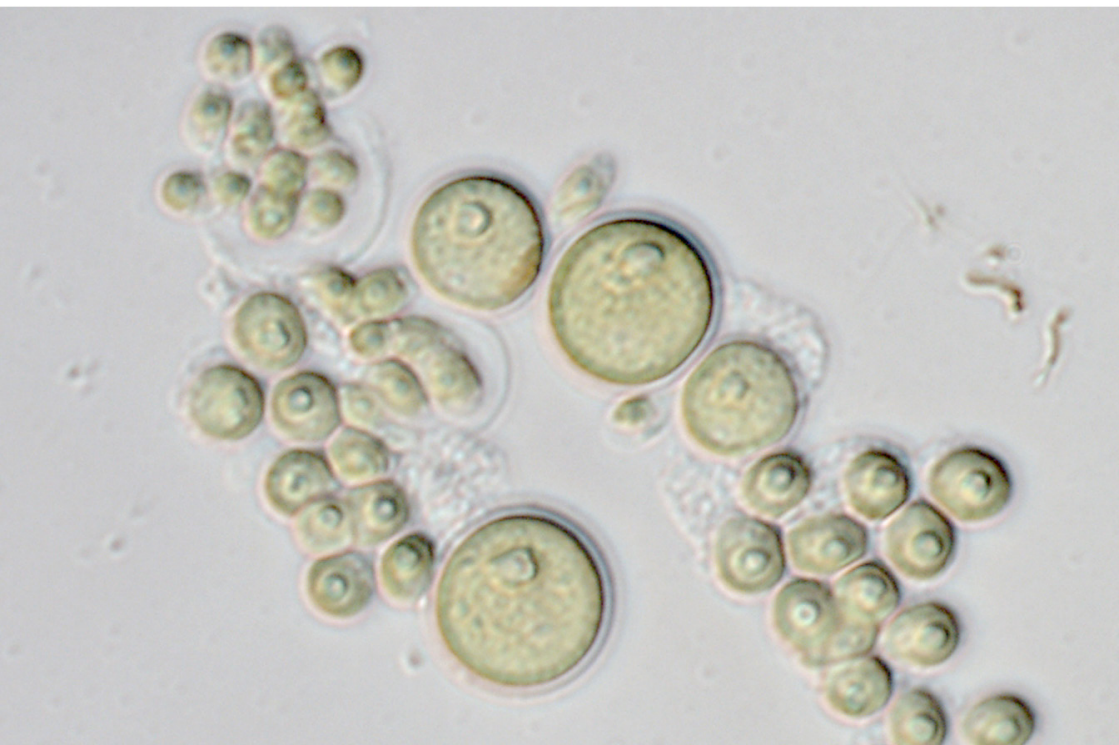


**Avaliação prospectiva do
potencial biotecnológico de
microalgas: uma abordagem
filogenética**



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Agroenergia

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 09

Avaliação prospectiva do potencial biotecnológico de microalgas: uma abordagem filogenética

Carolina Ribero Cereijo

Hugo Santana

Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi

Lorena Costa Garcia

Letícia Jungmann Cançado

Bruno do Santos Alves Figueiredo Brasil

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº.

Ed. Embrapa Agroenergia.

Caixa Postal 40315.

CEP 70770-901, Brasília, DF.

Fone: + 55 (61) 3448-158

Fax: + 55(61)3448-1589

www.embrapa.br

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Alexandre Alonso Alves*

Secretária-executiva: *Marcia Mitiko O. Esquiagola*

Membros: *André Pereira Leão*

Bruno Galvêas Laviola

Emerson Leo Schultz

Luciane Chedid Melo Borges

Maria Iara Pereira Machado

Rosana Falcão

Sílvia Belém Gonçalves

Supervisão editorial e revisão de texto

Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica

Maria Iara Pereira Machado

Editoração eletrônica

Maria Goreti Braga dos Santos

Foto da capa

Priscila Borges de Moraes

1ª edição

Publicação digitalizada (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

Avaliação prospectiva do potencial biotecnológico de microalgas: uma abordagem filogenética / autores, Carolina Ribero Cereijo ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2017.

