utilizados como *screening* de cepas editadas mediante PCR
5 diagnóstico. Caixas azuis simbolizam a sequência parcial da AGPS1 de *S. obliquus* e caixas
6 vermelhas simbolizam as sequência parcial da AGPS1 de *Desmodesmus* sp. Os triângulos
7 amarelos simbolizam a região de corte da Cas9. As setas azuis simbolizam os primers
8 específicos para a cepa *S. obliquus*, enquanto setas vermelhas simbolizam primers específicos
9 para a cepa *Desmodesmus* sp.; a seta verde simboliza o primer seqXE6-F que anela na AGPS1
10 de ambas cepas e que pode ser utilizado tanto para o sequenciamento da região de edição
11 como para o diagnóstico de edição de alguns guias de ambas as cepas.

12

13 Ambas PCR diagnóstico foram amplificadas junto com os novos primers de
14 sequenciamento podendo utilizar esses como controle positivo da reação de PCR diagnóstico
15 para a cepa *Desmodesmus* sp.. Infelizmente não se observou amplificação para PCR diagnóstico
16 correspondente ao guia gRNADE6-2, que só amplificou o controle positivo de reação, o que
17 determina que não temos um método de *screening* para possíveis edições causadas pela Cas9
18 direcionada pelo guia gRNADE6-2 da cepa *Desmodesmus* sp. No ensaio da atividade *in vitro*
19 da Cas9 associada a esse RNA guia já tínhamos observado uma clivagem ou degradação afetada
20 (pouca efetividade) quando foi testada junto com região alvo que contém a sequência
21 complementar ao gRNADE6-2 (Figura 11). Uma vez validadas as PCRs diagnóstico, foram
22 submetidas a este teste 50 colônias da placa obtida da eletroporação 2x750V + 5x20V da cepa
23 *S. obliquus*. Os resultados revelaram amplificação para todos os diagnósticos (1, 2 e 3) para

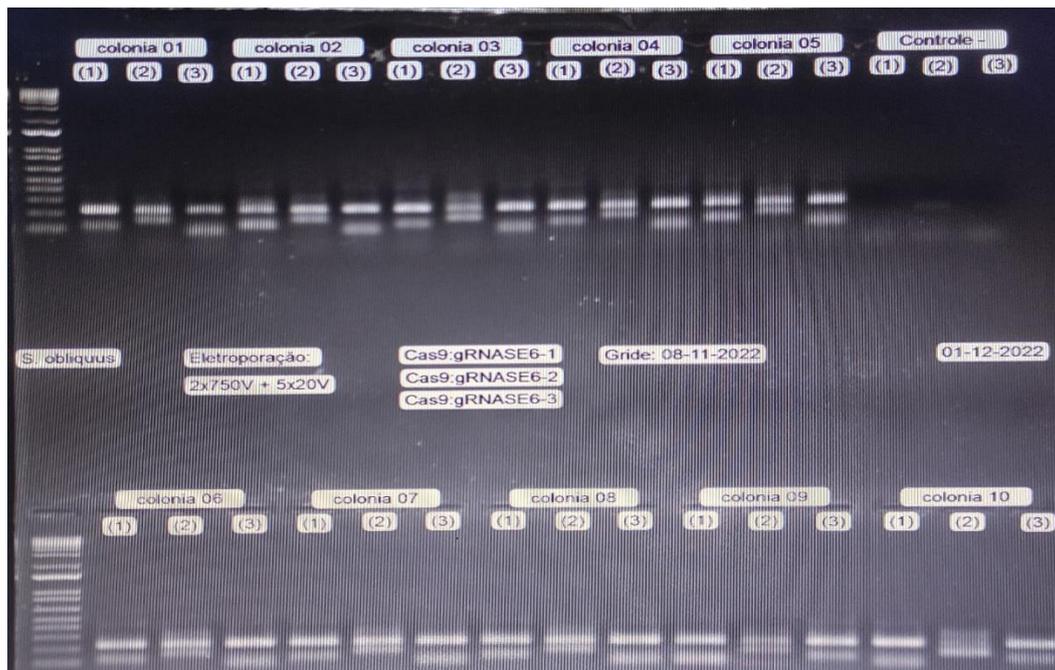
1 todas as colônias testadas (Figura 15), sendo essas colônias reprovadas e por conseguinte, não
2 apresentam edição.

3



4

5 **Figura 14.** Validação dos novos primers de sequenciamento e diagnósticos para ambas as cepas
6 *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp. a) PCR utilizando os primer específicos e gDNA da cepa *S.*
7 *obliquus*. Diag(1), Diag(2) e Diag(3) representam a PCR diagnostico para os guias gRNASE-
8 1, gRNASE-2 e gRNASE-3 respectivamente. “+C”: utilização do par de primer de
9 sequenciamento (seqXE6-F x seqSE6-R) como controle positivo de reação de PCR. b) PCR
10 utilizando os primers específicos e gDNA da cepa *Desmodesmus* sp. diagDE6(1), diagDE6(2)
11 e diagDE6(3) representam a PCR diagnostico para os guides gRNADE6-1, gRNADE6-2 e
12 gRNADE6-3 respectivamente. Junto a todos as PCRs diagnostico da cepa *Desmodesmus* sp.
13 foram adicionados também o par de primers específicos para o sequenciamento da região de
14 edição da Cas9 (seqXE6-F x seqDE6-R) como controle positivo da reação de PCR. Para ambas
15 as cepas se utilizou como marcador molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen) localizado
16 na primeira via de cada eletroforese; “-”: Controle negativo que utiliza H₂O ultrapura como
17 molde na reação de PCR. “+”: reação de PCR com gDNA como molde.
18



1
 2 **Figura 15.** Eletroforese das PCR diagnóstico de colônias de *S. obliquus* com os novos primers,
 3 submetidas a eletroporação (2x750 V + 5x20 V) com os complexos formados com os guias:
 4 gRNASE.-1, gRNASE6-2 e gRNASE6-3. Todas as reações de PCR utilizaram o par de primers
 5 controle seqXE6-F x seqSE6-R e o primer diagnóstico correspondente. Na esquerda se localiza
 6 o marcador molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). (1), (2) e (3) determinam o tipo de
 7 diagnóstico para a região de edição complementar aos guias gRNASE.-1, gRNASE6-2 e
 8 gRNASE6-3, respectivamente.

9
 10 A PCR diagnóstico parece ser um método de *screening* confiável pela sua especificidade
 11 e relativamente rápido. Assim, o *screening* por qPCR torna-se uma alternativa mais rápida com
 12 a mesma especificidade que a PCR convencional. Nesta outra metodologia de *screening* se
 13 aplica o mesmo princípio de não amplificação por incompatibilidade do primer em caso de
 14 houver edição genica do sistema CRISPR/Cas9. Só que para a qPCR não se precisa visualização
 15 por eletroforese, uma vez que o resultado pode ser visualizado diretamente num computador,
 16 reduzindo amplamente o tempo de análise, podendo analisar um maior número de amostras por
 17 rodada (96 reações) e evitando possíveis contaminações cruzadas na hora de carregar as
 18 amostras de PCR no gel de agarose.

