



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Experiencias en cultivos *in vitro* de *Halamphora luciae*.
Aplicaciones de técnicas de espectrometría de masa en el
estudio de los hidratos de carbono y del proteoma**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **Ciencias Biológicas**

Lic. Yasmin Daglio

Directora de Tesis: Dra. María Cristina Matulewicz

Directora asistente: Dra. María Cecilia Rodríguez

Consejera de estudios: Dra. Nora Irene Maidana

Lugar de trabajo: CIHIDECAR-CONICET, Departamento de Química Orgánica,
FCEyN, UBA

Buenos Aires, 2019

Experiencias en cultivos *in vitro* de *Halamphora luciae*. Aplicaciones de técnicas de espectrometría de masa en el estudio de los hidratos de carbono y del proteoma

La diatomea bentónica *Halamphora luciae* del estuario de Bahía Blanca fue seleccionada como especie apta para el cultivo masivo con fines industriales. Se evaluó el crecimiento de cultivos unialgales axénicos en medios de cultivo *f/2* con distintos balances de nitrógeno:fósforo. La capacidad de carga de la población y la tasa de crecimiento disminuyeron en los medios carenciados de P (*f/2*-P) o N (*f/2*-N). En *f/2*-P aumentaron la movilidad celular, la secreción de sustancias poliméricas extracelulares y la actividad fosfatasa alcalina mientras que en *f/2*-N solo aumentó la relación superficie/volumen. El tamaño de las areolas se redujo en ambos medios carenciados. Mediante espectrometría de masa MALDI-TOF se demostró el incremento del peso molecular de los fragmentos de la crisolaminarina con el envejecimiento del cultivo y la incubación en *f/2*-P y *f/2*-N. Finalmente, se registraron cambios en el proteoma en las tres condiciones de cultivo. En los medios carenciados se destacan: la reducción de proteínas plastidiales, el incremento de enzimas de la biosíntesis de crisolaminarina coincidente con el mayor grado de polimerización de este polisacárido registrado por MALDI, la mayor abundancia de AcetilCoA carboxilasa y V-ATPasas conjuntamente con el mayor contenido de lípidos y aumento de volumen de las vacuolas lipídicas. Los resultados obtenidos sugieren el aprovechamiento de esta diatomea como una especie oleaginosa.

Palabras clave: carencia de nutrientes, crisolaminarina, diatomeas bentónicas, *Halamphora luciae*, MALDI-TOF, polisacáridos, proteómica.

***In vitro* culture assays with *Halamphora luciae*. Different mass spectrometry techniques applied for the characterization of carbohydrates and proteome.**

The benthic diatom *Halamphora luciae* isolated from the Bahía Blanca mudflat was obtained in of unialgal axenic cultures and assayed for growth in *f*/2 media with different nitrogen:phosphorus balances. Carrying capacity and growth rate of the population decreased in P (*f*/2-P) and N (*f*/2-N) depleted media. In *f*/2-P there were an increment in cellular motility, secretion of extracellular polymeric substances and alkaline phosphatase activity, while in *f*/2-N only a higher area/volume ratio was registered. Areolae size diminished in both nutrient depleted media. Higher molecular weight fragments of chrysolaminarin were detected by means of MALDI-TOF MS in aging cultures and under P and N depletion. Finally, the proteome was characterized in all growth conditions. Namely, in nutrient depleted media there was a diminution in plastid proteins, accompanying plastid reduction and disorganization, a higher abundance of enzymes of the biosynthesis of chrysolaminarin coinciding with the higher degree of polymerization of the polysaccharide observed in MALDI spectra, increase in AcetylCoA carboxylase and V-ATPases in concomitance with higher lipid content and bigger lipid vacuoles. The results suggest that this diatom can be exploited as an oleaginous species.

Key words: benthic diatoms, chrysolaminarin, *Halamphora luciae*, MALDI-TOF, nutrient depletion, polysaccharides, proteomics.

AGRADECIMIENTOS

A la FCEN (UBA) por brindarme una educación gratuita y de calidad a lo largo de estos años y por darme un lugar de trabajo y a CONICET por brindarme la beca de doctorado necesaria para realizar la presente Tesis.

A las Dras. María Cristina Matulewicz y María Cecilia Rodríguez ante todo por el cariño, respeto y calidez que me brindaron a lo largo de estos años. A Cris le agradezco por darme la posibilidad de incursionar en el mundo de la química y por su paciencia al momento de explicarme las técnicas, protocolos y mecanismos necesarios. A Ceci por introducirme en primer lugar en el mundo de las diatomeas y por compartirme sus conocimientos en los campos de la Biología, la Química y la ciencia en general siempre transmitiendo pasión en cada tema. Muchas gracias por el esfuerzo final en la entrega de esta Tesis. Fue un placer enorme haberlas conocido y trabajar con ustedes.

A mis compañeros del laboratorio 6 y 4 por todos estos años de labo, por la buena onda y por su ayuda en el momento de mis dudas químicas. Gracias a Rosi, Euge, Pablo, Rodrigo, Roxana, Carmen, Carola y Carla.

Al Dr. Juan Cabrera y a los Lic. Julieta Antoni y Martín Briozzo, los tesistas biólogos de Ceci por tantas horas compartidas en el mundo diatomológico.

Al Dr. Carlos Stortz y todo su laboratorio especialmente a los Dres. Diego Navarro, Andrea Ponce y Vanina Cosenza. Gracias Florencia, Melissa, Tomás, Frank, Matías, Andrés y Romina.

A las Dras. Patricia Leonardi y Cecilia Popovich y a todos los integrantes de su laboratorio, Melanie, Guadalupe, Karina y Cecilia por su afecto en mis estadías en

Bahía Blanca y por su ayuda en la recolección de la diatomea utilizada en este trabajo.

A la Dra. Nora Maidana y todos los integrantes del Laboratorio de Biología y Taxonomía de diatomeas continentales. Muchas gracias Nora por compartir tus infinitos conocimientos en la taxonomía de diatomeas y toda la ayuda en la caracterización de *Halamphora luciae* y las diatomeas de los trabajos publicados. Muchas gracias a los integrantes del “diato team” Luján, Sabrina, Marcelo y Vanesa por su buena onda cada vez que invadí su laboratorio.

A las Dras. Visitación Conforti y Ángela Juárez por darme la posibilidad de conocer el mundo de las algas desde hace 10 años, a todo el equipo del Laboratorio de Protistas, Laura, Paula, Analía, Verónica, Silvina, y Belén.

Al Dr. Sebastian Sabatini, la Dra. Gabriela Chaufan y a la Dra. María del Carmen Ríos por toda la ayuda brindada y su amabilidad.

A las Dras. Rosa Erra-Balsells y Laura Salum por la realización de los espectros de MALDI, los análisis posteriores y por compartir su conocimiento en el área de la espectrometría de masa.

A la Dras. Alcira Nesse y Daniela Vittori por brindarme su experiencia en el campo de la electroforesis.

A la Dra. Pía Valacco por su impecable trabajo en la parte de proteómica de la Tesis, pero sobre todo por su buena onda y predisposición para transmitirnos y explicarnos todo su saber en esta área.

A la Dra. Claudia Marchi por la pasión en la búsqueda de las mejores imágenes de MEB de las diatomeas que aparecen en la presente Tesis y en los trabajos publicados.

A la Dra. Cecilia Carmarán y a todo su equipo del Laboratorio de Micología, Fitopatología y Liquenología.

A la Dra. Marina Ciancia, Dr. Hugo Chludil, Dra. Pérez Recalde y a todos mis compañeros de agronomía por todos estos años de docencia compartida. Gracias Merce, Daiana, Juampi, Vir, Lucia, Paula, Camila, Franco, Martín, Gonza, Violeta, Luciano, Marga y Elena.

A la Dra. María Laura Martínez por todos estos años de aguante, consejos y amistad en el departamento de Química.

A José y Gabriela Dadon por tratarme con tanto cariño los días que invadí su casa. Muchas gracias José por tus invaluable correcciones a la Tesis.

A mis compañeros docentes del CBC que fueron tan pacientes conmigo en este último tiempo de finalización de la Tesis. Especialmente a Karina, Lili, Viviana, Eugenia, Mirna, Pablo y María Laura.

A mis amigas de la carrera Chantal y Cintia por estos más de 10 años de amistad incondicional y a la distancia, por los mates compartidos.

A mis amigos de toda la vida por aguantarme todos estos años hablar de algas y darme todo su cariño desde hace más de 20 años. Gracias Sabri, Mari, Mai, Nico, Eze, Jesy y Ana.

A mi familia entera, mis tíos Myriam, Roberto, Carlos y Alicia, mis primos Mercedes, Iván y Nazareth. Gracias Hilda, Carmen y Marilina y la familia Mattioli por estar en mi vida siempre.

A los que ya no están físicamente pero sí en mi corazón: Tía Martita y mis queridos abuelos Hilda, Carlos, Betty y sobre todo a mi abuelo Benjamín por todo el amor que me brindó los últimos años.

A la familia Giachetti y Martinicorena por hacerme parte de su gran familia, especialmente a Marta y Mario.

Un gracias gigante a mi mamá Nancy, mi papá Ricardo y mi hermana Denise, “gordi”, por estar siempre en las buenas y en las malas, por haberme apoyado desde el día cero que les dije que quería ser bióloga y sobre todo por cuidarme, mimarme y amarme todos los días.

A Juan por su amor incondicional, su aguante, su energía positiva en todos los proyectos que encaramos juntos, por confiar en mí y alentarme todos estos años de la Tesis y sobre todo por hacerme la mujer más afortunada todos los días.

“Few objects are more beautiful than the minute siliceous cases of diatoms: were they only created to be admired under the microscope?”

“Pocos objetos son más hermosos que los diminutos frústulos silíceos de las diatomeas: ¿Han sido creados únicamente para ser admirados bajo el microscopio?”

Charles Darwin

De: On the Origin of Species by Means of Natural Selection. (1859)

La presente Tesis fue posible gracias a la beca doctoral del Consejo Nacional de investigaciones científicas y técnicas (CONICET). Resultados generados en la misma se encuentran publicados en:

Daglio Y., Maidana N. I., Matulewicz M. C., Rodríguez M. C. (2016). Changes in motility and induction of enzymatic activity by nitrogen and phosphate deficiency in benthic *Halamphora luciae* (Bacillariophyceae) from Argentina. *Phycologia*, 55: 493-505.

Daglio Y., Salum L., Erra-Balsells R., Rodríguez M.C., Matulewicz M.C. (2018). Characterization of nutrient status of *Halamphora luciae* (Bacillariophyceae) using matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Journal of Phycology*, 53: 422-432.

También durante el período de trabajo la autora participó en las siguientes publicaciones, en temas relacionados:

Daglio Y., Sacristán H., Ansaldo M., Rodríguez M. C. (2018). Benthic diatoms from Potter Cove, 25 de Mayo (King George) Island, Antarctica: Mucilage and glucan storage as a C-source for limpets. *Polar Science*, 15: 39-48.

Conforte V.P., Yaryura P.M., Bianco I., Rodríguez M.C., **Daglio Y.**, Prieto E., Schilardi P., Vojnov A.A. (2019). Changes in the physico-chemical properties of the xanthan produced by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in grapefruit leaf extract. *Glycobiology*, 29: 269-278.

ÍNDICE

Objetivos generales.....	1
Hipótesis.....	2
Abreviaturas utilizadas.....	4

SECCIÓN 1

INTRODUCCIÓN

Las diatomeas: características generales. El género *Halamphora*

1.1. Características generales de las diatomeas.....	6
1.2. Movilidad en diatomeas con rafe.....	13
1.3. Clasificación de las diatomeas.....	16
1.4. Ciclo de vida de las diatomeas.....	17
1.5. Sobre el género <i>Halamphora</i>.....	18
1.5.1. Sobre la especie <i>Halamphora luciae</i>	20

RESULTADOS

Aislamiento y cultivo de *Halamphora luciae*. Efecto de la carencia de fósforo y nitrógeno en experiencias de cultivo *in vitro*.