18 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroenergia, INSS 2177-0395 ; 09)

Disponível no endereço eletrônico: www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes

1. Microalgas. 2. Cepas de microalgas - identificação molecular
3. Diversidade. 4. Aplicação. 5. Bioproduto. 6. Chlorophyta. I.
Cereijo, Carolina Ribero. II. Série.

579 – CDD 22.

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução.....	9
Material e métodos.....	10
Resultados e discussão	11
Conclusões.....	15
Referências	17

Avaliação prospectiva do potencial biotecnológico de microalgas: uma abordagem filogenética

Carolina Ribero Cereijo¹

Hugo Santana²

Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi³

Lorena Costa Garcia⁴

Letícia Jungmann Cançado⁵

Bruno do Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

As microalgas compõem um grupo de microrganismos taxonomicamente diversos com grande potencial biotecnológico. No entanto, a identificação taxonômica tradicional desses microrganismos é laboriosa e demorada. Neste trabalho, foi realizada a identificação molecular (DNA barcoding) das cepas de microalgas pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas da Embrapa, utilizando o marcador ITS2 e uma análise filogenética das suas relações taxonômicas. A partir dessas informações, foi realizado um levantamento bibliográfico das principais aplicações biotecnológicas relacionadas à utilização de microalgas, bem como sua correlação com as

¹ Bióloga, mestre em Biotecnologia, doutoranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

² Biotecnologista, mestre em Biociências, doutorando em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

³ Biotecnologista, mestre em Biotecnologia, doutorando em Bioinformática, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

taxas de microalgas presentes na coleção. Os resultados deste trabalho demonstraram que a diversidade de cepas depositadas na coleção abrange as principais famílias de microalgas utilizadas em estudos biotecnológicos nacionais e internacionais.

Termos para indexação: identificação. diversidade. aplicação. bioproduto. Chlorophyta.

Prospective assessment of the biotechnological potential of microalgae: a phylogenetic approach

Abstract

Microalgae is a taxonomic diverse group of microorganisms with great biotechnological potential. However, the taxonomical identification of these microorganisms is laborious and time consuming. In this work, the molecular identification using the ITS2 marker (DNA barcoding) of the microalgae strains belonging to Embrapa's Collection of Microorganisms and Microalgae, and the phylogenetic analysis of the taxonomic relationship. Using these data, a bibliographic survey of the main biotechnological applications related to the use of microalgae, as well as the establishment of the correlation of these with microalgae taxa belonging to the Embrapa's collection were performed. The results of this work demonstrate that the diversity of strains deposited in the collection include the main microalgae families used in biotechnological studies around the world.

Index terms: identification. diversity. application. bioproduct. Chlorophyta.

Introdução

As microalgas verdes (divisão Chlorophyta) são um grupo de microrganismos fotossintetizantes taxonomicamente diversos com aproximadamente 8 mil espécies descritas. Esses organismos são importantes produtores de matéria orgânica em ecossistemas terrestres, sendo alvo de crescente interesse para aplicações biotecnológicas, como a produção de combustíveis, produtos químicos, pigmentos e alimentos em geral (HADI et al., 2016).

O isolamento, a identificação e a preservação de recursos genéticos algais diversificados em coleção biológica de referência é fundamental para amparar o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético de microalgas. Todavia, a identificação de microalgas por morfologia é bastante desafiadora, especialmente para as espécies de maior interesse biotecnológico. Sendo assim, a utilização de métodos moleculares de identificação, como o DNA Barcoding, é fundamental para a adequada identificação e avaliação da diversidade de espécies depositadas em uma coleção biológica (FUΩÍKOVÁ et al., 2010).