19 A metodologia de diagnóstico por qPCR foi utilizada para avaliar as possíveis edições
 20 por CRISPR/Cas9. No total, foram analisadas 400 colônias de cada cepa, como indicado na
 21 Tabela 7. Infelizmente, todas as colônias analisadas apresentaram amplificação quando foram
 22 submetidas ao teste de qPCR. Na Figura 15 pode-se observar as curvas de *melting* resultantes

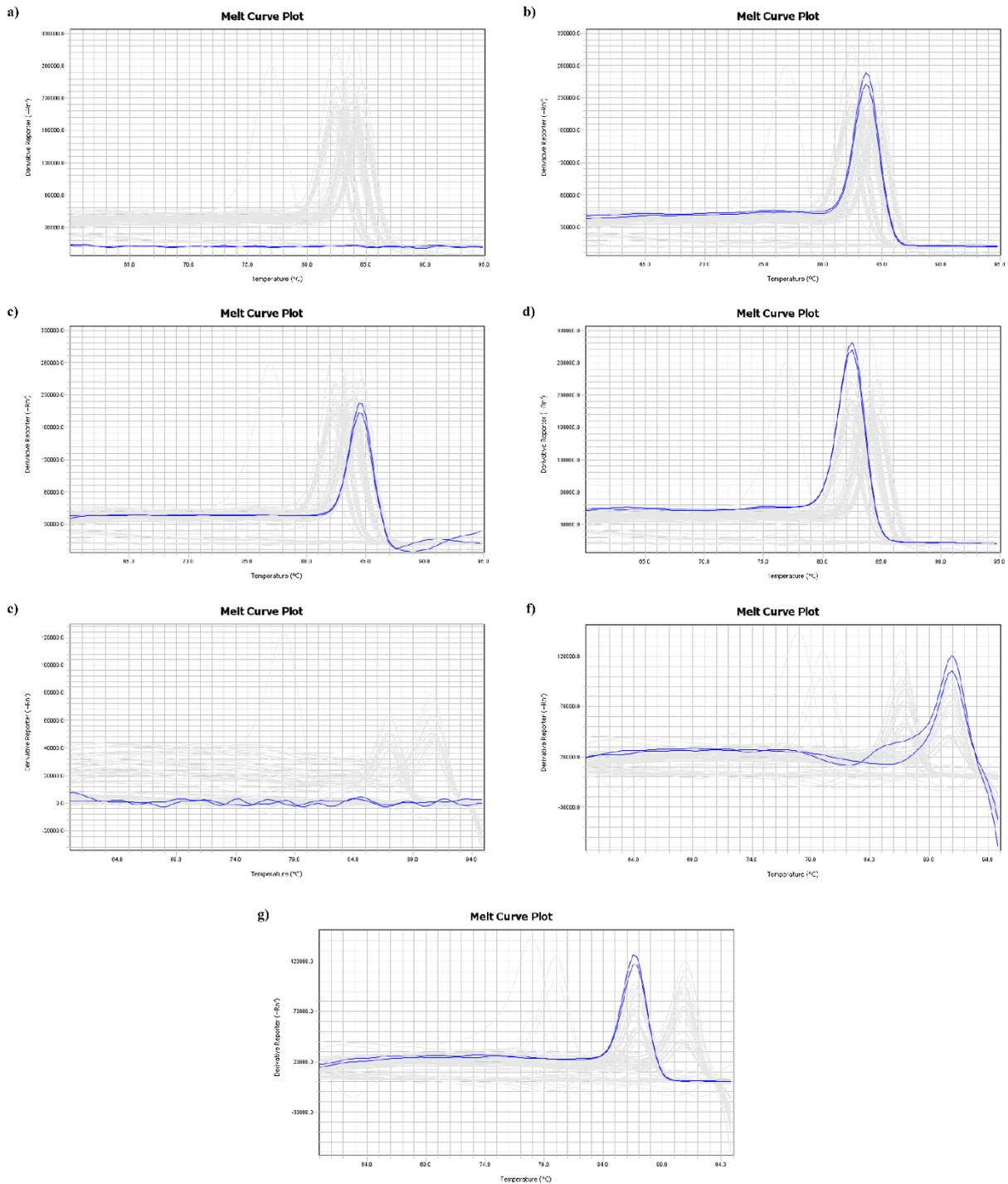
1 da amplificação de uma qPCR para as cepas *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp. Quando não se
2 observa a curva de *melting*, como no caso da reação do controle negativo (sem adição de
3 gDNA), pode se considerar que a colônia submetida ao teste apresenta uma possível edição
4 mediante ação do complexo CRISPR/Cas9. Por outro lado, a presença da curva característica
5 do *melting* determina que a colônia analisada não apresentou nenhuma edição gênica.

6

7 **Tabela 7.** Número de colônias analisadas para as diferentes condições de eletroporação
8 (Voltagem) mediante teste molecular de diagnóstico de colônias por qPCR.

	2x150 V	2x550 V	2x750 V	2x1000 V
<i>S. obliquus</i>	100	100	100	100
<i>Desmodesmus</i> sp.	100	100	100	100

9



1
 2 **Figura 15.** Screening de possíveis colônias editadas mediante análise de curva de melting da
 3 qPCR. Exemplo da análise diagnóstico de colônias após eletroporação de *S. obliquus* (2x750 V
 4 + 5x20 V, Colônia 10) e *Desmodesmus* sp. (2x750 V + 5x20 V, colônia 15). a) Controle
 5 negativo das análises diagnóstico para a cepa *S. obliquus*, b) Diagnóstico qPCR para a edição
 6 do complexo Cas9:gRNASE6-1 (*S. obliquus*), c) Diagnóstico qPCR para a edição do complexo
 7 Cas9:gRNASE6-2 (*S. obliquus*), d) Diagnóstico qPCR para a edição do complexo
 8 Cas9:gRNASE6-3 (*S. obliquus*), e) Controle negativo do análises diagnóstico para a cepa

1 *Desmodesmus* sp., f) Diagnóstico qPCR para a edição do complexo Cas9:gRNADE6-1
2 (*Desmodesmus* sp) e g) Diagnóstico qPCR para a edição do complexo Cas9:gRNADE6-3
3 (*Desmodesmus* sp.).
4

5 Em vista aos resultados obtidos até o momento, existem diferentes cenários que
6 poderiam explicar a falta de resultados positivos na obtenção de cepas editadas mediante a
7 tecnologia CRISPR/Cas9 RNP. A eficiência da tecnologia CRISPR/Cas9 pode variar
8 dependendo de vários fatores, como o tipo de método de edição e a escolha do alvo para a
9 edição. Embora o design dos gRNAs pelo programa utilizado leva em conta a melhor região
10 possível para a edição de ambas as cepas, esses programas se baseiam em algoritmos criados a
11 partir de cepas de microalgas que são comumente utilizadas como organismos modelos de
12 pesquisa como, por exemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp.
13 Foram essas microalgas que se utilizou como referência para o desenho dos gRNAs 1, 2 e 3
14 para ambas cepas *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp. Embora existam alguns trabalhos de
15 engenharia genética em *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp., até a presente data não existem relatos
16 de edição gênica nessas espécies com a tecnologia CRISPR/Cas9 e, muito menos, ferramentas
17 de estudos *in silico* ou de desenho de gRNAs específicos que possam melhorar o uso da
18 tecnologia CRISPR/Cas9 nessas espécies. Por isso, e devido à pouca informação ou ferramentas
19 disponíveis para outras cepas não modelo, o desenho e o uso desse tipo de ferramentas pode ser
20 menos precisa. Outro fator possível que pode ser limitante na hora de aplicar a tecnologia
21 CRISPR/Cas9 RNP é a capacidade de reparo do DNA da célula hospedeira. Embora não
22 saibamos como pode ser essa capacidade de reparo em *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp., não
23 podemos descartar que uma clivagem do complexo Cas9:gRNA na região de corte prevista
24 tenha um reparo mais eficiente do que em outras espécies de microalgas.

25 Outro cenário que pode ser determinante é a toxicidade da nuclease Cas utilizada. Até
26 o momento a Cas mais empregada é a Cas9, cuja toxicidade tem sido documentada para alguns
27 organismos, podendo ter um efeito letal devido a clivagem fora das sequências-alvo (off-targeted)
28 levando a morte celular (NADUTHODI; BARBOSA; VAN DER OOST, 2018). Já tem sido
29 documentado especificamente o efeito tóxico da Cas9 para microrganismos fotossintéticos
30 (GREINER *et al.*, 2017; HOPES *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2014; LI, Hung *et al.*, 2016;
31 WANG, Qintao *et al.*, 2016; WENDT *et al.*, 2016). Porém, ante uma possível toxicidade por
32 parte da Cas9, não podemos descartar que existam microalgas que possam superar ou
33 sobreviver a essa toxicidade após incorporar no seu interior o complexo com a Cas9.
34 Atualmente, vem sendo estudadas outros tipos de Cas com uma melhor performance e menor

1 toxicidade para organismos fotossintéticos como a Cas12, a qual surge como uma alternativa
2 mais efetiva do que a Cas9 pra alguns organismos fotossintéticos, tanto em plantas como em
3 microalgas ou cianobactérias (KIM, Hyeran *et al.*, 2017; NADUTHODI *et al.*, 2019;
4 UNGERER; PAKRASI, 2016).