2.1. Aislamiento de diatomeas bentónicas del estuario de Bahía Blanca. Identificación taxonómica y selección de la cepa de estudio.....	22
2.2. Incidencia de la limitación y la carencia de fósforo y nitrógeno sobre el crecimiento de <i>Halamphora luciae</i>.....	24
2.3. Morfología de <i>H. luciae</i>	28
2.3.1. Morfometría de vacuolas lipídicas y cuantificación colorimétrica de lípidos totales.....	28
2.3.2. Determinación de la composición de pigmentos fotosintéticos.....	30
2.3.3. Morfología y morfometría de los frústulos.....	32
2.3.3.1 Biovolumen y área celular.....	36
2.4. Movilidad de las células de <i>H.luciae</i>.....	37

2.4.1. Tipos de desplazamiento.....	37
2.4.2. Velocidad de desplazamiento.....	39
2.4.3. Producción de s-EPS.....	41
2.4.4. Tinción del mucílago extracelular con azul de toluidina.....	42
2.4.5. Observación de la secreción de mucílago <i>in vivo</i> por ESEM.....	43
2.5. Actividad fosfatasa alcalina.....	44
2.5.1. Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina con el sustrato organofosforado <i>p</i> -nitrofenilfosfato (<i>p</i> NPP).....	44
2.5.2. Zimografía.....	47
2.6. Actividad proteasa.....	48
2.6.1. Cuantificación de la actividad proteasa con azocaseína.....	48
2.6.2. Zimografía.....	49

DISCUSIÓN

2.7. Variables físico-químicas y aislamiento de diatomeas bentónicas del estuario de Bahía Blanca.....	50
2.8. Incidencia del medio de cultivo sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos.....	51
2.9. Morfología y morfometría.....	55
2.10. Velocidad de desplazamiento y secreción de mucílago.....	57
2.11. Actividad enzimática.....	60

SECCIÓN 2

INTRODUCCIÓN

Aplicación de técnicas de espectrometría de masa en el estudio de polisacáridos y proteínas de diatomeas

3.1. El frústulo: sílice y materia orgánica con una arquitectura compleja.....	63
3.1.1. Polisacáridos.....	63
3.2. Sustancias poliméricas extracelulares.....	64
3.3. Composición de las EPS.....	67
3.4. Polisacárido de reserva.....	68

Aplicación de técnicas de espectrometría de masa para el estudio de polisacáridos y proteínas

3.5. Fundamentos de la espectrometría de masa.....	70
3.5.1. Técnicas de ionización fuerte y suave.....	71
3.5.2. Analizadores.....	74
3.5.3. Carga de los iones.....	76
3.6. Espectrometría de masa UV-MALDI.....	76
3.6.1. Matrices utilizadas.....	78
3.6.2. Preparación de la muestra.....	79
3.7. Volatilización/ionización por nebulización en un campo eléctrico (ESI).....	82
3.8. Estudio de proteínas mediante proteómica.....	84
3.8.1. Digestión de proteínas en péptidos.....	86
3.8.2. Separación de péptidos y proteínas	87
3.8.3. Espectrometría de masa en tándem (MS _n).....	88
3.8.4. Asignación péptido-espectro.....	89
3.8.5. Evaluación estadística.....	91
3.8.6. Inferencia de proteínas a partir de péptidos.....	92

RESULTADOS

Aplicación de la espectrometría de masa para el estudio de los polisacáridos y el proteoma de *Halamphora luciae*

4.1. Caracterización de las s-EPS de <i>H. luciae</i> en distintas condiciones de cultivo.....	93
4.1.1 Cromatografía de permeación en gel.....	93
4.1.2. Composición de hidratos de carbono y proteínas.....	94
4.1.3. Composición de monosacáridos.....	95
4.1.4. Análisis por UV-MALDI-TOF MS de las s-EPS.....	97
4.2. Análisis de las extracciones acuosas a partir de células de <i>H. luciae</i>.....	99
4.2.1. Cromatografía de permeación en gel.....	99
4.2.2. Composición de monosacáridos.....	101
4.2.3. Análisis por UV-MALDI-TOF MS de los extractos acuosos.....	102
4.2.4. Análisis estructural de RTW por metilación	103
4.3. Análisis de las células de <i>H. luciae</i>.....	105
4.3.1. Composición de hidratos de carbono y proteínas.....	105

4.3.2. Monosacáridos componentes de las células hidrolizadas.....	107
4.3.3. Análisis por UV-MALDI-TOF MS de las células enteras.....	108
4.3.4. Monosacáridos componentes y análisis por UV-MALDI-TOF MS de células congeladas.....	113
4.3.5. Detección de (1→3)-β-d-glucanos con azul de anilina.....	115
4.4. Análisis de proteínas totales por electroforesis SDS-PAGE.....	117
4.4.1. Obtención de los extractos proteicos.....	117
4.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	117
4.4.3. Análisis por HPLC-ESI de proteínas totales.....	118
 DISCUSIÓN	
4.5. Sustancias poliméricas extracelulares.....	136
4.6. Detección de (1→3)-β-D-glucanos.....	138
4.7. Análisis del proteoma.....	143
4.7.1. Análisis del metabolismo energético y central del carbono de células de <i>H. luciae</i> cultivadas en medio completo <i>f</i> /2.....	145
4.7.2. Proteoma de <i>H. luciae</i> bajo carencia de P y N.....	157
4.7.3. Proteoma de células cultivadas en medio carente de P.....	159
4.7.4. Proteoma de células cultivadas en medio carente de N.....	164
 MÉTODOS EXPERIMENTALES	
Consideraciones generales.....	171
 SECCIÓN 1	
MUESTREO Y CULTIVO DE ESPECIES DE DIATOMEAS	
5.1. Recolección del material.....	174
5.2. Aislamiento de diatomeas a partir de muestras de los sedimentos.....	175
5.3. Obtención de cultivos unialgales.....	176
5.4. Identificación de las especies de diatomeas.....	177
5.4.1. Preparados permanentes para microscopia óptica.....	178
5.4.2 Preparación del material para microscopía electrónica de barrido (MEB).....	179
5.5. Obtención de cultivos axénicos de <i>Halaphora luciae</i>.....	179
5.5.1 Tratamiento por ultrasonido.....	179
5.5.2. Tratamiento con antibióticos.....	179

BIOENSAYOS

5.6. Cultivo de <i>H. luciae</i> con diferentes relaciones de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo.....	180
5.7. Determinación de lípidos totales	181
5.7.1. Preparación de la curva estándar.....	181
5.7.2. Extracción de los lípidos totales.....	182
5.7.3. Reacción colorimétrica de la sulfo-fosfo-vainillina.....	182
5.8. Determinación de la composición de pigmentos fotosintéticos	183
5.9. Morfometría.....	184
5.9.1. Biovolumen y área total de las células de <i>H. luciae</i>	184
5.10. Velocidad de desplazamiento y porcentaje de células en movimiento.....	185
5.11. Cinética de producción de s-EPS.....	185
5.12. Tinción con azul de toluidina del mucilago extracelular.....	186
5.13. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)	186
5.14. Medición de actividad enzimática por colorimetría.....	186
5.14.1. Actividad fosfatasa alcalina.....	186
5.14.2. Actividad proteasa	188
5.15. Zimografía.....	191
5.15.1. Fosfatasa alcalina.....	191
5.15.2. Proteasa.....	192
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	193

SECCIÓN 2

5.16. Fraccionamiento de los hidratos de carbono de <i>H. luciae</i>.....	194
5.16.1. Sustancias poliméricas extracelulares solubles (s-EPS)	194
5.16.2. Polisacáridos de reserva.....	195
5.17. Cromatografía de permeación en gel.....	196
5.18. Detección de (1→3)-β-D- glucanos con azul de anilina.....	197

MÉTODOS GENERALES

5.19. Determinación del contenido de proteínas.....	197
5.20. Determinación cuantitativa de hidratos de carbono totales.....	198
5.21. Determinación de los azúcares componentes.....	199
5.21.1. Hidrólisis ácida total.....	199
5.21.2. Preparación de los alditos acetilados.....	199

ANALISIS ESTRUCTURAL DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS

5.22. Metilación.....	200
5.23. Cromatografía gas-líquido.....	201
5.23.1. Análisis de acetatos de alditos y acetatos de alditos parcialmente metilados.....	201
5.23.2. Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa	202
5.24. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.....	202
5.24.1. MALDI TOF de los polisacáridos solubles y sustancias de reserva	204
5.24.2. MALDI TOF de las células.....	205

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS y MS

5.25. Extracción de proteínas totales.....	205
5.25.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	206
5.26. Revelado de los geles de electroforesis.....	206
5.26.1. Revelado con azul de Coomasie.....	206
5.26.2. Revelado con nitrato de plata.....	207
5.27. Detección de proteínas por espectrometría de masa ESI.....	207
5.27.1. Tratamiento de muestras.....	207
5.27.2. Configuración del equipo y la corrida.....	208
5.27.3. Análisis de Datos.....	210

CONCLUSIONES.....	213
--------------------------	------------

CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	218
----------------------------------	------------

Objetivos generales

Los **objetivos generales** fueron:

- Caracterizar los polisacáridos y proteínas de la diatomea bentónica *Halimnobia luciae*, especie frecuente en el estuario de Bahía Blanca con potencialidad para ser cultivada a gran escala con fines industriales.
- Estudiar la incidencia de las variables de cultivo en la producción de las sustancias poliméricas solubles (EPS) y de la sustancia de reserva, un (1→3)- β -D-glucano.
- Analizar los cambios metabólicos producidos por la carencia de nutrientes en el proteoma.

Los **objetivos específicos** propuestos fueron los siguientes:

- Optimizar el rendimiento de biomasa de la microalga ajustando las condiciones de cultivo.
- Optimizar la producción de mucílago extracelular.
- Evaluar el efecto de la carencia de nutrientes (nitrógeno y fósforo) por medio de:
 - indicadores morfológicos (biovolumen, morfometría del frústulo),
 - cambios en la movilidad (patrón de movimiento, velocidad de desplazamiento),
 - indicadores fisiológicos (acumulación de lípidos, actividad enzimática fosfatasa alcalina y proteasa en el mucílago extracelular),
 - análisis del proteoma.

- Puesta a punto de las técnicas de cosecha y purificación de mucílago extracelular.
- Optimización de las técnicas de aislamiento, purificación y caracterización de los polisacáridos celulares y extracelulares.

A fin de presentar de forma ordenada los resultados obtenidos a partir de los objetivos propuestos, la tesis se estructuró en dos secciones.

En la Sección 1 se describen el hábitat, la morfología y forma de vida de las diatomeas en general y de la especie *Halamphora luciae*, en particular. Se detallan los análisis morfométricos mediante el uso de microscopía (óptica, MEB, ESEM) y los ensayos fisiológicos realizados sobre la especie en cuestión (velocidad de desplazamiento, actividad de fosfatasa alcalina, actividad proteasa) cultivada en medio *f/2* completo y con carencia de P y N.

La Sección 2 se focaliza en la aplicación de técnicas de espectrometría de masa para estudiar la incidencia de las condiciones de cultivo sobre los polisacáridos y el proteoma de las células.

HIPÓTESIS

Las **hipótesis** a poner a prueba son:

Hipótesis 1: La carencia de nutrientes estimula la acumulación de lípidos de *H. luciae*.

Hipótesis 2: La carencia de nutrientes provoca modificaciones en el área y en el biovolumen celular de *H. luciae*.

Hipótesis 3: La deficiencia de nutrientes provoca cambios en la morfología del frústulo de las diatomeas de *H. luciae*.

Hipótesis 4: La abundancia de los polisacáridos extracelulares depende de la composición de la solución nutritiva del medio.

Hipótesis 5: La movilidad celular de *H. luciae* depende de la composición del medio de cultivo.

Hipótesis 6: La carencia de fósforo induce la actividad de fosfatasas alcalinas extracelulares en *H. luciae*.

Hipótesis 7: La carencia de nitrógeno induce la actividad de proteasas en *H. luciae*.

Hipótesis 8: El grado de polimerización de los polisacáridos intracelulares depende de la edad de cultivo.

Hipótesis 9: El grado de polimerización de los polisacáridos intracelulares varía con la deficiencia de fósforo y nitrógeno.

Hipótesis 10: El proteoma de *H. luciae* difiere según las condiciones nutritivas del medio de cultivo.

Abreviaturas utilizadas:

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato.

b-EPS: sustancias poliméricas extracelulares adheridas a la membrana plasmática.

BSA: albúmina del suero bovino.

CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

CHCA: ácido- α -ciano-4-hidroxicinámico.

CG: cromatografía gaseosa.

DHBA: ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico).