A fim de avaliar se as principais espécies de interesse biotecnológico estão representadas e disponíveis na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa (HADI et al., 2016; BRASIL et al., 2016), este trabalho analisou a diversidade das microalgas presentes na coleção. Posteriormente, foi feita a correlação entre a identidade taxonômica desses recursos genéticos ao seu potencial de exploração biotecnológica, com base em informações disponíveis na literatura. Este trabalho foi publicado nos anais do IV Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia (CEREIJO et al., 2017) e esta publicação visa divulgar e tornar amplo o conhecimento sobre as áreas de aplicação das microalgas e definir o impacto das suas atuais áreas de pesquisa, como também vislumbrar as linhas de pesquisa ainda não desenvolvidas na Embrapa Agroenergia.

Material e métodos

Identificação de cepas baseada no marcador Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Para a identificação das cepas de microalgas pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias da Embrapa (subsequentemente denominada como coleção de microrganismos da Embrapa), foi realizada a extração do DNA genômico total de 76 cepas, utilizando o protocolo CTAB. O DNA extraído foi submetido à PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 e o produto da reação foi sequenciado pelo método de Sanger. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software Geneious 9, por meio do qual foi obtida uma sequência consenso para cada cepa. Essas sequências foram anotadas no ITS2 database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) para obtenção das sequências ITS2, que foram comparadas com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) por meio da ferramenta BLAST. Para identificação das cepas, foram adotados os critérios utilizados por Hadi et al. (2016).

Construção da árvore filogenética

Para estabelecer a relação evolutiva entre as cepas de microalgas, foi construída uma árvore filogenética baseada no marcador ITS2. Para isso, foi utilizado o software MEGA7, no qual as sequências ITS2 das cepas foram alinhadas com o ClustalW, e a árvore foi construída. Foi utilizado o método Maximum Likelihood baseado no modelo General Time Reversible (GTR) com sítios invariáveis (I) e parâmetro de distribuição Gamma (G).

Levantamento bibliográfico

O levantamento do número de pesquisas relacionadas a microalgas nas áreas de biorremediação, biocombustíveis, química fina, nanopartículas e alimentação, no período entre 2007 e 2016, foi realizado com o

Google Scholar com os gêneros mais representados (mais frequentes), pertencentes às famílias Chlamydomonadaceae (Chlamydomonas e Dunaliella), Chlorellaceae (Chlorella e Micractinium), Chlorococcaceae (Chlorococcum e Tetracystis), Scenedesmaceae (Desmodesmus e Scenedesmus) e Uronemataceae (Uronema). Critérios de busca utilizados: “Gênero” AND [“Área OR Área no plural”], excluindo citações da busca.