5 Finalmente, e depois de muitas tentativas e diversas condições testadas, não podemos
6 descartar tampouco a ineficiência da entrega do complexo Cas9:gRNA para ambas as
7 microalgas. Devido a uma parede celular robusta por parte de ambas as cepas ou por uma
8 eletroporação ineficiente ou não otimizada e, sobretudo, pela falta de um controle positivo, não
9 podemos confirmar a entrada do complexo no interior celular nem validar as condições de
10 eletroporação. Existem alternativas que talvez poderiam ser um método de “delivery” melhor
11 do que a eletroporação como, por exemplo, a utilização de um peptídeo sinal de importação no
12 interior celular e nuclear, que seja reconhecido pela célula e que permita a incorporação do
13 complexo no interior das microalgas. Entretanto, isso requer um conhecimento mais
14 aprofundado de proteínas de transporte que possam auxiliar nessa incorporação. Outra
15 alternativa que não precisa de conhecimento de sequências de transporte é mediante balística;
16 os complexos proteicos são carregados em micropartículas de ouro que posteriormente se
17 utiliza para “bombardear” as células de com objetivo de atravessar a parede celular até atingir
18 o interior celular e lá exercer sua função (MARTIN-ORTIGOSA; WANG, 2014). As
19 microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis* sp. têm sido editadas mediante a enzima
20 Cas9 e introduzida mediante bombardeio proteolístico com sucesso (CHANG *et al.*, 2020;
21 SERIF *et al.*, 2018).

22

23 4. CONCLUSÕES

24 Nesse estudo conseguimos obter e confirmar as sequências parciais do gene chave da
25 síntese de amido AGPS1 das cepas *Scenedesmus obliquus* Petrobras/Furg (éxons 4, 5, 6 e 7) e
26 *Desmodesmus* sp. Petrobras/Furg (éxons 4, 5, 6, 7, 8, e 9). Também, conseguimos elaborar um
27 protocolo otimizado de extração de RNA unificado para ambas as microalgas. O desenho e
28 validação *in vitro* de RNAs guias para a endonuclease Cas9 para ambas as microalgas, com um
29 protocolo molecular de diagnóstico de edição específico para cada RNA guia. E, finalmente,
30 confirmamos a viabilidade celular das microalgas a pulsos elétricos de até 1200V (*S. obliquus*)
31 e 1000V (*Desmodesmus* sp.).

32

33

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2
3 ABOU-SHANAB, Reda A.I.; HWANG, Jae-Hoon; CHO, Yunchul; MIN, Booki; JEON,
4 Byong-Hun. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a
5 potential source for biodiesel production. **Applied Energy**, vol. 88, no. 10, p. 3300–3306, Oct.
6 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.060>.

7
8 BELSHAW, Nigel; GROUNEVA, Irina; ARAM, Lior; GAL, Assaf; HOPES, Amanda;
9 MOCK, Thomas. Efficient gene replacement by <scp>CRISPR</scp> /Cas-mediated
10 homologous recombination in the model diatom *Thalassiosira pseudonana*. **New Phytologist**,
11 vol. 238, no. 1, p. 438–452, 8 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1111/nph.18587>.

12
13 BOROWITZKA, M. A. Algae as food. **Microbiology of Fermented Foods**. Boston, MA:
14 Springer US, 1998. p. 585–602. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_18.

15
16 BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from Microalgae: Towards Meeting Advanced
17 Fuel Standards. **Advanced Biofuels and Bioproducts**. New York, NY: Springer New York,
18 2013. p. 553–599. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_24.

19
20 BREUER, Guido; EVERS, Wendy A. C.; DE VREE, Jeroen H.; KLEINEGRIS, Dorinde M.
21 M.; MARTENS, Dirk E.; WIJFFELS, René H.; LAMERS, Packo P. Analysis of Fatty Acid
22 Content and Composition in Microalgae. **Journal of Visualized Experiments**, no. 80, 1 Oct.
23 2013. <https://doi.org/10.3791/50628>.

24
25 CANELLI, Greta; MURCIANO MARTÍNEZ, Patricia; AUSTIN, Sean; AMBÜHL, Mark E.;
26 DIONISI, Fabiola; BOLTEN, Christoph J.; CARPINE, Roberta; NEUTSCH, Lukas;
27 MATHYS, Alexander. Biochemical and Morphological Characterization of Heterotrophic
28 *Cryptocodinium cohnii* and *Chlorella vulgaris* Cell Walls. **Journal of Agricultural and Food**
29 **Chemistry**, vol. 69, no. 7, p. 2226–2235, 24 Feb. 2021.
30 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05032>.

31
32 CHANG, Kwang Suk; KIM, Jongrae; PARK, Hanwool; HONG, Seong Joo; LEE, Choul Gyun;
33 JIN, Eon Seon. Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis*

1 sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method. **Bioresource Technology**, vol. 303, 1 May
2 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122932>.
3

4 CHEN, Chun-Yen; KAO, Ai-Ling; TSAI, Zheng-Chia; CHOW, Te-Jin; CHANG, Hsin-
5 Yueh; ZHAO, Xin-Qing; CHEN, Po-Ting; SU, Hsiang-Yen; CHANG, Jo-Shu. Expression of
6 type 2 diacylglycerol acyltransferase gene *DGTT1* from *Chlamydomonas reinhardtii* enhances
7 lipid production in *Scenedesmus obliquus*. **Biotechnology Journal**, vol. 11, no. 3, p. 336–344,
8 16 Mar. 2016. <https://doi.org/10.1002/biot.201500272>.
9

10 CHEN, Chun-Yen; KAO, Ai-Ling; TSAI, Zheng-Chia; SHEN, Yu-Mei; KAO, Pei-Hsun;
11 NG, I-Son; CHANG, Jo-Shu. Expression of Synthetic Phytoene Synthase Gene to Enhance β -
12 Carotene Production in *Scenedesmus* sp. CPC2. **Biotechnology Journal**, vol. 12, no. 11, 28
13 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1002/biot.201700204>.
14

15 CHEN, Zhuo; GONG, Yangmin; FANG, Xiantao; HU, Hanhua. *Scenedesmus* sp. NJ-1 isolated
16 from Antarctica: a suitable renewable lipid source for biodiesel production. **World Journal of**
17 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 28, no. 11, p. 3219–3225, 1 Nov. 2012.
18 <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1132-0>.
19

20 CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, vol. 25, no. 3, p. 294–
21 306, May 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
22

23 DAS, Velentina; DUNFORD, Nurhan; DEKA, Dhanapati. Waste utilization and biodiesel
24 production from *Desmodesmus maximus* grown in swine wastewater using waste eggshells as
25 a catalyst. **Aquacultural Engineering**, vol. 99, p. 102293, Nov. 2022.
26 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2022.102293>.
27

28 DE JAEGER, Lenny; VERBEEK, Ruben EM; DRAAISMA, René B; MARTENS, Dirk E;
29 SPRINGER, Jan; EGGINK, Gerrit; WIJFFELS, René H. Superior triacylglycerol (TAG)
30 accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and
31 characterization. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 7, no. 1, p. 69, 2014.
32 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-69>.

1
2 DOLGANYUK, Vyacheslav; BELOVA, Daria; BABICH, Olga; PROSEKOV, Alexander;
3 IVANOVA, Svetlana; KATSEROV, Dmitry; PATYUKOV, Nikolai; SUKHIKH, Stanislav.
4 Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. **Biomolecules**, vol. 10, no. 8, p.
5 1153, 6 Aug. 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>.
6
7 DORON, Lior; SEGAL, Na'ama; SHAPIRA, Michal. Transgene Expression in Microalgae—
8 From Tools to Applications. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, 22 Apr. 2016.
9 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>.
10
11 FERNÁNDEZ-SEVILLA, José M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E.
12 Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied Microbiology and**
13 **Biotechnology**, vol. 86, no. 1, p. 27–40, 21 Mar. 2010. [https://doi.org/10.1007/s00253-009-](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2420-y)
14 [2420-y](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2420-y).
15
16 GASIUNAS, Giedrius; BARRANGOU, Rodolphe; HORVATH, Philippe; SIKSNYS,
17 Virginijus. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for
18 adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 109,
19 no. 39, 25 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
20
21 GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the
22 photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. **Proceedings of the**
23 **National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 54, no. 6, 1965.
24 <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>.
25
26 GREINER, Andre; KELTERBORN, Simon; EVERS, Heide; KREIMER, Georg; SIZOVA,
27 Irina; HEGEMANN, Peter. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii*
28 via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. **The Plant Cell**, vol. 29, no. 10, p. 2498–2518,
29 10 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00659>.
30
31 GUPTA, Sanjay Kumar; ANSARI, Faiz Ahmad; SHRIWASTAV, Amritanshu; SAHOO,
32 Narendra Kumar; RAWAT, Ismail; BUX, Faizal. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and
33 *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production

1 for bio-fuels. **Journal of Cleaner Production**, vol. 115, p. 255–264, Mar. 2016.
2 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.040>.