DMSO: dimetilsufóxido.

EI: ionización electrónica.

ESEM: microscopia electrónica de barrido ambiental.

ESI: volatilización/ionización por nebulización en un campo eléctrico (*electrospray ionization*).

f/2: medio de cultivo f/2.

f/2-N: medio de cultivo f/2 con carencia de nitrógeno.

f/2-P: medio de cultivo f/2 con carencia de fósforo.

HCD: celda de colisión de alta energía (*high collision dissociation*).

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia (*high performance liquid chromatography*).

MEB: microscopia electrónica de barrido.

M_n : promedio numérico.

MS: espectrometría de masa.

M_w : promedio pesado.

NBT: azul de nitrotetrazolio.

nHo: *nor*-harmano.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*).

PF: peso fresco.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

pNPP: *p*-nitrofenilfosfato.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SA: ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico(ácido sinapínico).

s-EPS: sustancia poliméricas extracelulares solubles.

s-EPSc: sustancia poliméricas extracelulares solubles del medio completo *f*/2.

s-EPS-N: sustancia poliméricas extracelulares solubles del medio carente de nitrógeno.

s-EPS-P: sustancia poliméricas extracelulares solubles del medio carente de fósforo.

TAGs: triacilglicéridos.

TCA: ácido tricloroacético.

TFA: ácido trifluoroacético.

UDP-Glc: uridinadifosfato- glucosa.

UV-MALDI-TOF MS: espectrometría de masa de desorción/ionización inducida por un láser ultravioleta y asistida por una matriz con analizador de tiempo de vuelo (*ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry*)

SECCIÓN 1

Motivaciones que llevaron al desarrollo de esta Tesis

En la actualidad, la mayor parte de la demanda energética mundial se satisface con combustibles fósiles, cuyo agotamiento se estima ocurrirá dentro de los próximos 50 años (Rodolfi *et al.* 2008). Por lo tanto, la búsqueda de fuentes de energía renovables y ambientalmente no dañinas es crucial. En este marco se está ensayando el desarrollo de los biocombustibles.

En Argentina desde hace unos años se impulsaron investigaciones vinculadas al desarrollo de biorrefinerías tendientes a fortalecer el desarrollo de procesos a escala piloto que permitan el procesamiento de la biomasa existente principalmente en el sur de la Provincia de Buenos Aires, el NOA y el NEA.

Si bien en Argentina, la biomasa agrícola es la principal fuente de biocombustibles, la producción de biomasa microalgal ha despertado gran interés mundial como materia prima de “tercera generación”, debido a su alta tasa de crecimiento, elevada producción de aceites y capacidad de mitigación de las emisiones de CO₂ (Leonardi *et al.* 2011).

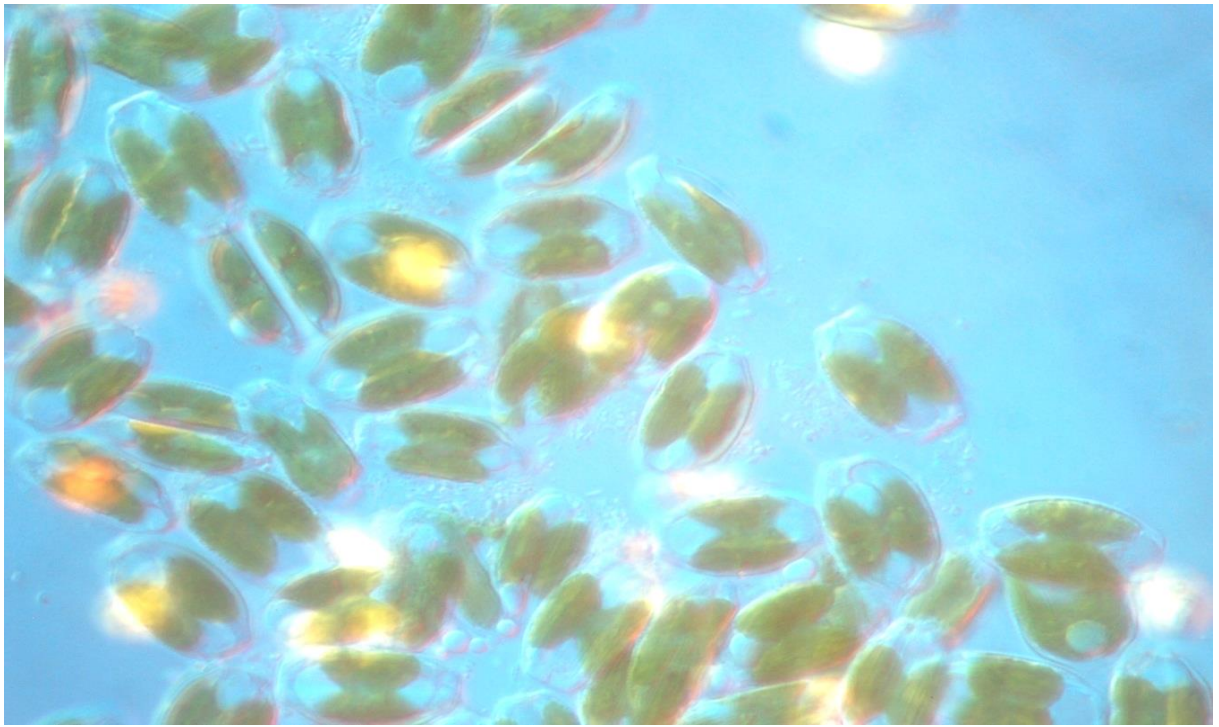
Las biorrefinerías microalgales tienen el potencial para producir bioenergía, polímeros y compuestos químicos, que pueden ser utilizados principalmente en la industria nutracéutica y bioenergética (Barnech Bielsa *et al.* 2016, Martín *et al.* 2016, Zulu *et al.* 2018).

El estrés producido por la carencia de nutrientes, especialmente de fósforo (P) y nitrógeno (N) fue ampliamente estudiado como uno de los factores que producen un cambio en la distribución del carbono fijado en las diatomeas (Yang *et al.* 2013, Wang *et al.* 2014, Abida *et al.* 2015, Caballero *et al.* 2016, Remmers *et al.* 2017, Daglio *et al.* 2018, Zulu *et al.* 2018). El carbono asimilado se

particiona principalmente en hidratos de carbono, como crisolaminarina o sustancias poliméricas extracelulares, lípidos específicamente como TAGs (Kroth *et al.* 2008) o proteínas (Wagner *et al.* 2017)

La obtención de todas estas biomoléculas no es aleatoria, y depende de la especie de diatomea seleccionada, de un conocimiento profundo de su biología y fisiología y de una determinación rigurosa de las estrategias de cultivo de acuerdo al metabolito a explotar.

INTRODUCCIÓN



Las diatomeas: características generales.

El género *Halamphora*

1.1. Características generales de las diatomeas

Las diatomeas conforman el grupo con mayor biodiversidad dentro de los eucariotas unicelulares. Se encuentran en todo tipo de hábitats acuáticos, tanto marinos como continentales, lóticos o lénticos, incluyendo ambientes transitoriamente secos (Graham & Wilcox 2009).

Pueden ser planctónicas o bentónicas, de vida libre o sésiles, en cuyo caso se adhieren al sustrato o entre sí a través de películas mucilaginosas, pedúnculos, espinas, etc. (Round *et al.* 1990, Medlin 2016). Menos frecuentemente, se las encuentra como endosimbiontes dentro de las células de dinoflagelados y foraminíferos (Holzmann *et al.* 2006, Hehenberger *et al.* 2016).

Generalmente son fotoautótrofas y como tales son responsables del 40 % de la producción primaria en los sistemas marinos y del 25 % a nivel global (Field *et al.* 1998, Geider *et al.* 2001, Tréguer *et al.* 2018). Juegan un papel central en el reciclado biogeoquímico de nutrientes como el carbono, el nitrógeno y la sílice. Como componentes de la bomba biológica de carbono oceánica, secuestran CO₂ atmosférico que se acumula en el lecho oceánico (Bowler *et al.* 2010).

Las especies bentónicas suelen ser mixotróficas, alternando un patrón fotosintético durante el día con la asimilación de materia orgánica durante la noche, al tiempo que siguen un ciclo de migración vertical en los sedimentos (Saburova & Polikarpov 2003).

Las especies planctónicas están expuestas a cambios drásticos en las intensidades y frecuencias del espectro lumínico debido al movimiento turbulento del agua. Falkowski & Knoll (2007) atribuyen el éxito de las diatomeas como organismos planctónicos al perfil de sus pigmentos fotosintéticos, junto a otras adaptaciones morfo-fisiológicas (Padisák *et al.* 2003).

Los cloroplastos, producto de endosimbiosis secundaria, están envueltos por cuatro membranas. Los tilacoides se agrupan de a tres, rodeados por una lamela periférica (*girdle lamella*) (Archibald 2012).

La estructura tilacoidal más laxa de los plastos secundarios, que carecen de granas, permite un contacto físico más fluido entre los dos fotosistemas a través de la difusión facilitada de los transportadores de electrones (complejos citocromo b_6 y citocromo f) contribuyendo a la fotoprotección del fotosistema II en condiciones saturantes de iluminación (Flori *et al.* 2017).

La clorofila a y las clorofilas $c2$ y $c1$ o $c3$, junto con la fucoxantina, forman el complejo FCP (fucoxantina-clorofila-proteína) que funciona como antena (Wilhelm *et al.* 2014, Büchel *et al.* 2017). Adicionalmente, otros pigmentos accesorios como el β -caroteno, la diadinoxantina, la diatoxantina, la violaxantina, la anteraxantina y la zeaxantina actúan como fotoprotectores.

A pesar de la gran variedad de proteínas de los complejos FCP (**Figura 1.1**), la pigmentación pardo-dorada es bastante uniforme debido a la concentración elevada de xantofilas, en particular fucoxantina (Kuczyńska *et al.* 2015).

Por otro lado, la abundancia relativa de los acerbos proteicos de los complejos FCP varía con la intensidad de la iluminación (Wilhelm *et al.* 2014, Flori *et al.* 2017). Además, existen diferencias en el espectro de absorción de las fucoxantinas asociadas a cada uno de los fotosistemas; las que absorben a longitudes de onda más largas intervienen en la transferencia de energía en el fotosistema II (Veith *et al.* 2009, Büchel *et al.* 2017) (**Figura 1.1**).

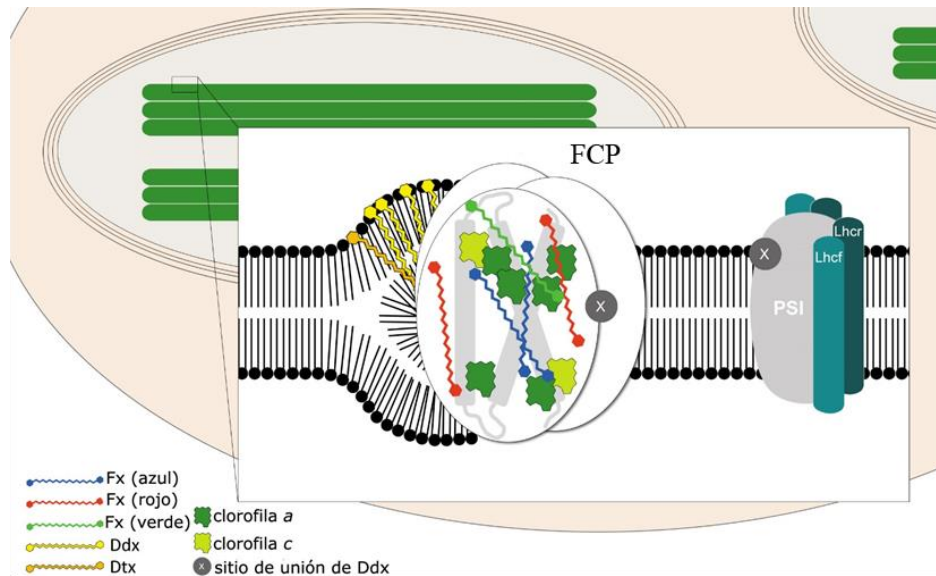


Figura 1.1: Esquema simplificado de la organización de los fotosistemas en las membranas del tilacoide. En detalle, se muestra el complejo antena asociado al fotosistema II. Fucoxantinas (Fx) de diferente espectro de absorción se asocian a proteínas y clorofila en los complejos FCP. Adicionalmente, otros carotenos como la diadionoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx) se localizan dentro de la bicapa lipídica. Referencias: PSI: fotosistema I, Lhc: complejos antena asociados al fotosistema I (Modificada a partir de Kuczynska *et al.* 2015).