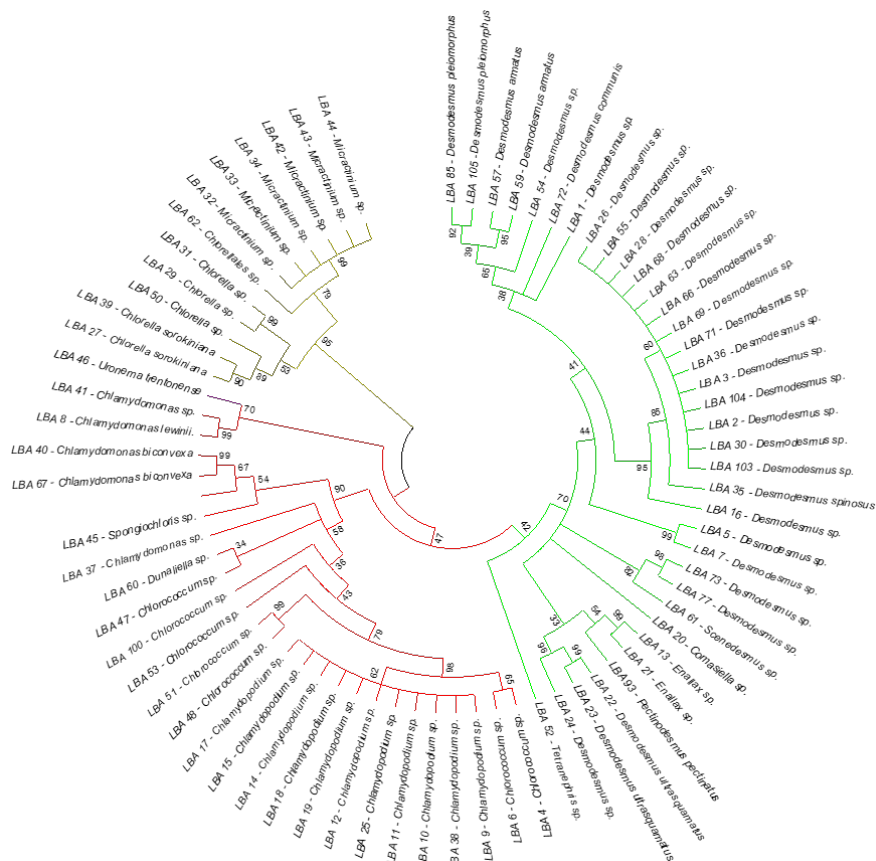
Resultados e discussão

Com o resultado da identificação molecular das 76 microalgas da coleção de microrganismos da Embrapa utilizando o marcador ITS2, foi construída uma árvore filogenética para analisar a relação taxonômica das cepas presentes na coleção (Figura 1).

Os dados resultantes da identificação molecular permitiram verificar que as cepas da coleção estão distribuídas em cinco famílias, sendo 47% (36) Scenedesmaceae, 25% (19) Chlorococcaceae, 16% (12) Chlorellaceae, 11% (8) Chlamydomonadaceae e 1% (1) Uronemataceae. Analisando a Figura 1, é possível observar que as cepas da família Chlorellaceae, pertencente à ordem Chlorellales, está filogeneticamente mais distante das demais famílias da coleção, que se agrupam nas ordens Chlamydomonadales (Chlamydomonadaceae e Chlorococcaceae) e Sphaeropleales (Scenedesmaceae). O representante da ordem Chaetophorales (Uronema trentonense), no entanto, foi agrupado no mesmo braço da árvore que estavam algumas espécies do gênero Chlamydomonas (Ordem Chlamydomonadaceae), indicando uma maior relação filogenética entre os representantes dessas duas ordens.

A partir dessas informações, foi realizado um levantamento na literatura para se verificar as áreas de estudo nas quais os gêneros mais representados na coleção são aplicados (Figura 2). Os resultados mostraram que, no período analisado, as principais áreas de interesse

Figura 1. Árvore filogenética das cepas de microalgas depositadas na coleção de microrganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias da Embrapa Agroenergia. A árvore foi construída utilizando o método Maximum Likelihood baseado no modelo General Time Reversible (GTR) com sítios invariáveis (I) e parâmetro de distribuição Gamma (G) (GTR + G + I). A análise foi realizada com base em 83 alinhamentos de 76 sequências ITS2. Os valores de bootstrap (1.000 replicatas) são mostrados próximos aos



galhos. Valor de cutoff = 30%. A análise evolutiva foi realizada no software MEGA7. As ordens Clorellales, Chlamydomnadales Chaetophorales e Sphaeropleales estão representadas, respectivamente, pelas cores oliva, vermelho, roxo e verde.

Na área de biorremediação de efluentes, por exemplo, Sukačová et al. (2015) conseguiram remover $97 \pm 1\%$ do fósforo presente na água residual urbana utilizando um consórcio entre cianobactérias (*Phormidium autumnale* e *Pseudanabaena* sp.) e uma microalga da família Scenedesmaceae (*Scenedesmus acutus*). Resultados similares foram observados em outro trabalho com a vinhaça, resíduo da cadeia de produção do etanol, em que o cultivo da cepa *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 (Chlorellaceae) levou à redução do teor de nitrato no efluente (SANTANA et al., 2017). Esses resultados indicam o potencial de aplicação de representantes dessas famílias para a biorremediação de efluentes, resultado que está associado com o crescente interesse em espécies dessas famílias na literatura (Figura 2).