3

4 HEGEWALD, Eberhard; BRABAND, Anke. A taxonomic revision of *Desmodesmus* serie
5 *Desmodesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). **Fottea**, vol. 17, no. 2, 2017.
6 <https://doi.org/10.5507/fot.2017.001>.

7

8 HOPES, Amanda; NEKRASOV, Vladimir; KAMOUN, Sophien; MOCK, Thomas. Editing of
9 the urease gene by CRISPR-Cas in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Plant Methods**, vol.
10 12, no. 1, p. 49, 24 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0148-0>.

11

12 HU, Qiang; SOMMERFELD, Milton; JARVIS, Eric; GHIRARDI, Maria; POSEWITZ,
13 Matthew; SEIBERT, Michael; DARZINS, Al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for
14 biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, vol. 54, no. 4, p. 621–639,
15 May 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.

16

17 ISHINO, Y; SHINAGAWA, H; MAKINO, K; AMEMURA, M; NAKATA, A. Nucleotide
18 sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in
19 *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, vol. 169, no.
20 12, p. 5429–5433, Dec. 1987. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.

21

22 ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick. History of CRISPR-Cas from
23 Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. **Journal of**
24 **Bacteriology**, vol. 200, no. 7, Apr. 2018. <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>.

25

26 JEON, Min Seo; HAN, Sang-II; JEON, Minsol; CHOI, Yoon-E. Enhancement of phycoerythrin
27 productivity in *Porphyridium purpureum* using the clustered regularly interspaced short
28 palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 ribonucleoprotein system. **Bioresource**
29 **Technology**, vol. 330, p. 124974, Jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124974>.

30

31 JIANG, Wenzhi; BRUEGGEMAN, Andrew J.; HORKEN, Kempton M.; PLUCINAK, Thomas
32 M.; WEEKS, Donald P. Successful Transient Expression of Cas9 and Single Guide RNA Genes
33 in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic Cell**, vol. 13, no. 11, p. 1465–1469, Nov. 2014.
34 <https://doi.org/10.1128/EC.00213-14>.

1
2 JINEK, Martin; CHYLINSKI, Krzysztof; FONFARA, Ines; HAUER, Michael; DOUDNA,
3 Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA
4 Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, vol. 337, no. 6096, p. 816–821, 17
5 Aug. 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
6
7 KIM, Eun Song; KI, Hyunji; LEE, Chung Hyeon; AN, Sung Min; KANG, Nam Seon; CHOI,
8 Grace; HONG, Ji Won; PAN, Cheol-Ho; PARK, Bum Soo; CHO, Kichul. Enhancing
9 carotenoid production and exploring the potential use of microalga *Desmodesmus* cf.
10 pleiomorphus DSHM22 as a biodiesel feedstock through photoheterotrophic cultivation.
11 **Biomass and Bioenergy**, vol. 177, p. 106939, Oct. 2023.
12 <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106939>.
13
14 KIM, Hyeran; KIM, Sang-Tae; RYU, Jahee; KANG, Beum-Chang; KIM, Jin-Soo; KIM, Sang-
15 Gyu. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. **Nature Communications**, vol.
16 8, no. 1, p. 14406, 16 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms14406>.
17
18 KIM, Hyongbum; KIM, Jin-Soo. A guide to genome engineering with programmable
19 nucleases. **Nature Reviews Genetics**, vol. 15, no. 5, p. 321–334, 2 May 2014.
20 <https://doi.org/10.1038/nrg3686>.
21
22 KLEIN-MARCUSCHAMER, Daniel; CHISTI, Yusuf; BENEMANN, John R.; LEWIS,
23 David. A matter of detail: Assessing the true potential of microalgal biofuels. **Biotechnology**
24 **and Bioengineering**, vol. 110, no. 9, p. 2317–2322, 21 Sep. 2013.
25 <https://doi.org/10.1002/bit.24967>.
26
27 LI, Da-Wei; BALAMURUGAN, Srinivasan; YANG, Yu-Feng; ZHENG, Jian-Wei; HUANG,
28 Dan; ZOU, Li-Gong; YANG, Wei-Dong; LIU, Jie-Sheng; GUAN, Yuanfang; LI, Hong-Ye.
29 Transcriptional regulation of microalgae for concurrent lipid overproduction and secretion.
30 **Science Advances**, vol. 5, no. 1, 4 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3795>.
31
32 LI, Hung; SHEN, Claire R.; HUANG, Chun-Hung; SUNG, Li-Yu; WU, Meng-Ying; HU, Yu-
33 Chen. CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production.

1 **Metabolic Engineering**, vol. 38, p. 293–302, Nov. 2016.
2 <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.09.006>.
3
4 LI, Yantao; HAN, Danxiang; SOMMERFELD, Milton; HU, Qiang. Photosynthetic carbon
5 partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococccum* sp.
6 (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. **Bioresource Technology**, vol. 102, no. 1,
7 p. 123–129, Jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.036>.
8
9 LI, Zhi; YANG, Shang-tian; ZHOU, Zhi-you; PENG, Shuai-ying; ZHANG, Qing-hua; LONG,
10 Hao-zhi; LI, Han-guang. Enhancement of lipid production in *Desmodesmus intermedius* Z₈ by
11 ultrasonic stimulation coupled with nitrogen and phosphorus stress. **Biochemical Engineering**
12 **Journal**, vol. 172, p. 108061, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108061>.
13
14 MAKAROVA, Kira S.; WOLF, Yuri I.; IRANZO, Jaime; SHMAKOV, Sergey A.;
15 ALKHNBASHI, Omer S.; BROUNS, Stan J. J.; CHARPENTIER, Emmanuelle; CHENG,
16 David; HAFT, Daniel H.; HORVATH, Philippe; MOINEAU, Sylvain; MOJICA, Francisco J.
17 M.; SCOTT, David; SHAH, Shiraz A.; SIKSNYS, Virginijus; TERNS, Michael P.;
18 VENCLOVAS, Česlovas; WHITE, Malcolm F.; YAKUNIN, Alexander F.; ... KOONIN,
19 Eugene V. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived
20 variants. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 18, no. 2, p. 67–83, 19 Feb. 2020.
21 <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.
22
23 MANDAL, Shovon; MALLICK, Nirupama. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential
24 source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 84, no. 2, p.
25 281–291, 28 Aug. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1935-6>.
26
27 MARTIN-ORTIGOSA, Susana; WANG, Kan. Proteolistics: a biolistic method for intracellular
28 delivery of proteins. **Transgenic Research**, vol. 23, no. 5, p. 743–756, 5 Oct. 2014.
29 <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9807-y>.
30
31 MUSSGNUG, Jan H. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied**
32 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, no. 13, p. 5407–5418, 30 Jul. 2015.
33 <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6698-7>.
34

1 NADUTHODI, Mihris Ibnu Saleem; BARBOSA, Maria J.; VAN DER OOST, John. Progress
2 of CRISPR-Cas Based Genome Editing in Photosynthetic Microbes. **Biotechnology Journal**,
3 vol. 13, no. 9, 27 Sep. 2018. <https://doi.org/10.1002/biot.201700591>.
4

5 NADUTHODI, Mihris Ibnu Saleem; MOHANRAJU, Prarthana; SÜDFELD, Christian;
6 D'ADAMO, Sarah; BARBOSA, Maria J.; VAN DER OOST, John. CRISPR-Cas
7 ribonucleoprotein mediated homology-directed repair for efficient targeted genome editing in
8 microalgae *Nannochloropsis oceanica* IMET1. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 12, no. 1, p.
9 66, 25 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1401-3>.
10