El tipo y acumulación de sustancias de reserva dentro de vacuolas citoplasmáticas varía con las condiciones de crecimiento. Las principales sustancias de reserva son: el polisacárido crisolaminarina, un (1→3)-β-D-glucano con diferentes grados de ramificación (Størseth *et al.* 2006), lípidos que incluyen triacilglicéridos (TAGs) y ácidos grasos (Chen 2012, Yang *et al.* 2013, Bellou *et al.* 2014, Cañavate *et al.* 2016) o cuerpos de polifosfato en forma de gránulos de volutina (Diaz *et al.* 2008).

Las diatomeas carecen de células vegetativas monadoides. Únicamente las gametas masculinas de las especies céntricas poseen un flagelo con mastigonemas (van den Hoek *et al.* 1995, Graham & Wilcox 2009, Adl *et al.* 2012). En corte

transversal, el axonema carece del par central de microtúbulos (estructura 9+0) (Jensen *et al.* 2003), lo que explica su escasa movilidad.

El aspecto más sobresaliente de las diatomeas es su cubierta celular, el **frústulo**, compuesto fundamentalmente por sílice amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) recubierta externamente por una capa de materia orgánica (Aumeier & Menzel 2012). En algunos casos, dicha cubierta orgánica puede depositarse entre el frústulo y la membrana plasmática, el diatotepum (Underwood & Paterson 2003, Tesson & Hildebrand 2013, Bedoshvili *et al.* 2018).

Cada elemento de la cubierta formado por sílice es sintetizado dentro de una vesícula de deposición de sílice (SDV) ubicada en el citoplasma (Round *et al.* 1990, van den Hoek *et al.* 1995). En las últimas décadas han sido aisladas una pléyade de proteínas y moléculas orgánicas involucradas en la internalización de la sílice, el proceso de silicificación y la estabilización del frústulo (Hildebrand 2008, de Tommasi *et al.* 2017), como las frustulinas, las silafinas, las pleuralinas, las cingulinas y las poliaminas de cadena larga (Sumper *et al.* 2005, 2007, Kröger & Poulsen 2008).

La sílice es resistente al ataque enzimático, confiriendo a las diatomeas invulnerabilidad al ataque de microorganismos y herbívoros (Graham & Wilcox 2009). En consecuencia, el frústulo es en gran medida responsable de las ventajas adaptativas que contribuyeron a la expandida distribución y biodiversidad del grupo (Gross 2012).

El frústulo está formado por dos piezas parcialmente superpuestas, la **epiteca** y la **hipoteca** (de menor tamaño que la anterior). Cada una se compone de una **valva** y los elementos del **cíngulo** adyacentes a la valva. Se los denomina epivalva

y epicíngulo e hipovalva e hipocíngulo conforme pertenezcan a la epiteca o hipoteca, respectivamente (**Figura 1.2**).

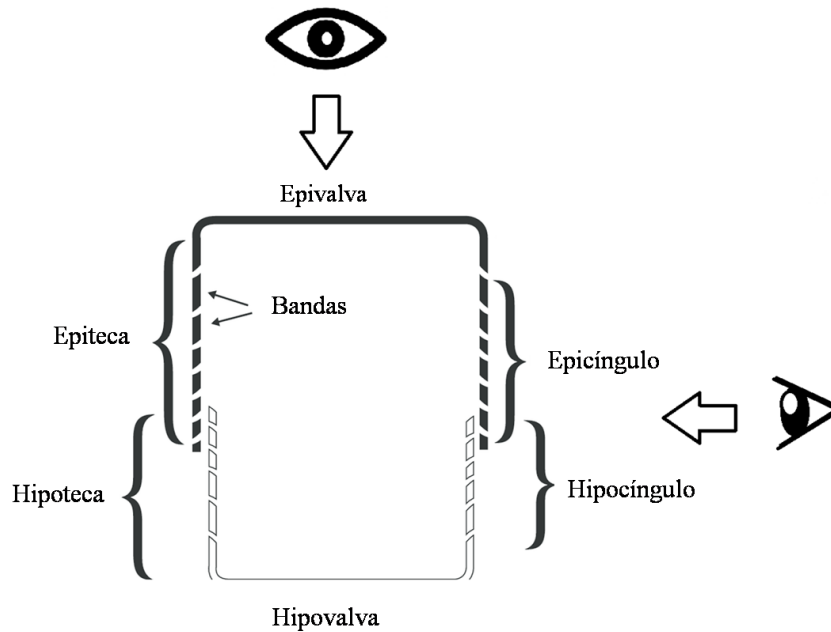


Figura 1.2: Representación del frústulo y sus elementos en vista cingular (esquema modificado de Hasle & Sylvertsen 1997). En la figura se indican las vistas valvar y cingular, dependiendo si el frústulo es observado desde arriba o desde alguno de sus lados.

La expansión de las células ocurre en la zona del cíngulo. Las bandas cingulares difieren en su morfología en las distintas especies, siendo completamente cerradas, con hendiduras o con proyecciones (lígulas) (Graham & Wilcox 2009, Cox 2014) (**Figura 1.3**).

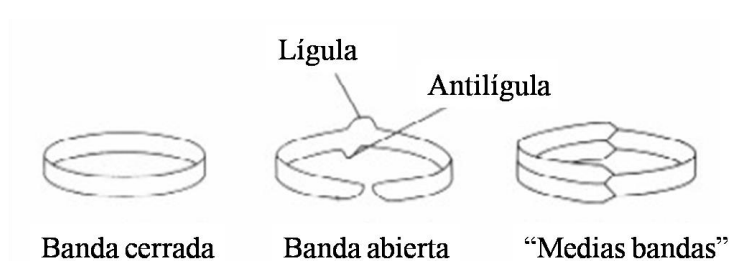


Figura 1.3: Diferentes tipos de bandas del cíngulo (Adaptado de Graham & Wilcox 2009).

Tanto las valvas como el cingulo están atravesados por poros de distinto tamaño o tipo, llamados **areolas** (Figura 1.4a). La función de estas aberturas es permitir el intercambio gaseoso y de moléculas entre la célula y el medio; además disminuyen la densidad del frústulo retardando el hundimiento de las especies planctónicas en la columna de agua. Frecuentemente, las areolas están recubiertas por una delgada capa de sílice perforada por pequeños poros, el **velo**. Las areolas pueden alinearse en filas denominadas **estrías**, que se observan al microscopio óptico como líneas paralelas (Figura 1.4a).

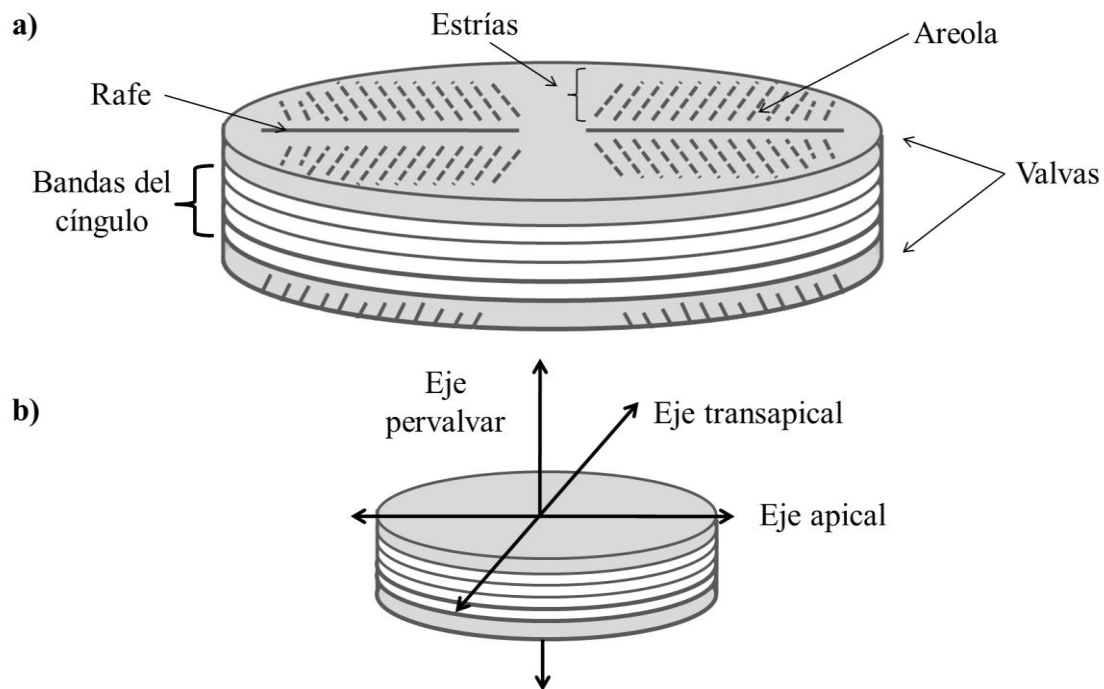


Figura 1.4: Esquema del frústulo de una diatomea pennada con rafe, **a)** elementos del frústulo, **b)** ejes de simetría en una diatomea pennada: apical, transapical y pervalvar.

Según la simetría de la valva sea radial o bilateral, se distinguen dos grandes grupos morfológicos: las diatomeas “**céntricas**” y “**pennadas**” (Round *et al.* 1990).

La simetría de los frústulos se define de acuerdo a un sistema de ejes. Las diatomeas pennadas presentan tres ejes de simetría (**Figura 1.4b**): el eje apical, el transapical y el pervalvar. El **eje apical** corre de un extremo al otro de la valva y define su longitud. El **eje transapical** es perpendicular al eje apical y define el ancho de la valva. Por último el **eje pervalvar** atraviesa la hipoteca y la epiteca, es perpendicular a los dos ejes anteriores y denota la altura del frústulo.

En las diatomeas pennadas una o ambas valvas pueden presentar una hendidura longitudinal con extremos variables conocida como **rafe** (**Figura 1.4a**). El rafe se localiza por lo general en el centro de la valva, aunque puede ser marginal en algunas especies (Graham & Wilcox 2009). De acuerdo con la presencia o ausencia de rafe, se las separa en diatomeas con y sin rafe, respectivamente.

El rafe puede extenderse en forma continua a lo largo de toda la valva o bien estar interrumpido por engrosamientos llamados **nódulos centrales** o **terminales**, según se encuentren en el centro o en sus extremos.

En corte transversal de la valva, la hendidura del rafe se observa en forma de “zig-zag” (**Figura 1.5**).

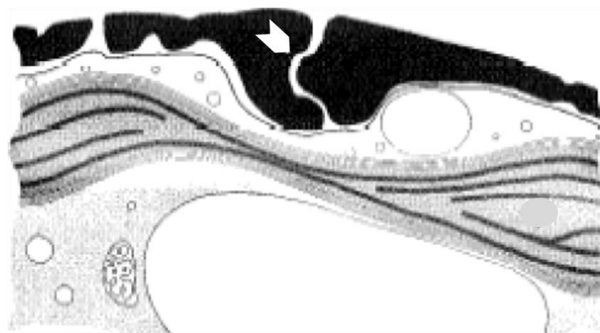


Figura 1.5: Representación de un corte transversal en la región del rafe de una diatomea con rafe. La flecha blanca señala el aspecto de zig-zag de la hendidura. (Imagen de Graham & Wilcox 2009).

Las dos mitades de la valva encajan una dentro de otra a través de una especie de cuña, cuya función es conferir mayor resistencia y evitar la ruptura a lo largo de esta fractura.

1.2. Movilidad en diatomeas con rafe

Las diatomeas pennadas se desplazan mediante la liberación de mucílago a través del rafe o de campos porosos en una o en ambas valvas (van den Hoek *et al.* 1995). Wetherbee *et al.* (1998) propusieron un mecanismo celular de desplazamiento a través de un continuo de proteínas conectoras y transmembrana que se extienden desde los filamentos de actina del citoesqueleto hasta el mucílago adherido a la superficie del sustrato, denominado complejo de adhesión (CA) (Figura 1.6).