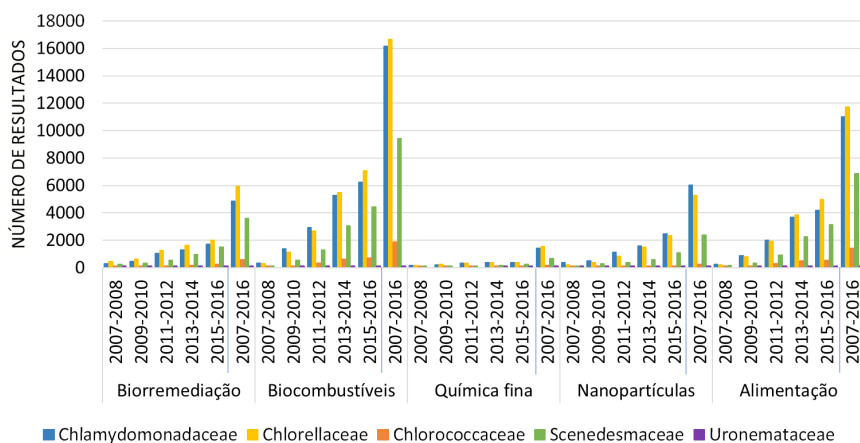


Figura 2. Número de resultados de pesquisa para estudos envolvendo microalgas em diferentes áreas entre 2007 e 2016. Para a obtenção dos resultados, foram realizadas buscas por estudos com espécies dos gêneros mais representativos de cada uma das famílias, utilizando a base de dados do Google Scholar.

A área de biocombustíveis tem sido o principal alvo de estudos com microalgas nos últimos 10 anos (Figura 2), sendo a maior parte dos trabalhos relacionada a espécies das famílias Chlorellaceae e Chlamydomonaceae. De fato, observa-se um grande potencial para espécies dessas famílias, como é observado em um trabalho realizado por Hodgskiss et al. (2016), no qual foi possível isolar uma cepa da família Chlorellaceae capaz de acumular 27% de teor de lipídeos em sua biomassa total. Segundo Cao et al. (2013), em decorrência da alta capacidade de acúmulo de lipídeos de espécies dessa família, é possível produzir biodiesel com alto rendimento a partir da biomassa úmida desse grupo de microrganismos. Dentre as cepas da coleção de microrganismos da Embrapa, 16% do total são representantes da família Chlorellaceae.

Assim como na área de biocombustíveis, os dados obtidos com o levantamento bibliográfico mostram que as espécies das famílias Chlamydomonadaceae e Chlorellaceae também são as mais estudadas quanto ao seu potencial uso na indústria de alimentos. Em trabalho realizado por Tibbetts et al. (2015), a caracterização da biomassa produzida por uma microalga da família Chlorellaceae mostrou que a mesma é alta produtora de aminoácidos essenciais e que por isso poderia ser utilizada para suplementação animal. Dentre as cepas da coleção, a *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 (Chlamydomonadaceae) (SANTANA et al., 2017) e *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA52 (Scenedesmaceae) (CEREIJO et al., dados não publicados) também apontaram um alto acúmulo de proteínas, indicando o potencial desses organismos para serem utilizados na nutrição animal ou humana. Como apontado por Cheunbarn e Cheunbarn (2015), em geral, a biomassa microalgal é altamente rica em proteínas essenciais para o desenvolvimento de peixes como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), podendo ser aplicada industrialmente para essa finalidade.