11 NADUTHODI, Mihris Ibnu Saleem; SÜDFELD, Christian; AVITZIGIANNIS, Emmanouil
12 Klimis; TREVISAN, Nicola; VAN LITH, Eduard; ALCAIDE SANCHO, Javier; D'ADAMO,
13 Sarah; BARBOSA, Maria; VAN DER OOST, John. Comprehensive Genome Engineering
14 Toolbox for Microalgae *Nannochloropsis oceanica* Based on CRISPR-Cas Systems. **ACS**
15 **synthetic biology**, vol. 10, no. 12, p. 3369–3378, 17 Dec. 2021.
16 <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00329>.
17

18 PAN, Yi-Ying; WANG, Suz-Ting; CHUANG, Lu-Te; CHANG, Yen-Wei; CHEN, Ching-Nen
19 Nathan. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation
20 is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in
21 *Desmodesmus*. **Bioresource Technology**, vol. 102, no. 22, p. 10510–10517, Nov. 2011.
22 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.091>.
23

24 POLINER, Eric; FARRÉ, Eva M.; BENNING, Christoph. Advanced genetic tools enable
25 synthetic biology in the oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp. **Plant Cell Reports**, vol.
26 37, no. 10, p. 1383–1399, 6 Oct. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2270-0>.
27

28 POLINER, Eric; TAKEUCHI, Tomomi; DU, Zhi-Yan; BENNING, Christoph; FARRÉ, Eva
29 M. Nontransgenic Marker-Free Gene Disruption by an Episomal CRISPR System in the
30 Oleaginous Microalga, *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. **ACS Synthetic Biology**, vol.
31 7, no. 4, p. 962–968, 20 Apr. 2018. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00362>.
32

1 QIN, Shan; LIU, Guo-Xiang; HU, Zheng-Yu. The accumulation and metabolism of astaxanthin
2 in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochemistry**, vol. 43, no. 8, p. 795–802,
3 Aug. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.03.010>.
4

5 RODOLFI, Liliana; CHINI ZITTELLI, Graziella; BASSI, Niccolò; PADOVANI, Giulia;
6 BIONDI, Natascia; BONINI, Gimena; TREDICI, Mario R. Microalgae for oil: Strain selection,
7 induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor.
8 **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 102, no. 1, p. 100–112, 5 Jan. 2009.
9 <https://doi.org/10.1002/bit.22033>.
10

11 ROY, Sudeshna Sen; PAL, Ruma. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special
12 References to Nutritional Value and Fish Dietetics. **Proceedings of the Zoological Society**,
13 vol. 68, no. 1, p. 1–8, 4 Jun. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9>.
14

15 SÁNCHEZ, J.F.; FERNÁNDEZ, J.M.; ACIÉN, F.G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.;
16 MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new
17 strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, vol. 43, no. 4, p. 398–405, Apr. 2008.
18 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.004>.
19

20 SERIF, Manuel; DUBOIS, Gwendoline; FINOUX, Anne-Laure; TESTE, Marie-Ange;
21 JALLET, Denis; DABOUSSI, Fayza. One-step generation of multiple gene knock-outs in the
22 diatom *Phaeodactylum tricorutum* by DNA-free genome editing. **Nature Communications**,
23 vol. 9, no. 1, p. 3924, 25 Sep. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06378-9>.
24

25 SILAMBARASAN, Sivagnanam; LOGESWARI, Peter; SIVARAMAKRISHNAN,
26 Ramachandran; INCHAROENSAKDI, Aran; KAMARAJ, Balu; CORNEJO, Pablo.
27 *Scenedesmus* sp. strain SD07 cultivation in municipal wastewater for pollutant removal and
28 production of lipid and exopolysaccharides. **Environmental Research**, vol. 218, p. 115051,
29 Feb. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115051>.
30

31 SIRIKHACHORNKIT, Anchalee; SUTTANGKAKUL, Anongpat; VUTTIPONGCHAIKIJ,
32 Supachai; JUNTAWONG, Piyada. De novo transcriptome analysis and gene expression
33 profiling of an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus* TISTR8540 during nitrogen

1 deprivation-induced lipid accumulation. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, p. 3668, 27 Feb.
2 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22080-8>.

3

4 SIRIKHACHORNKIT, Anchalee; VUTTIPONGCHAIKIJ, Supachai; SUTTANGKAKUL,
5 Anongpat; YOKTHONGWATTANA, Kittisak; JUNTAWONG, Piyada; POKETHITIYOOK,
6 Prayad; KANGVANSACHOL, Kunn; MEETAM, Metha. Increasing the Triacylglycerol
7 Content in *Dunaliella tertiolecta* through Isolation of Starch-Deficient Mutants. **Journal of**
8 **Microbiology and Biotechnology**, vol. 26, no. 5, p. 854–866, 28 May 2016.
9 <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10022>.

10

11 SUN, Han; ZHAO, Weiyang; MAO, Xuemei; LI, Yuelian; WU, Tao; CHEN, Feng. High-value
12 biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon
13 metabolism and energy conversion. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 11, no. 1, p. 227, 20 Dec.
14 2018. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1225-6>.

15

16 SUTTANGKAKUL, Anongpat; SIRIKHACHORNKIT, Anchalee; JUNTAWONG, Piyada;
17 PUANGTAME, Wilasinee; CHOMTONG, Thitikorn; SRIFA, Suchada; SATHITNAITHAM,
18 Sukhita; DUMRONGTHAWATCHAI, Wasawat; JARIYACHAWALID, Kanidtha;
19 VUTTIPONGCHAIKIJ, Supachai. Evaluation of strategies for improving the transgene
20 expression in an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus*. **BMC Biotechnology**, vol. 19, no.
21 1, p. 4, 10 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0497-z>.

22

23 UNGERER, Justin; PAKRASI, Himadri B. Cpf1 Is A Versatile Tool for CRISPR Genome
24 Editing Across Diverse Species of Cyanobacteria. **Scientific Reports**, vol. 6, no. 1, p. 39681,
25 21 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep39681>.

26

27 WANG, Pengchong; SHAO, Yahui; GENG, Yun; MUSHTAQ, Rubina; YANG, Wenlong; LI,
28 Mei; SUN, Xiuqin; WANG, Hongbo; CHEN, Gao. Advanced treatment of secondary effluent
29 from wastewater treatment plant by a newly isolated microalga *Desmodesmus* sp. SNN1.
30 **Frontiers in Microbiology**, vol. 14, 26 Jan. 2023.
31 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1111468>.

32

1 WANG, Qintao; LU, Yandu; XIN, Yi; WEI, Li; HUANG, Shi; XU, Jian. Genome editing of
2 model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by <sc>CRISPR</sc>/Cas9. **The Plant**
3 **Journal**, vol. 88, no. 6, p. 1071–1081, 18 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1111/tpj.13307>.
4

5 WENDT, Kristen E.; UNGERER, Justin; COBB, Ryan E.; ZHAO, Huimin; PAKRASI,
6 Himadri B. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium
7 *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. **Microbial Cell Factories**, vol. 15, no. 1, p. 115, 23
8 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0514-7>.
9

10 WORK, Victoria H.; RADA KOVITS, Randor; JINKERSON, Robert E.; MEUSER, Jonathan
11 E.; ELLIOTT, Lee G.; VINYARD, David J.; LAURENS, Lieve M.L.; DISMUKES, G.
12 Charles; POSEWITZ, Matthew C. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas*
13 *reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in
14 complemented strains. **Eukaryotic Cell**, vol. 9, no. 8, p. 1251–1261, Aug. 2010.
15 <https://doi.org/10.1128/EC.00075-10>.
16

17 XIN, Li; HONG-YING, Hu; KE, Gan; JIA, Yang. Growth and nutrient removal properties of a
18 freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources.
19 **Ecological Engineering**, vol. 36, no. 4, p. 379–381, Apr. 2010.
20 <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.003>.
21

22 YANG, Juan; ZHANG, Chunye; HU, Hanhua. Screening High CO₂-Tolerant Oleaginous
23 Microalgae from Genera *Desmodesmus* and *Scenedesmus*. **Applied Biochemistry and**
24 **Biotechnology**, vol. 192, no. 1, p. 211–229, 1 Sep. 2020. [https://doi.org/10.1007/s12010-020-](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03319-5)
25 [03319-5](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03319-5).
26

1 **DISCUSSÃO GERAL**

2 As emissões de CO₂ estão fortemente ligadas ao uso de combustíveis fósseis, como
3 carvão, petróleo e gás natural, que são queimados para geração de energia, transporte, produção
4 industrial e aquecimento. Essas atividades liberam grandes quantidades de CO₂ na atmosfera,
5 contribuindo significativamente para o aumento das concentrações atmosféricas desse e gás e
6 potencializando cada vez mais o efeito estufa e o aquecimento global (LIU, Yuzhong *et al.*,
7 2021).