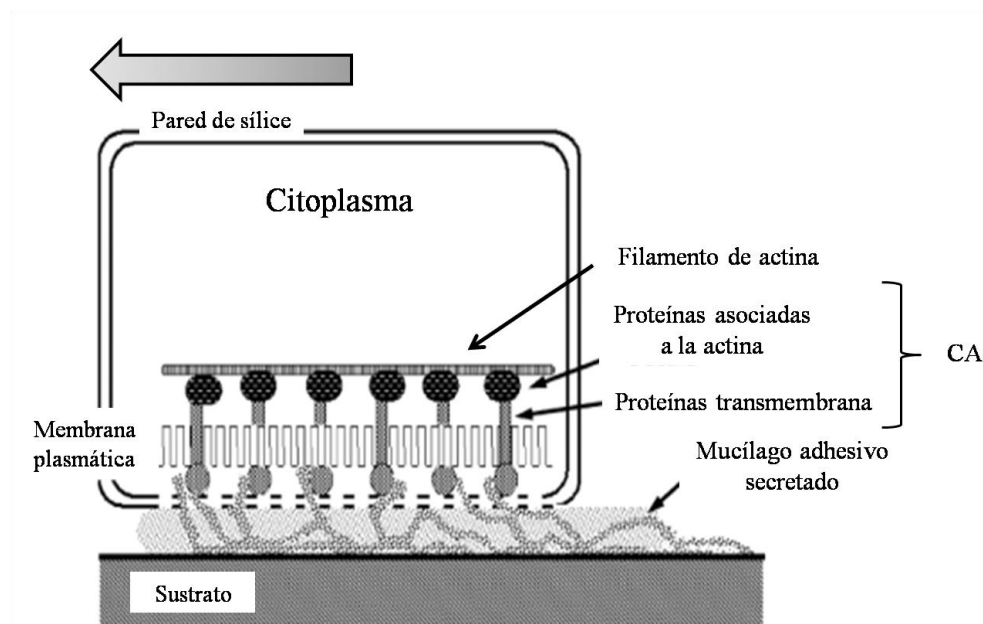


Figura 1.6: Diagrama del complejo de adhesión (CA) en una diatomea con rafe. A medida que la célula avanza conjuntamente con la liberación de mucílago, el CA acompaña el ensamble del citoesqueleto moviéndose hacia el extremo anterior del rafe respecto de la dirección de desplazamiento, indicada por la flecha superior. (Imagen adaptada de Wetherbee *et al.* 1998).

Debido al desplazamiento de las proteínas motoras del citoesqueleto (complejo actina-miosina), el CA atraviesa la membrana plasmática y culmina con la secreción de mucílago que, al adherirse a la superficie, genera la tracción sobre el sustrato. Si la especie posee rafe en ambas valvas, el que se encuentra en contacto con el sustrato es denominado “impulsor” mientras que el opuesto es llamado “no impulsor” (**Figura 1.7**).

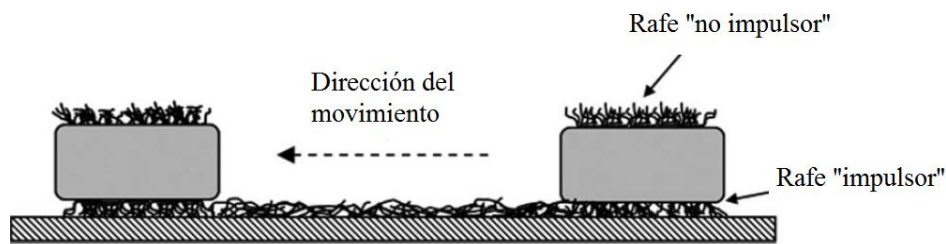


Figura 1.7: Diagrama ejemplificando la expulsión de los filamentos adhesivos mucilaginosos durante el desplazamiento de una diatomea con rafe (Imagen adaptada de Molino & Wetherbee 2008).

En el caso de las especies de los géneros *Amphora* y *Halamphora*, ambos rafe se encuentran en contacto con el sustrato y forman dos huellas mucilaginosas paralelas durante el desplazamiento (**Figura 1.8**).

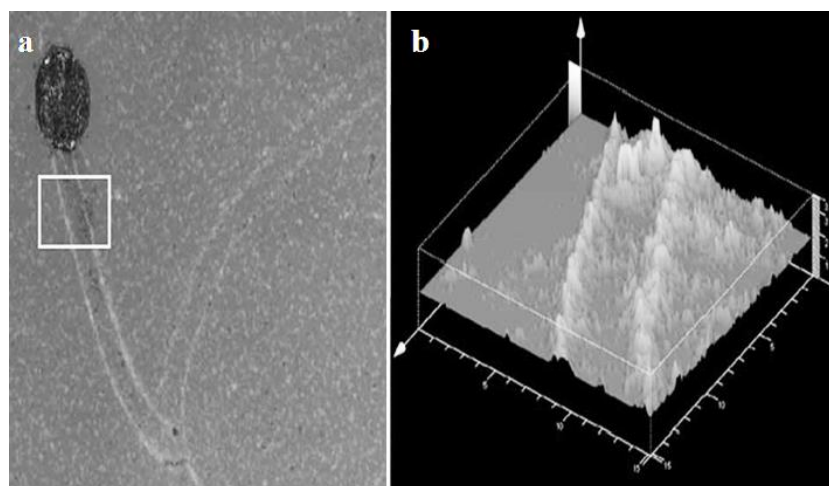


Figura 1.8: Imagen de microscopía confocal del rastro mucilaginoso de *Amphora coffeaeformis* (a) y su ampliación en 3 dimensiones (b). La separación entre ambos rastros es de 5 μm (Molino *et al.* 2006).

La adhesión de las diatomeas a un sustrato puede ser primaria y/o secundaria (Wetherbee *et al.* 1998). La adhesión primaria es un proceso activo inducido por señales químicas o físicas y durante la misma las diatomeas con rafe re-orientan su posición hacia las condiciones ambientales más adecuadas (**Figura 1.9**).

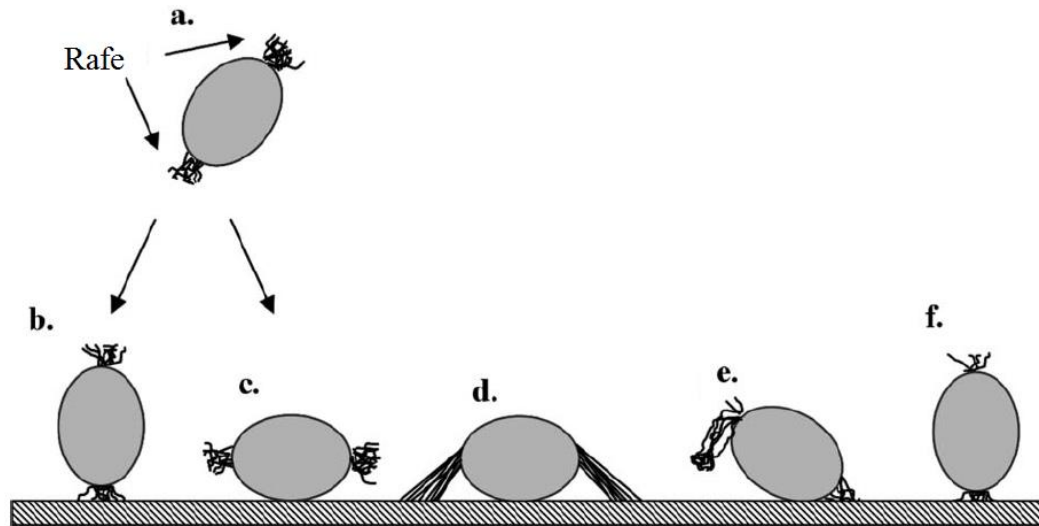


Figura 1.9: Adhesión inicial de una diatomea con rafe en ambas valvas. Una célula suspendida en la columna de agua (**a**) al sedimentar contacta con la superficie a través del rafe (**b**), o del cíngulo (**c**). En este caso, hay secreción de mucílago desde ambos rafe (**d**) y, luego de un movimiento de balanceo, uno de los rafe adopta la función de impulsor (**e**) y comienza el desplazamiento sobre el sustrato (**f**). (Adaptada de Molino & Wetherbee 2008).

Cuando una diatomea con rafe en las valvas opuestas (**Figura 1.9a**) se deposita sobre los sedimentos, puede ocurrir que: **a**) el rafe quede en contacto directo con el sustrato (**Figura 1.9b**) o **b**) el cíngulo se apoye sobre el sustrato (**Figura 1.9c**). En este caso, la interacción del citoesqueleto con el CA permite la reorientación de la célula y asegura la adhesión al sustrato mediante la secreción de mucílago o sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Molino & Wetherbee 2008) desde cada rafe (**Figura 1.9c**). Si ambos rafe contactan simultáneamente la superficie

(**Figura 1.9d**), un movimiento de balanceo de la célula la inclina a favor de una de las valvas, cuyo rafe adopta el papel de “impulsor” (**Figura 1.9e**). Posteriormente, la interacción citoesqueleto–CA actuará como fuerza motriz en el desplazamiento (**Figura 1.9f**) (Crawford *et al.* 2001, Higgins *et al.* 2003). La adhesión primaria es temporal y las células podrán separarse del sustrato una vez seleccionada la dirección de desplazamiento.

La adhesión secundaria ocurre cuando las células se adhieren al sustrato de forma permanente a través de sustancias poliméricas extracelulares como films, tallos o tubos.

1.3. Clasificación de las diatomeas

Las diatomeas comprenden unas 30.000 a 100.000 especies, incluidas dentro de los estramenopiles (también conocidos como heterocontos) del supergrupo SAR (Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria) (Adl *et al.* 2012, Burki 2014).

Si bien se han aplicado diversos sistemas de clasificación basados en aspectos morfológicos, morfométricos, reproductivos o moleculares, aun no se cuenta con una separación en grupos o taxones naturales (Medlin & Kaczmarska 2004).

Tradicionalmente y debido a su practicidad, aunque sin valor taxonómico, se sigue conservando la separación propuesta por Round *et al.* (1990) en dos grandes grupos: céntricas y pennadas. Estos grupos están definidos por la simetría del frústulo, el tipo de reproducción sexual y el número de cloroplastos por célula. Las diatomeas céntricas, de simetría radial, poseen numerosos cloroplastos discoides y su reproducción sexual es por oogamia en especies mayoritariamente homotálicas. En cambio, las especies pennadas, de simetría bilateral, son usualmente elongadas con cloroplastos poco numerosos y de tipo lobulado y su

reproducción sexual es por isogamia o anisogamia fisiológica entre cepas heterotáticas (Chepurnov & Mann 2004).

La búsqueda de líneas monofiléticas por filogenia molecular (Medlin & Kaczmarska 2004, Theriot *et al.* 2010, Medlin 2016, 2017) indica hasta el momento que existirían tres clases: Coscinodiscophyceae (diatomeas céntricas con simetría radial), Mediophyceae (diatomeas céntricas bipolares o multipolares y Thalassiosirales) y Bacillariophyceae (diatomeas pennadas).

1.4. Ciclo de vida de las diatomeas

El ciclo de vida de las diatomeas es monogenético diploide (**Figura 1.10**). Durante la división mitótica, se separan las dos valvas y cada célula hija forma una nueva hipovalva sobre el molde de las valvas de la progenitora que devendrán en las epivalvas de las células hijas (**Figura 1.10**). Como consecuencia, el tamaño celular de la población va decreciendo con las sucesivas divisiones celulares.

Una vez alcanzado un umbral crítico de tamaño, éste se restituye mediante la reproducción sexual (**Figura 1.10**) (Lewis 1984). Se ha demostrado que el “reloj sexual” y la meiosis gametogénica son activados por la reducción de tamaño celular (Drebes 1966, Mann *et al.* 2003).

Luego de la fusión de las gametas, la cigota aumenta de tamaño dentro de una cubierta orgánica, la auxospora.

Un complejo mecanismo de deposición de sílice conjuntamente con el aumento de tamaño de la célula culminan con la ruptura de la cubierta orgánica de la auxospora y la deposición del nuevo frústulo.