A indústria química é um segmento de alto valor agregado, que ainda explora pouco o potencial das microalgas. Esses organismos podem ser utilizados para a produção de vários produtos, dentre

eles o 1,2 propanodiol e o etileno glicol. De acordo com o trabalho desenvolvido por Miao et al. (2015), é possível utilizar um processo de produção direta dessas substâncias a partir de biomassa de microalgas da Família Chlorococcaceae com um rendimento de 41,5%. Wang et al. (2016), por sua vez, produziram 5-hidroximetilfurfural também utilizando uma espécie da família Chlorococcaceae. Esses resultados indicam uma potencial aplicação de cerca de 25% das cepas de microalgas da coleção de microrganismos da Embrapa (Figura 2).

Outro segmento de alto valor agregado é a produção de fármacos. Nesse setor, a nanotecnologia busca alternativas de tratamentos de várias patologias de maneira mais direcionada, evitando assim a exposição do organismo a maiores níveis de medicamentos. Segundo Khalid et al. (2017), é possível sintetizar nanopartículas de prata, utilizados para o tratamento de infecções virais e bacterianas e também no combate a neoplasias, a partir de extratos retirados de microalgas das famílias Chlorellaceae e Scenedesmaceae. Tendo em vista que 47% da coleção de microalgas da Embrapa Agroenergia são da família Scenedesmaceae, podem-se desenvolver pesquisas mais específicas para esse segmento.

Conclusões

Os resultados do trabalho demonstram que a coleção de microalgas da Embrapa apresenta significativa diversidade filogenética e possui representantes dos gêneros com potencial biotecnológico e industrial, como, por exemplo, as espécies das famílias Chlorellaceae e Chlamydomonadales. Levando em consideração os dados levantados, é possível verificar que a maior parte das cepas da coleção de microrganismos da Embrapa pertence à família Scenedesmaceae, sendo esta pouco explorada em todas as áreas de pesquisa analisadas. No entanto, esse dado não restringe a aplicação das cepas analisadas em outras áreas, como as de química fina e nanopartículas. Foi possível

apontar potenciais usos de espécies das famílias representadas na coleção de microrganismos da Embrapa, o que poderá permitir o direcionamento de futuros trabalhos com esses microrganismos para a produção de biocombustíveis, suplementos alimentares, químicos finos e nanopartículas.

Referências

BRASIL, B. S. A. F. et al. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New biotechnology**, 2016.

CAO, H. et al. Direct biodiesel production from wet microalgae biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through in situ transesterification. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

CEREIJO, C. R.; SANTANA, H.; HADI, S. I. I. A.; GARCIA, L. C.; JUNGSMANN, L.; BRASIL, B. dos S. A. F. Avaliação prospectiva do potencial biotecnológico de microalgas: uma abordagem filogenética. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4., 2017, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 73-79.

CHEUNBARN, T.; CHEUNBARN, S. Cultivation of Algae in Vegetable and Fruit Canning Industrial Wastewater Treatment Effluent for Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Feed. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 17, n. F2, p. 653-657, 2015.

FUΩKOVÁ, K. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**, v. 31, n. 4, p. 529-555, 2010.

HADI, S. I. et al. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149284, 2016.

HODGSKISS, L. H. et al. Cultivation of a native alga for biomass and biofuel accumulation in coal bed methane production water. **Algal Research**, v. 19, p. 63-68, 2016.

KHALID, M. et al. Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-13, 2017.

MIAO, G. et al. Efficient one-pot production of 1, 2-propanediol and ethylene glycol from microalgae (*Chlorococcum* sp.) in water. **Green Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2538-2544, 2015.

SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2017.

SUKAČOVÁ, K.; TRTÍLEK, M.; RATAJ, T. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water research**, v. 71, p. 55-63, 2015.

TIBBETTS, S. M. et al. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. **Algal Research**, v. 11, p. 435-447, 2015.

WANG, J. et al. One-pot catalytic conversion of microalgae (*Chlorococcum* sp.) into 5-hydroxymethylfurfural over the commercial H-ZSM-5 zeolite. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 452-460, 2016.



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