8 Um das alternativas para mitigar as emissões de CO₂ e reduzir o impacto do
9 aquecimento global é a utilização de biocombustíveis. Os biocombustíveis são combustíveis
10 renováveis derivados de fontes biológicas, como plantas, algas ou resíduos orgânicos, e podem
11 ser utilizados como substitutos ou aditivos aos combustíveis fósseis em veículos, usinas de
12 energia ou processos industriais (GOMIERO, 2015; KANIAPAN *et al.*, 2021; SUNDARAM
13 *et al.*, 2023). Entre eles destacam-se os combustíveis de 3 geração, que são os feitos a partir de
14 microalgas.

15 Os combustíveis 3G, reduzem as emissões de CO₂ através do ciclo do carbono neutro,
16 pois o CO₂ liberado é equivalente ao CO₂ absorvido pelas microalgas ao longo do crescimento,
17 resultando em emissões líquidas de CO₂ próximas a Zero (TREDICI, 2010). Outra vantagem,
18 é que a queima de biocombustíveis geralmente emite menos gases de efeito estufa do que os
19 combustíveis de origem fóssil (SUNDARAM *et al.*, 2023). Os biocombustíveis 3G podem
20 também ser produzidos a partir de resíduos industriais, agrícolas ou urbanos, aproveitando e
21 bioremediando esses resíduos (GHAFAR *et al.*, 2023; RANJBAR; MALCATA, 2022;
22 RATTANAPOLTEE; KAEWKANNETRA, 2014). Em comparação aos seus antecessores, o
23 biodiesel de microalgas pode ser feito em águas salobras evitando o uso e competição de terras
24 agrícolas e águas de consumo humano em geral (GENDY; EL-TEMTAMY, 2013; JOHNSON;
25 WEN, 2010).

26 Apesar de todas as vantagens, o custo de produção dos biocombustíveis feitos a partir
27 de biomassa de microalgas não pode competir com o custo de produção dos combustíveis
28 fósseis. O que demanda uma melhora de todos os processos envolvidos na sua produção, desde
29 as estruturas e meios de cultivos, passando pelo teor de biomassa e lipídeos neutro, até os
30 processos de coleta e metodologias de extração dos lipídeos, os quais tem que ser viáveis
31 economicamente, respeitosos com o meio ambiente e escaláveis industrialmente
32 (DEWANGAN; YADAV; MALLICK, 2018; ROSELET; BURKERT; ABREU, 2016;
33 SNEHA *et al.*, 2023).

1 Nessa tese, foram testadas duas estratégias genéticas para melhorar a produção de
2 lipídeos de duas cepas de microalgas com características especiais. Primeiramente foram
3 identificadas ambas as espécies mediante técnicas moleculares baseadas nas sequências ITS
4 ribossomais. Os resultados obtidos definiram que uma das cepas corresponde a espécie
5 *Scenedesmus obliquus* (com 100% de similaridade), e a outra cepa é provavelmente uma
6 espécie ainda não descrita pertencente ao gênero *Desmodesmus*. Apesar de ambas as cepas
7 pertencer ao grupo de microalgas oleaginosas (YANG; ZHANG; HU, 2020), os custos de
8 produção de biodiesel a partir delas ainda não consegue competir com os combustíveis de
9 origem fóssil. Por isso, com intuito de melhorar essa produção, foram definidas estratégias
10 genéticas para aumentar os níveis intrínsecos de lipídeos em ambas as espécies.

11 O biodiesel é feito a partir dos TAGs, por isso o foco dessa tese foi redirecionar o fluxo
12 de carbono a favor da síntese dessa macromolécula. É bem conhecido que o carbono orgânico
13 fixado ou obtido pelas microalgas se distribui entre a formação do TAG e amido, que são os
14 dois tipos de moléculas utilizadas como reserva de energia em células vegetais, o que torna as
15 vias de sínteses de ambas as moléculas como competitivas pelo carbono orgânico (DE JAEGER
16 *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2010). A fim de alcançar o nosso objetivo, o foco dessa tese foi modificar
17 ou alterar as rotas bioquímicas ou metabolismo de ambas as cepas de microalgas, para
18 redistribuir esse carbono orgânico, reduzindo ou apagando a via de síntese do amido para
19 favorecer mais a via de síntese dos TAG.

20 Uma das estratégias utilizadas nessa tese foi a edição dirigida mediante a tecnologia
21 CRISP/Cas9 RNP, cujo alvo foi a enzima chave da síntese de amido AGPS1. A tecnologia
22 CRISPR/Cas9 RNP é uma ferramenta molecular que deleta especificamente uma sequência
23 genica podendo eliminar sua função sem implicar a adição de DNA exógeno (LIU *et al.*, 2022;
24 PICKAR-OLIVER; GERSBACH, 2019). Porém, para a correta aplicação dessa tecnologia, é
25 necessário um conhecimento genético da microalga alvo bem específico enquanto a genoma e
26 fisiologia. Embora muitos esforços e tempo nesse processo, não foi possível implementar essa
27 técnica nas cepas de estudo, porém, alcançamos alguns dos nossos objetivos específicos como
28 a implementação de um protocolo de extração de RNA para ambas as cepas e o sequenciamento
29 parcial do gene alvo AGPS1 também em ambas as cepas de microalgas.

30 A outra estratégia aplicada e implementada nessa tese para conseguir reduzir ou apagar
31 a síntese de amido, foi a utilização da mutação randômica induzida por um agente físico. As
32 mutações randômicas ocasionam mutações arbitrárias em lugares inespecíficos do genoma do
33 organismo alvo (BLEISCH *et al.*, 2022; TROVÃO *et al.*, 2022), no nosso caso foi utilizado a
34 irradiação com luz UV. Estratégia que mediante o screening adequado (teste de vapor de iodo),

1 foram obtidos 4 possíveis mutantes amido-deficientes dos quais apenas dois manteriam as
2 mutações ou fenótipos desejados: o mutante tM-10, que apresentou uma redução total da síntese
3 de amido, e o mutante tN-30 que apresentou uma redução parcial da síntese de amido. Ambos
4 os mutantes, tM-10 e tN-30, apresentaram estabilidade de fenótipo após mais de 10 ciclos de
5 cultivo, e comparados com a cepa selvagem, tanto tM-10 como tN-30 mostraram um aumento
6 significativo de 1.5 e 2.3 vezes respectivamente dos lipídeos neutros.

7 Ao fazer uma comparação entre ambas estratégias empregadas, entendemos que o
8 sucesso ou não depende da requisitos da aplicabilidade de ambas tecnologias, como foi
9 enunciado antes, a tecnologia CRISPR/Cas9 é uma ferramenta que apresenta uma maior
10 especificidade para a edição genética, ela precisa de um grande conhecimento de base da
11 espécie alvo, e não é por acaso que a maioria de trabalhos que relatam a implementação desta
12 técnica com sucesso, é em espécie de microalgas que são mundialmente utilizadas como
13 espécies modelos ou estão perto de ser etiquetadas como tal (DHOKANE *et al.*, 2023;
14 NADUTHODI; BARBOSA; VAN DER OOST, 2018). Já para nossas cepas, não se tem
15 conhecimento até o momento de implementações com sucesso dessa ferramenta nos gêneros
16 *Scenedesmus* e *Desmodesmus*. Por outro lado, a metodologia de mutação aleatória, mesmo que
17 não apresente especificidade pelos genes alvos e, uma baixa taxa de sucesso na hora de
18 conseguir uma cepa com as mutações desejadas, é uma metodologia que para ser aplicada não
19 tem a necessidade de um conhecimento aprimorado ou específico sobre a genética da espécie
20 alvo. Em contrapartida, o efeito da não especificidade pode ser reduzido com um aumento dos
21 mutantes gerados e com um aprimoramento do screening utilizado, por exemplo, a citometria
22 de fluxo, utilizada adequadamente, permite uma seleção de alto rendimento ao conseguir
23 analisar e selecionar um alto número de células individuais em pouco tempo e com uma grande
24 variedade de características desejadas (ZENG *et al.*, 2020). Porém, um aumento dos mutantes
25 gerados não garante o sucesso de conseguir os fenótipos procurados, como no caso da cepa *S.*
26 *obliquus* para a qual não foi possível conseguir nenhum mutante com os fenótipos procurados.
27 No entanto, para a cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG foram gerados 2 mutantes com os
28 fenótipos de redução de amido como foi definido antes.