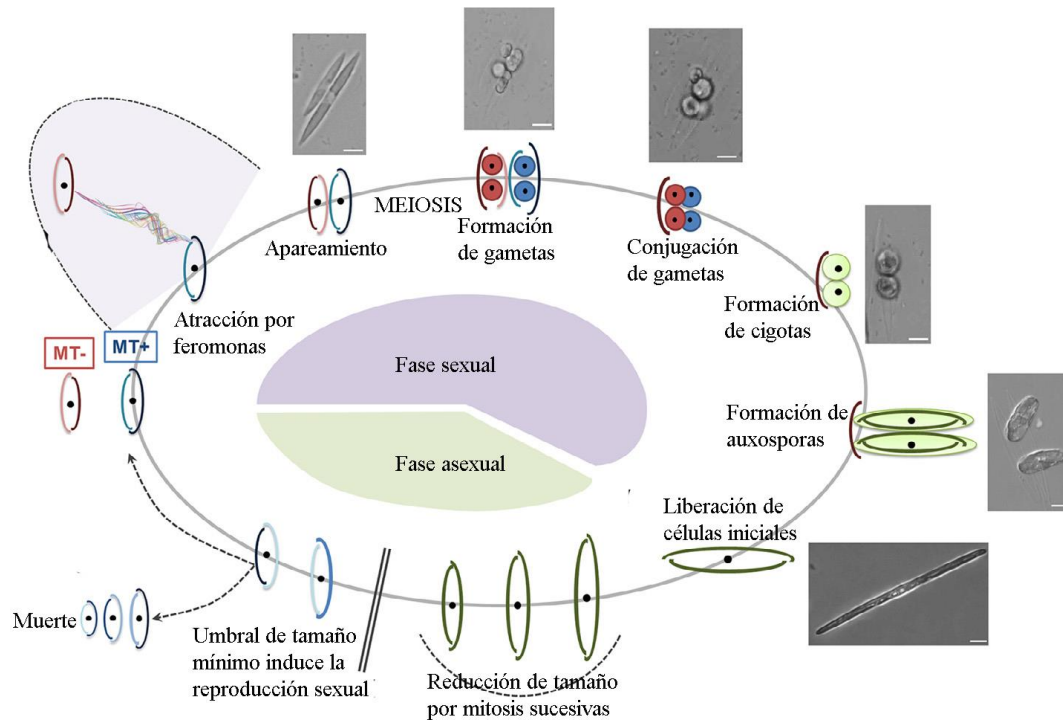


Figura 1.10: Ciclo de vida de la diatomea pennada *Pseudo-nitzschia multistriata*. Las sucesivas divisiones mitóticas en la fase asexual o vegetativa del ciclo conducen a la progresiva reducción del tamaño de los individuos de la población. Superado un umbral de tamaño mínimo, las células pueden continuar dividiéndose hasta la muerte de los individuos resultantes, o bien se induce la reproducción sexual para restaurar el tamaño celular. En las especies heterotálicas, la percepción de compuestos químicos semejantes a las feromonas provoca la atracción entre los individuos M⁺ (receptores) y M⁻ (dadores). Una vez que las células se aparean, ocurre la meiosis y se forman las gametas haploides. La conjugación de las gametas produce en esta especie dos cigotas, que se desarrollan dentro de las auxosporas. Las auxosporas se expanden. Finalmente, las células hijas con el tamaño de frústulo máximo se liberan de la cubierta orgánica (Figura adaptada a partir de Basu *et al.* 2017).

1.5. Sobre el género *Halamphora*

Halamphora fue elevado al rango de género por Levkov (2009) luego de una revisión exhaustiva del género *Amphora sensu lato*. Algunos de los criterios utilizados para diferenciarlo de *Amphora* están detallados en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1: Comparación de algunos caracteres que diferencian a los géneros *Amphora* y *Halamphora*.

<i>Amphora</i>	<i>Halamphora</i>
• Único cloroplasto con 4 lóbulos (tipo 1, Mereschkowsky 1903). • En la valva interna, el rafe presenta helictoglosas centrales reducidas y separadas y distales desviadas hacia la parte dorsal generalmente, y ventral en pocas especies. • El cingulo presenta bandas abiertas, usualmente tres.	• Único cloroplasto en forma de H (tipo 2, Mereschkowsky 1903) (Figura 1.11). • En la valva interna, el rafe presenta helictoglosas centrales fusionadas (<i>sensu</i> Levkov) y distales desviadas hacia la parte dorsal. • El cingulo está compuesto por numerosas bandas abiertas con una o dos filas de poros redondeados o elongados.

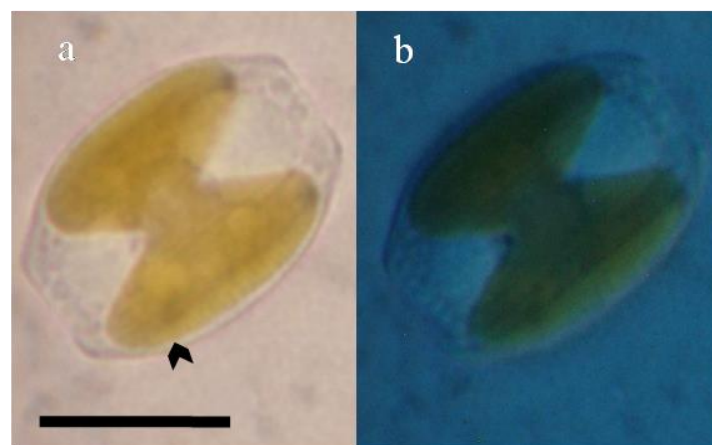


Figura 1.11: Imágenes de microscopio óptico de *Halamphora luciae* (a) sin filtro y (b) con filtro DIC (contraste por interferencia diferencial). Se observa el cloroplasto en forma de H (flecha negra). Escala: 10 μ m.

Los frústulos de *Amphora* y *Halamphora* presentan un cingulo más desarrollado en la **zona dorsal** y más estrecho en la **zona ventral**, de modo tal que las valvas no son paralelas entre sí sino que forman un ángulo.

Los ejemplares del género *Halamphora* presentan células solitarias, con valvas semi-lanceoladas o semi-elípticas con extremos variables. El rafe se encuentra próximo al margen ventral, con los extremos distales y proximales rectos o curvados. El borde rafidiano, cuando presente, está solo sobre el lado dorsal. Las estrías son uni o biseriadas, formadas por areolas redondeadas, elípticas o transversalmente elongadas y ocluidas por un **hímen** (membrana de sílice muy delgada y perforada). Se la encuentra en el epipelon de ambientes de agua dulce, marina y/o salobre. Su distribución es cosmopolita y ha sido citada en un amplio rango geográfico que abarca desde los 50° N hasta los 38° S y los 122° O hasta los 4° E (www.algaebase.org).

1.5.1. Sobre la especie *Halamphora luciae*

Halamphora luciae fue descrita originalmente por Snoeijis & Balashova (1998) a partir de muestras del Mar Báltico. Para la descripción morfológica de *H. luciae* (Cholnoky) Levkov, se aplicó la terminología sugerida en Levkov (2009).

Las valvas de *H. luciae* son semi-lanceoladas con los extremos capitados, levemente inclinados hacia la zona ventral (Levkov 2009). El largo de valva varía entre 17 y 43 µm mientras que el ancho es de 3,5 a 6,5 µm. Al MEB, en vista valvar externa, las valvas muestran simetría dorsiventral con los márgenes dorsales suavemente arqueados y los ventrales rectos. El rafe, levemente curvado, exhibe los extremos proximales expandidos y curvados dorsalmente. Las estrías dorsales uniseriadas están compuestas de areolas redondeadas a levemente

elongadas. En vista valvar interna, presenta una única hilera de areolas cercanas al rafe limitada por una costilla longitudinal. Especie bentónica de hábitats salobres y marinos (www.algaebase.org).

En el presente trabajo se adoptó el esquema de clasificación taxonómica propuesto por Cox (2015).

Ubicación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Supergrupo: SAR

Heterokontobionta (= Stramenopile)

División: Ochrophyta

Phylum: Bacillariophyta

Clase: Bacillariophyceae

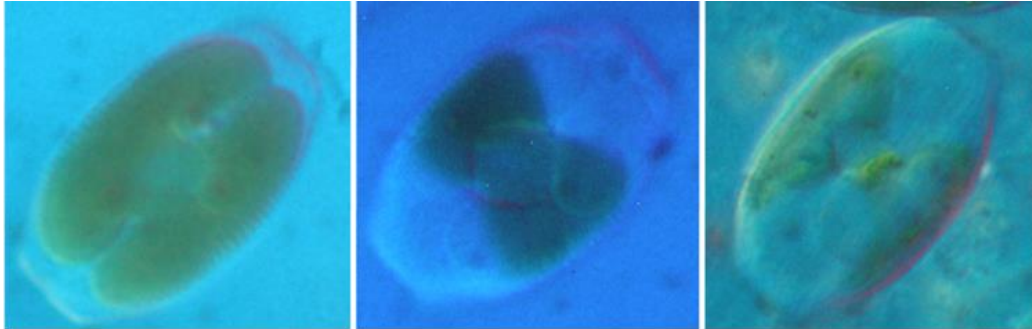
Subclase: Bacillariophycidae

Orden: Thalassiophysales

Familia: Catenulaceae

Género: *Halamphora*

RESULTADOS



Aislamiento y cultivo de *Halamphora luciae*. Efectos de la carencia de fósforo y nitrógeno en experiencias de cultivo *in vitro*.

2.1. Aislamiento de diatomeas bentónicas del estuario de Bahía Blanca.

Identificación taxonómica y selección de la cepa de estudio

En la revisión periódica de los tubos de hemólisis inoculados con material proveniente de los sedimentos del estuario se identificaron las especies representadas en la **Figura 2.1**.

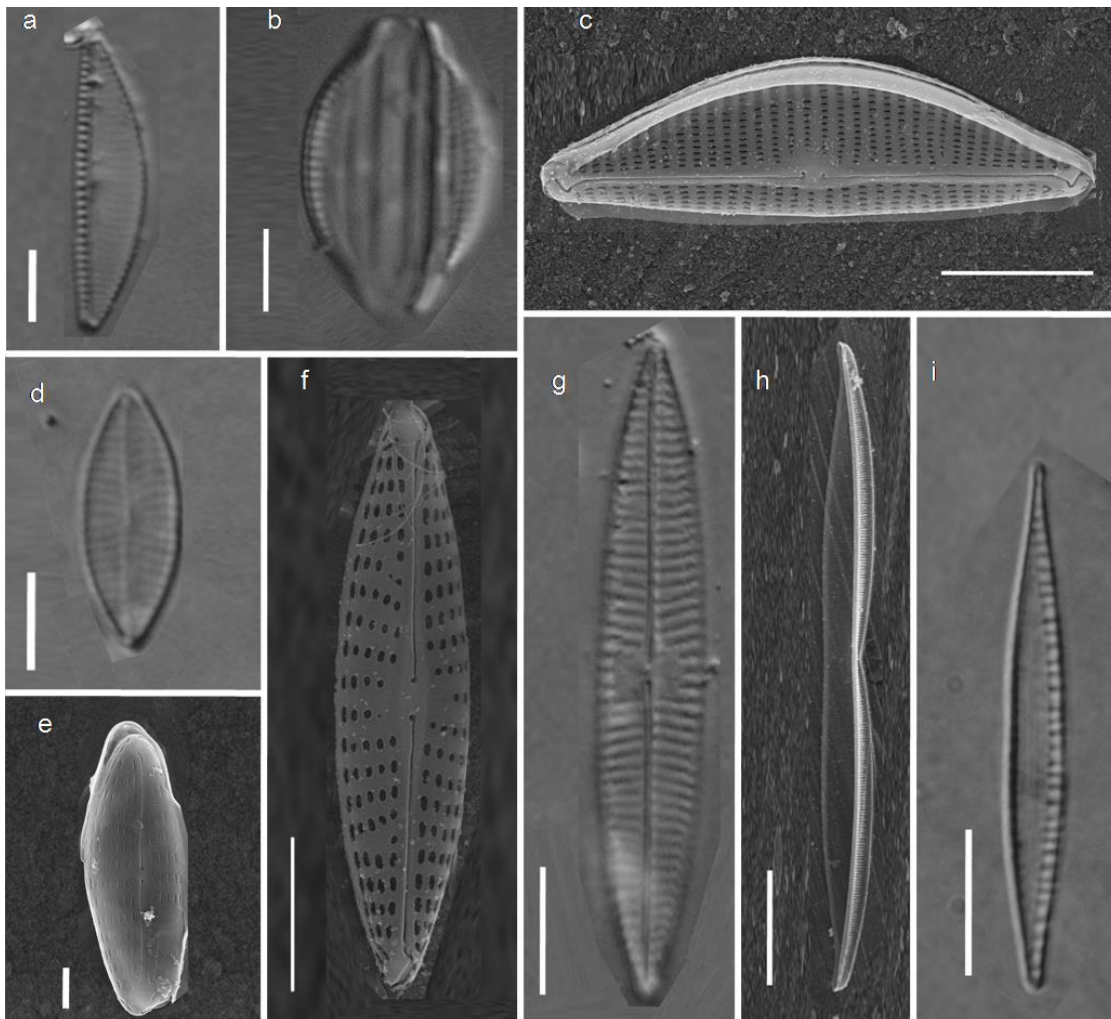


Figura 2.1: Imágenes de microscopía óptica (a, b, d, g, i) y MEB (c, e, f, h) de las valvas de los ejemplares encontrados en los tubos de hemólisis. **a)** *Cymbellonitzschia* sp., **b)** *Halamphora luciae*, **c)** *Cymbella* sp., **d)** *Navicula* aff. *germanopolonica*, **e)** *Navicula salinicola*, **f)** *Navicula* sp. 1, **g)** *Navicula* sp. 2, **h)** *Nitzschia pellucida*, **i)** *Nitzschia* sp. Escala= 1 μ m: **e**; 5 μ m: **a, c, d, f**; 10 μ m: **b, g, h, i**.