29 É conhecido que a sínteses ou acumulação de TAG responde a diversos fatores ou
30 estresses abióticos, tendo um grande impacto os fatores de salinidade, intensidade de luz e a
31 carência de nitrogênio (ZIENKIEWICZ *et al.*, 2016). De acordo com essas premissas e para
32 melhorar ainda mais os resultados dessa tese, foi selecionado o mutante tN-30, quem apresentou
33 os maiores níveis de lipídeos neutros, para incrementar ainda mais a sua produção otimizando
34 as variáveis de salinidade e intensidade de luz mediante a CCD e a implementação de cultivos

1 em duas fases, uma primeira fase de crescimento e obtenção de biomassa em cultivos com
2 adição de nitrogênio, e uma segunda fase de indução na qual foi retirado o nitrogênio. Traz
3 esses ajustes das condições abióticas de salinidade, intensidade de luz e restrição de nitrogênio,
4 a cepa tN-30 passou a produzir na fase estacionaria uma meia de 2,1 vezes mais lipídeos neutros
5 do que nas condições de cultivos iniciais (salinidade 10 g/L, 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e N+) e 4.5 vezes
6 mais do que a cepa wild-type nessa mesma condição. Tendo em conta a variável tempo, nossos
7 resultados nos indicaram que para a cepa *Desmodesmus* tN-30 a maior produtividade de
8 lipídeos neutros foi obtida a salinidade 10 g/L, 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, no sexto dia de cultivo em
9 deficiência de nitrogênio. Com uma produtividade de fluorescência de lipídeos neutros de
10 1.250.139 a.u./L/d, que foi 1.74 vezes maior do que a cepa wild-type na mesma condição.
11

1 CONCLUSÕES GERAIS

2 Primeiramente nesse estudo, foi possível identificar ambas as cepas de microalgas por
3 meio de taxonomia molecular utilizando a sequências ITSs: uma como *Scenedesmus obliquus*
4 e a outra como uma espécie ainda não descrita do gênero *Desmodesmus*.

5 A irradiação com luz UV (25.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) induz mutações randômicas na microalga
6 *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras.

7 Mediante irradiação com luz UV foram obtidos 2 mutantes da cepa *Desmodesmus* sp.
8 Petrobras/FURG com redução total e parcial de amido: tM-10 e tN-30 respectivamente.

9 As mutações dos mutantes tM-10 e tN-30 demonstraram estabilidade fenotípica após 10
10 ciclos de cultivos.

11 Os mutantes tM-10 e tN-30 apresentaram um aumento significativo dos níveis de
12 lipídeos neutros de 1.5 e 2.3 vezes maior do que a cepa wild-type.

13 A inibição da síntese de amido redireciona o fluxo de carbono orgânico a favor da
14 síntese de TAG na cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG.

15 O bloqueio da síntese de amido não compromete a dinâmica de crescimento das cepas
16 mutantes tM-10 e tN-30.

17 O aumento de lipídeos neutros nos mutantes tM-10 e tN-30 acentuam o potencial dessas
18 cepas para a geração de biodiesel.

19 Os mutantes tO-06 e tO-11 restauraram o fenótipo selvagem.

20 Foram validadas as condições preestabelecidas, mediante a ferramenta Delineamento
21 composto central, de salinidade e intensidade de luz para maximizar os níveis de biomassa na
22 cepa *Desmodesmus* sp. tN-30; foi de 6,9 g/L e 693 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente.

23 O déficit de nitrogênio em cultivo de duas etapas melhora os índices de biomassa na
24 cepa *Desmodesmus* sp. tN-30.

25 Foi validado que o aumento do estresse salino e da intensidade luminosa aumenta os
26 níveis de lipídeos neutros da cepa *Desmodesmus* sp. tN-30, conforme a predição da ferramenta
27 Delineamento composto central.

28 O déficit de nitrogênio em cultivo de duas etapas melhora a produção de lipídeos neutros
29 da cepa *Desmodesmus* sp. tN-30.

1 A melhor produtividade de lipídeos neutros foi a salinidade 10 g/L, intensidade de luz de 693
2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, e em déficit de nitrogênio (cultivo de duas etapas) no sexto dia de cultivo com
3 uma produtividade de 1.250.139 a.u./L/d.

4 O mutante tN-30 apresenta um melhor crescimento do que a cepa wild-type em condições de
5 estresse salino e de intensidade de luz.

6 Pela primeira vez foi avaliado e descrito o perfil de ácidos graxos das cepas tN-30 e wild-type
7 da microalga *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras. A cepa tN-30 mostrou um perfil de ácidos
8 graxos com maiores taxas de SFAs e MUFAs do que a cepa wild-type.

9 Os ácidos graxos mais representativos de ambas as cepas de microalgas tN-30 e wild-type foram
10 o ácido palmítico (C16:0) e o ácido oleico (18:1).

11 Foram obtidas e confirmadas as sequências parciais do gene chave da síntese de amido AGPS1
12 da cepa de microalga *Scenedesmus obliquus* FURG/Petrobras (exóns 4, 5, 6 e 7).

13 Foram obtidas e confirmadas as sequências parciais do gene chave da síntese de amido AGPS1
14 da cepa de microalga *Desmodesmus* sp. FURG/Petrobras (exóns 4, 5, 6, 7, 8, e 9).

15 Foi elaborado um protocolo otimizado de extração de RNA unificado para ambas as cepas de
16 microalgas *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp..

17 Foram desenhados e validados in vitro RNAs guias para a endonuclease Cas9 para ambas as
18 cepas de microalgas *S. obliquus* e *Desmodesmus* sp., com um protocolo molecular de
19 diagnóstico de edição específico para cada RNA guia.

20 Foi testada e validada a viabilidade celular das microalgas a pulsos elétricos de até 1200V (*S.*
21 *obliquus*) e 1000V (*Desmodesmus* sp.).

22 Foi comprovado que a mutação randômica por irradiação com luz UV foi mais efetiva do que
23 a tecnologia CRISPR/Cas9 RNP na hora de obter mutantes com pouca ou nenhuma síntese de
24 amido na cepa *Desmodesmus* sp. Petrobras/FURG.

25

1 **PERSPECTIVAS**

2 O objetivo principal dessa tese foi conseguir uma cepa mais produtiva em quanto lipídeos
3 neutros se refere. Embora esse objetivo tenha sido atingido com sucesso com a geração da cepa
4 tN-30 e o melhoramento a traves das modificações nos fatores abióticos de salinidade,
5 intensidade de luz e deficiência de nitrogênio em cultivos de duas etapas, ainda podem se
6 aprimorar mais por médio de:

- 7 • Estudo de intensidade de luz maiores a $693 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.
- 8 • Estudo de diferentes tipos de sais como indutores da sínteses de lipídeos neutros.
- 9 • Estudo do déficit e suplementação de fosforo nos cultivos.

10 Também, temos um grande interesse em sequenciar o genoma completo, através da
11 tecnologia “Oxford Nanopore Sequencing”, de todas as nossas cepas obtidas nesse trabalho
12 para caracterizar as mutações que apresentam os mutantes randômicos e compreender melhor
13 o metabolismo bioquímico das nossas cepas.

14 Finalmente, nossos esforços por implementar a tecnologia CRISPR/Cas continuarão com
15 os seguintes focos:

- 16 • Uso de outros tipos de Cas, como por exemplo a endonuclease Cpf1 ou Cas12, que têm
17 mostrado um ótimo resultado de edição em organismo fotossintéticos.
- 18 • Uso de outras formas de “delivery” do complexo gRNA:Cas como vias de entradas para
19 o interior celular.

20

21

1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

2

3 BLEISCH, Richard; FREITAG, Leander; IHADJADENE, Yob; SPRENGER, Una;
4 STEINGRÖWER, Juliane; WALTHER, Thomas; KRUIJATZ, Felix. Strain Development in
5 Microalgal Biotechnology—Random Mutagenesis Techniques. **Life**, vol. 12, no. 7, p. 961, 27
6 Jun. 2022. <https://doi.org/10.3390/life12070961>.

7

8 DE JAEGER, Lenny; VERBEEK, Ruben EM; DRAAISMA, René B; MARTENS, Dirk E;
9 SPRINGER, Jan; EGGINK, Gerrit; WIJFFELS, René H. Superior triacylglycerol (TAG)
10 accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and
11 characterization. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 7, no. 1, p. 69, 2014.
12 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-69>.

13

14 DEWANGAN, Ashish; YADAV, Ashok Kumar; MALLICK, Ashis. Current scenario of
15 biodiesel development in India: prospects and challenges. **Energy Sources, Part A:
16 Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, vol. 40, no. 20, p. 2494–2501, 18 Oct.
17 2018. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1502849>.

18

19 DHOKANE, Dhananjay; SHAIKH, Arshi; YADAV, Anu; GIRI, Nandinee;
20 BANDYOPADHYAY, Anindya; DASGUPTA, Santanu; BHADRA, Bhaskar. CRISPR-based
21 bioengineering in microalgae for production of industrially important biomolecules. **Frontiers
22 in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 11, 26 Oct. 2023.
23 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1267826>.

24

25 GENDY, Tahani S.; EL-TEMAMY, Seham A. Commercialization potential aspects of
26 microalgae for biofuel production: An overview. **Egyptian Journal of Petroleum**, vol. 22, no.
27 1, p. 43–51, Jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2012.07.001>.

28

29 GHAFFAR, Imania; DEEPANRAJ, Balakrishnan; SUNDAR, Lingala Syam; VO, Dai-Viet
30 N.; SAIKUMAR, Algam; HUSSAIN, Ali. A review on the sustainable procurement of
31 microalgal biomass from wastewaters for the production of biofuels. **Chemosphere**, vol. 311,
32 p. 137094, Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137094>.

33

1 GOMIERO, Tiziano. Are Biofuels an Effective and Viable Energy Strategy for Industrialized
2 Societies? A Reasoned Overview of Potentials and Limits. **Sustainability**, vol. 7, no. 7, p.
3 8491–8521, 30 Jun. 2015. <https://doi.org/10.3390/su7078491>.
4

5 JOHNSON, Michael B.; WEN, Zhiyou. Development of an attached microalgal growth
6 system for biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 85, no. 3, p.
7 525–534, 28 Jan. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2133-2>.
8

9 KANIAPAN, Sivabalan; HASSAN, Suhaimi; YA, Hamdan; PATMA NESAN, Kartikeyan;
10 AZEEM, Mohammad. The Utilisation of Palm Oil and Oil Palm Residues and the Related
11 Challenges as a Sustainable Alternative in Biofuel, Bioenergy, and Transportation Sector: A
12 Review. **Sustainability**, vol. 13, no. 6, p. 3110, 12 Mar. 2021.
13 <https://doi.org/10.3390/su13063110>.
14

15 LI, Yantao; HAN, Danxiang; HU, Guongrong; DAUVILLEE, David; SOMMERFELD,
16 Milton; BALL, Steven; HU, Qiang. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-
17 glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. **Metabolic Engineering**, vol.
18 12, no. 4, p. 387–391, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.02.002>.
19

20 LIU, Guanwen; LIN, Qiupeng; JIN, Shuai; GAO, Caixia. The CRISPR-Cas toolbox and gene
21 editing technologies. **Molecular Cell**, vol. 82, no. 2, p. 333–347, Jan. 2022.
22 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.002>.
23

24 LIU, Yuzhong; CRUZ-MORALES, Pablo; ZARGAR, Amin; BELCHER, Michael S.; PANG,
25 Bo; ENGLUND, Elias; DAN, Qingyun; YIN, Kevin; KEASLING, Jay D. Biofuels for a
26 sustainable future. **Cell**, vol. 184, no. 6, p. 1636–1647, Mar. 2021.
27 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.052>.
28

29 NADUTHODI, Mihris Ibnu Saleem; BARBOSA, Maria J.; VAN DER OOST, John. Progress
30 of CRISPR-Cas Based Genome Editing in Photosynthetic Microbes. **Biotechnology Journal**,
31 vol. 13, no. 9, 27 Sep. 2018. <https://doi.org/10.1002/biot.201700591>.
32

1 PICKAR-OLIVER, Adrian; GERSBACH, Charles A. The next generation of CRISPR–Cas
2 technologies and applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 20, no. 8, p.
3 490–507, 30 Aug. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>.
4

5 RANJBAR, Saeed; MALCATA, F. Xavier. Challenges and prospects for sustainable
6 microalga-based oil: A comprehensive review, with a focus on metabolic and genetic
7 engineering. **Fuel**, vol. 324, p. 124567, Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124567>.
8

9 RATTANAPOLTEE, Panida; KAEWKANNETRA, Pakawadee. Utilization of Agricultural
10 Residues of Pineapple Peels and Sugarcane Bagasse as Cost-Saving Raw Materials in
11 *Scenedesmus acutus* for Lipid Accumulation and Biodiesel Production. **Applied**
12 **Biochemistry and Biotechnology**, vol. 173, no. 6, p. 1495–1510, 11 Jul. 2014.
13 <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0949-4>.
14

15 ROSELET, Fabio; BURKERT, Janaína; ABREU, Paulo Cesar. Flocculation of
16 *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot
17 scale reproducibility. **Biomass and Bioenergy**, vol. 87, p. 55–60, Apr. 2016.
18 <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.02.015>.
19

20 SNEHA, Mohapatra; SOWMYA, S.; PREMALATHA, M.; MATHIVANAN, Krishnamurthy;
21 MUTHUKUMAR, Krishnan; MATHIMANI, Thangavel. Multifarious extraction
22 methodologies for ameliorating lipid recovery from algae. **Environmental Research**, vol.
23 218, p. 114978, Feb. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114978>.
24

25 SUNDARAM, Thanigaivel; RAJENDRAN, Saravanan; GNANASEKARAN, Lalitha;
26 RACHMADONA, Nova; JIANG, Jheng-Jie; KHOO, Kuan Shiong; SHOW, Pau Loke.
27 Bioengineering strategies of microalgae biomass for biofuel production: recent advancement
28 and insight. **Bioengineered**, vol. 14, no. 1, 31 Dec. 2023.
29 <https://doi.org/10.1080/21655979.2023.2252228>.
30

31 TREDICI, Mario R. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the
32 next green revolution. **Biofuels**, vol. 1, no. 1, p. 143–162, 9 Jan. 2010.
33 <https://doi.org/10.4155/bfs.09.10>.
34

1 TROVÃO, Mafalda; SCHÜLER, Lisa M.; MACHADO, Adriana; BOMBO, Gabriel;
2 NAVALHO, Sofia; BARROS, Ana; PEREIRA, Hugo; SILVA, Joana; FREITAS, Filomena;
3 VARELA, João. Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain
4 Improvement towards Industrial Production. **Marine Drugs**, vol. 20, no. 7, p. 440, 30 Jun.
5 2022. <https://doi.org/10.3390/md20070440>.
6
7 YANG, Juan; ZHANG, Chunye; HU, Hanhua. Screening High CO₂-Tolerant Oleaginous
8 Microalgae from Genera *Desmodesmus* and *Scenedesmus*. **Applied Biochemistry and**
9 **Biotechnology**, vol. 192, no. 1, p. 211–229, 1 Sep. 2020. [https://doi.org/10.1007/s12010-020-](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03319-5)
10 [03319-5](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03319-5).
11
12 ZENG, Weizhu; GUO, Likun; XU, Sha; CHEN, Jian; ZHOU, Jingwen. High-Throughput
13 Screening Technology in Industrial Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, vol. 38, no. 8,
14 p. 888–906, Aug. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.01.001>.
15
16 ZIENKIEWICZ, Krzysztof; DU, Zhi-Yan; MA, Wei; VOLLHEYDE, Katharina; BENNING,
17 Christoph. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and
18 physiological insights. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology**
19 **of Lipids**, vol. 1861, no. 9, p. 1269–1281, Sep. 2016.
20 <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.008>.
21