Las diatomeas pennadas *Halamphora luciae* y *Nitzschia pellucida* fueron las especies más abundantes (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1: Abundancia relativa de las especies identificadas en los cultivos en los tubos de hemólisis.

	Abundancia relativa ^a
<i>Cymbella</i> sp.	R
<i>Cymbellonitzschia</i> sp.	R
<i>Halamphora luciae</i> (Cholnoky) Levkov	A
<i>Navicula</i> aff. <i>germanopolonica</i> Witkowski & Lange-Bertalot	F
<i>Navicula salinicola</i> Hustedt	R
<i>Navicula</i> sp. 1	R
<i>Navicula</i> sp. 2	R
<i>Nitzschia pellucida</i> Grunow	A
<i>Nitzschia</i> sp.	F

^a La abundancia relativa (%) indica el porcentaje de individuos de cada una de las especies identificadas en relación al total de individuos que componen la muestra.

Abreviaturas: R: rara (<5 %), F: frecuente (5-20 %), A: abundante (> 20 %). Para el cálculo de la abundancia relativa se contabilizaron al menos 400 valvas por preparado y 3 preparados por muestra.

Los criterios para seleccionar la especie de *Halamphora luciae* fueron:

- a) la facilidad de obtener cultivos unialgales axénicos dada su alta abundancia,
- b) la simplicidad de su mantenimiento por repiques sucesivos en el medio *f/2*,
- c) la posibilidad de acortar el tiempo de incubación de los diferentes ensayos en virtud a su alta tasa de crecimiento *in vitro*.

Cabe señalar que se han estado realizando ensayos piloto para la producción de biodiesel con una cepa de *Halamphora coffeaeformis* aislada de la misma localidad (Martín *et al.* 2016). De allí el interés en poner a punto las condiciones de cultivo de otra especie del mismo género a fin de proceder a un futuro escalado de volumen en biorreactores.

2.2. Incidencia de la limitación y la carencia de fósforo y nitrógeno sobre el crecimiento de *Halamphora luciae*

El crecimiento de *H. luciae* en medio *f/2* (control) y en los tratamientos en medio *f/2* con distintas proporciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) (A1-5) en placas de 6 pocillos (**Tabla 2.2**) exhibió una fase logarítmica y una estacionaria (**Figura 2.2**).

Tabla 2.2: Concentración inicial de P y N en el medio control (*f/2*) y los tratamientos A1-5*.

Medio de cultivo	N (μmoles^{-1})	P (μmoles^{-1})
<i>f/2</i>	883	36
A1	883	9
A2	221	36
A3	0	0
A4	0	36
A5	883	0

*Nota: Esta tabla, presentada en **Métodos experimentales** (Tabla 5.2), se reproduce aquí para facilitar la comprensión del texto.

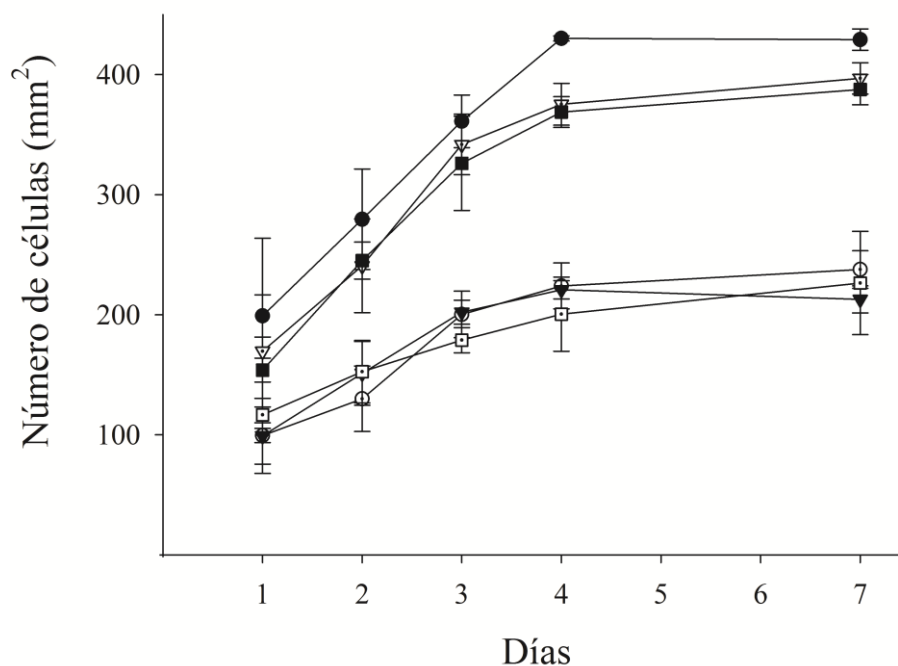


Figura 2.2: Curvas de crecimiento en cajas de 6 pocillos de *H. luciae*, en medio *f/2* (círculo negro) y tratamientos A1 (triángulo blanco), A2 (cuadrado negro), A3 (círculo blanco), A4 (triángulo negro) y A5 (cuadrado blanco) con diferentes relaciones de N:P. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=3$).

La tasa de crecimiento exponencial ($0,29-0,37 \text{ día}^{-1}$) no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre el control *f/2* y los ensayos en los medios limitados en macronutrientes A1, A2 y A3 (**Tabla 2.3**). En A3, la fase exponencial se extendió desde el día 2 al 3 (**Figura 2.2**).

En los ensayos con medios carentes de uno de los nutrientes esenciales (A4 y A5), las tasas de crecimiento exponencial ($0,22-0,26 \text{ día}^{-1}$) difirieron significativamente ($P < 0,05$) del control (**Tabla 2.3**).

Tanto la reducción de la concentración de P o N (A1 y A2) como su ausencia (A4 y A5) restringieron en forma significativa ($P < 0,05$) la capacidad de carga del cultivo (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3: Tasa de crecimiento y número final de células de *H. luciae* en medio control (*f/2*) y tratamientos A1-5 en ensayos en caja de pocillos. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0,05$) en el ANOVA de un factor y prueba de Tukey respecto a *f/2*. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n= 3$).

Medio de cultivo	Densidad celular final ^a (células . mm ²)	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)
<i>f/2</i>	417 $\pm$ 8	0,29 $\pm$ 0,01
A1	385 $\pm$ 8 *	0,37 $\pm$ 0,03
A2	373 $\pm$ 9 *	0,35 $\pm$ 0,02
A3	233 $\pm$ 5 *	0,32 $\pm$ 0,02
A4	224 $\pm$ 14*	0,27 $\pm$ 0,02 *
A5	236 $\pm$ 21 *	0,23 $\pm$ 0,02 *

^a Densidad celular en fase estacionaria temprana (7 días).

Al finalizar la experiencia, las células de los tratamientos A4 (*f/2*-N) y A5 (*f/2*-P) se emplearon en las observaciones de MEB y ESEM.

Los ensayos posteriores se llevaron a cabo únicamente en los medios carenciados A4 y A5.

A fin de contar con mayor cantidad de biomasa, se escaló el volumen a 40 ml de medio de cultivo en cristalizadores de 100 ml.

Se obtuvieron las curvas de crecimiento en el nuevo volumen para las células cultivadas en el medio completo *f/2*, y en los carenciados *f/2*-N y *f/2*-P (**Figura 2.3**).

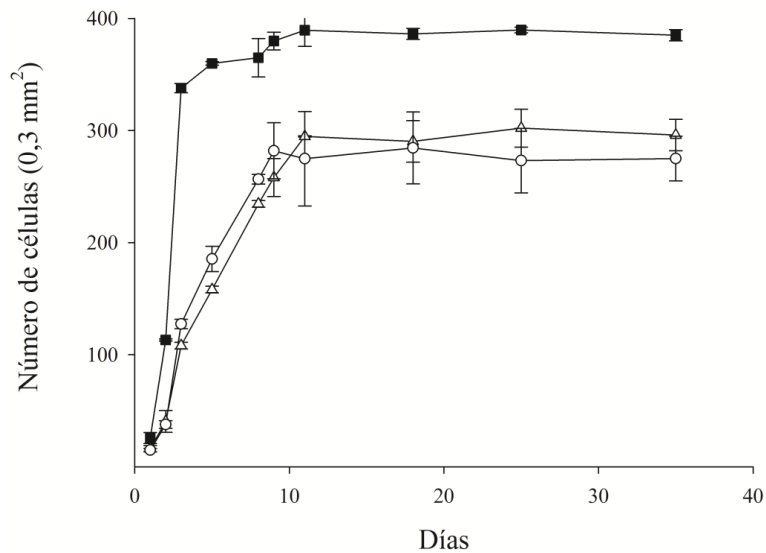


Figura 2.3: Curvas de crecimiento de *H. luciae* en cristalizadores con medio *f/2* (cuadrado negro), *f/2-N* (triángulo blanco) y *f/2-P* (círculo blanco). Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=3$).

La tasa de crecimiento exponencial del medio *f/2* fue significativamente ($P < 0,05$) mayor que la de los tratamientos *f/2-N* y *f/2-P* (**Tabla 2.4**) y, al igual que en el caso de las células crecidas en pocillos, la omisión de N o P redujo el número final de células en forma significativa ($P < 0,05$) (**Tabla 2.4**).

Tabla 2.4: Tasa de crecimiento y número final de células de *H. luciae* en medio *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N* en ensayo en cristalizadores. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0,05$) en el ANOVA de un factor y prueba de Tukey respecto a *f/2*. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=3$).

Medio de cultivo	Densidad celular final ^a (células $\cdot$ 0,3 mm ⁻²)	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)
<i>f/2</i>	389 $\pm$ 2,9	1,19 $\pm$ 0,04
<i>f/2-P</i>	274 $\pm$ 28 *	0,95 $\pm$ 0,09 *
<i>f/2-N</i>	294 $\pm$ 16 *	1,01 $\pm$ 0,03 *

^a Densidad celular en fase estacionaria temprana (12 días).

2.3. Morfología de *H. luciae*

2.3.1. Morfometría de vacuolas lipídicas y cuantificación colorimétrica de lípidos totales

Las células incubadas en medios *f/2*-P y *f/2*-N exhibieron acumulación de cuerpos lipídicos luego de 15 días del cultivo (**Figura 2.4**).

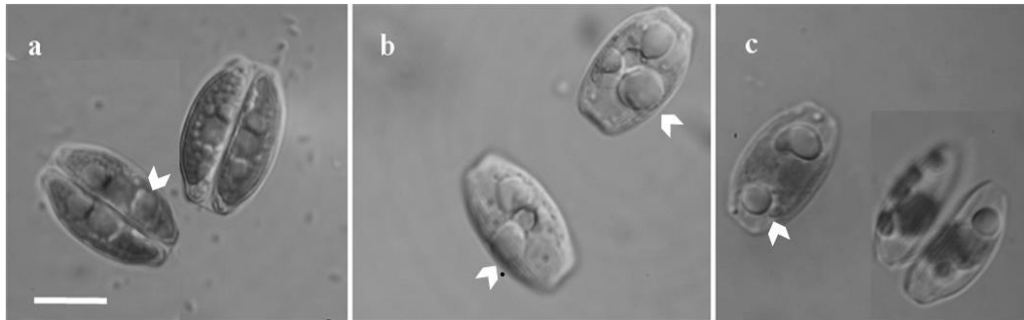


Figura 2.4: Imágenes de microscopia de contraste de fase de células de *H. luciae* cultivada en medio **a)** *f/2*, **b)** *f/2*-P y **c)** *f/2*-N. Las flechas blancas señalan las vacuolas lipídicas. Nótese el aumento de tamaño de los cuerpos lipídicos de las células en los medios carenciados respecto del control. Escala= 10 μm .

El diámetro de los cuerpos lipídicos fue medido tanto en el control como en los tratamientos y se los aproximó a una forma esférica para la estimación de su volumen (**Tabla 2.5**).

Tabla 2.5: Volumen de las vacuolas lipídicas de células de *H. luciae* cultivadas en medio *f/2*, *f/2*-P y *f/2*-N. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0,05$) en el ANOVA de un factor y prueba de Tukey respecto a *f/2*. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n= 70$).

Medio de cultivo	Volumen de las vacuolas (μm^3)
<i>f/2</i>	$6,9 \pm 4,1$
<i>f/2</i> -P	$21,2 \pm 6,2$ *
<i>f/2</i> -N	$29,2 \pm 6,1$ *

La cuantificación colorimétrica de lípidos (véase **Métodos experimentales, ítem 5.7.3**) se realizó por el método de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV) (Anschau *et al.* 2017). Las curvas de calibración se realizaron utilizando tres estándares con diferente porcentaje de ácidos grasos saturados (aceite de coco, de oliva, y una mezcla 1:1 de ambos) (**Figura 2.5**).

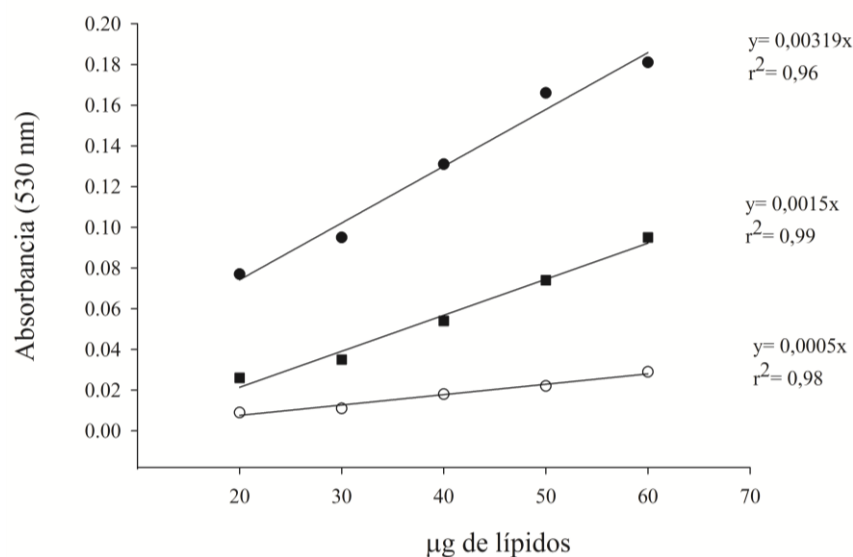


Figura 2.5: Curva de calibración de la reacción colorimétrica de la SPV utilizando tres aceites estándares diferentes: de oliva (círculo negro), de coco (círculo blanco) y una mezcla 1:1 de ambos (cuadrado negro). Los valores de las pendientes de las rectas y los r^2 están indicados en el gráfico.

Conforme aumentó el grado de saturación del aceite utilizado como patrón se observó una disminución en el valor de la pendiente.

Como curva estándar de referencia para la cuantificación de lípidos en las muestras se eligió la correspondiente a la mezcla de aceites (**Figura 2.5**), dado que una mezcla de aceites saturados e insaturados es más representativa de la composición de lípidos informada para diferentes especies de diatomeas (véase por ejemplo, Martín *et al.* 2016).

Los resultados de la cuantificación de los lípidos totales de *H. luciae* cultivada durante 10 y 20 días en el medio completo y en los carenciados *f/2-N* y *f/2-P* se representan en la **Figura 2.6**.

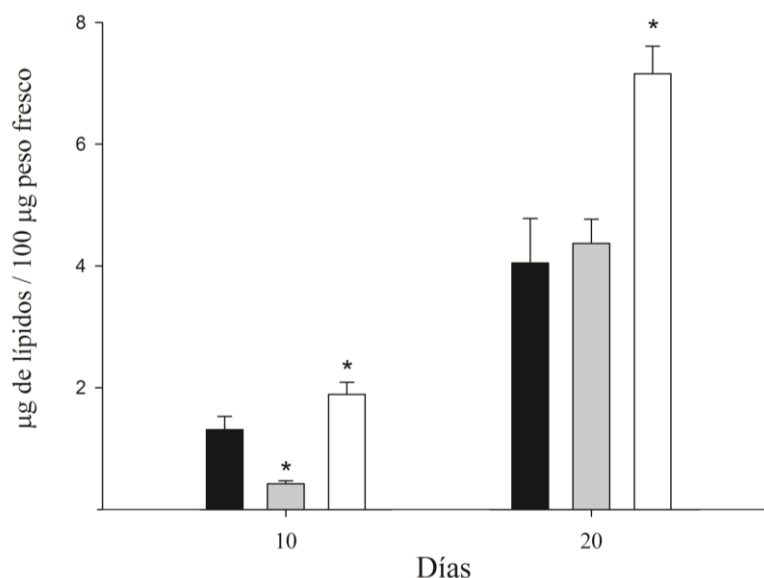


Figura 2.6: Lípidos totales a los 10 y 20 días de iniciados los cultivos de *H. luciae* en medio *f/2* (barras negras), *f/2-P* (barras grises) y *f/2-N* (barras blancas). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto del control para cada día.

Los cambios significativos en el contenido de lípidos totales respecto del control se registraron desde la fase estacionaria temprana (10 días) hasta la tardía (20 días). En esa última etapa, se midió el mayor contenido de lípidos bajo carencia de N (aproximadamente 7 µg de lípidos/ 100 µg peso fresco), mientras que la acumulación de lípidos fue semejante tanto bajo carencia de P como en los cultivos envejecidos en *f/2* (**Figura 2.6**).

2.3.2. Determinación de la composición de pigmentos fotosintéticos

Las células incubadas en medio *f/2-N* presentaron decoloración y una reducción considerable del tamaño del cloroplasto, luego de 10 días del cultivo

(Figura 2.7). La reducción del tamaño del cloroplasto se acentuó en los medios carenciados, especialmente en *f/2-N*.

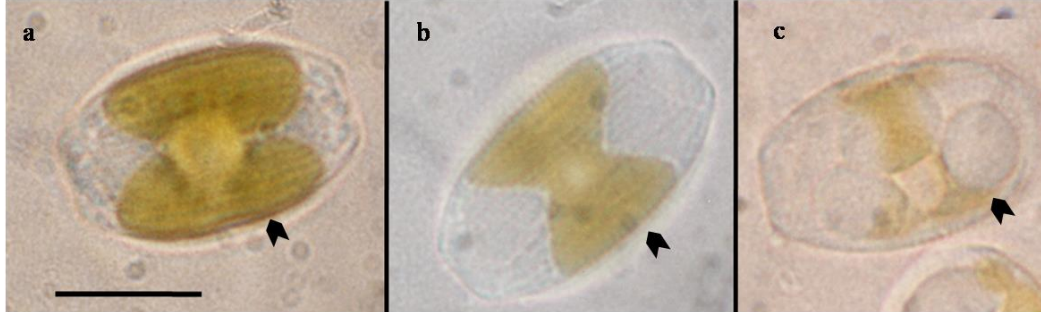


Figura 2.7: Imágenes de microscopia óptica de células de *Halamphora luciae* cultivada en medio **a)** *f/2*, **b)** *f/2-P* y **c)** *f/2-N*, y cosechadas a los 10 días. Las flechas negras indican los cloroplastos. Escala=10 μm .

En el medio *f/2-N* se registró una reducción significativa ($P < 0,05$) en el contenido de clorofila total ($\text{Chl}_{\text{total}}$) y fucoxantina (Fx) (expresados en función del peso fresco) respecto del control (**Tabla 2.6**). Por otro lado la relación $\text{Fx}/\text{Chl}_{\text{total}}$ no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el control y los tratamientos (**Tabla 2.6**).

Tabla 2.6: Contenido de $\text{Chl}_{\text{total}}$ y Fx (expresadas como $\mu\text{g mg}^{-1}$ de peso fresco) y la relación $\text{Fx}/\text{Chl}_{\text{total}}$, para los cultivos control (*f/2*), *f/2-N* y *f/2-P*. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto a *f/2* ($P < 0,05$). Los valores están expresados como las medias $\pm$ DS ($n=3$).

	$\text{Chl}_{\text{total}}$	Fx	$\text{Fx}/\text{Chl}_{\text{total}}$
<i>f/2</i>	$2,65 \pm 0,36$	$1,64 \pm 0,22$	$0,63 \pm 0,09$
<i>f/2-P</i>	$2,35 \pm 0,30$	$1,63 \pm 0,18$	$0,71 \pm 0,09$
<i>f/2-N</i>	$0,19 \pm 0,06^*$	$0,08 \pm 0,02^*$	$0,53 \pm 0,11$

2.3.3. Morfología y morfometría de los frústulos

Independientemente del medio de cultivo utilizado, las células de *H. luciae*, presentaron valvas semi-lanceoladas con extremos capitados y márgenes rectos, levemente curvados hacia la parte ventral.

El largo de la valva osciló entre 15 y 40 μm , mientras que el ancho fue de 3,5 a 5,5 μm (**Figura 2.8**).

Las células de mayor tamaño exhibieron valvas con extremos capitados, mientras que las más pequeñas tenían bordes redondeados (**Figura 2.8**).

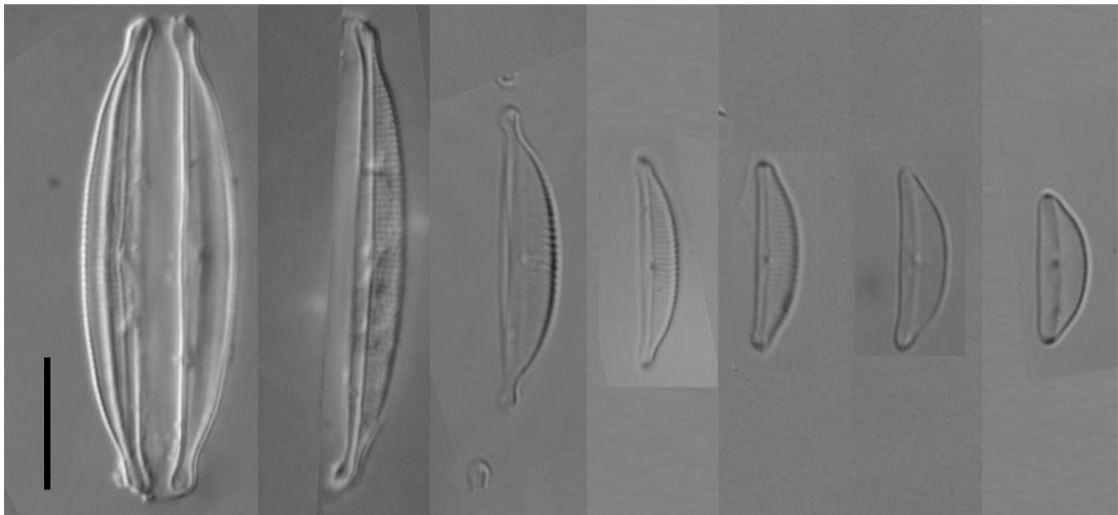


Figura 2.8: Imágenes de microscopía óptica de *H. luciae* en medio *f/2*. Escala= 10 μm .

En vista valvar externa, las estrías dorsales (20-22 en 10 μm) se orientaban en forma radial en la cercanía de los extremos y de modo paralelo en la zona central de la valva (**Figura 2.9 a-d**).

En la vista valvar interna, la fila de areolas cercana al rafe yacía separada del resto por una costilla longitudinal (**Figura 2.9e**).

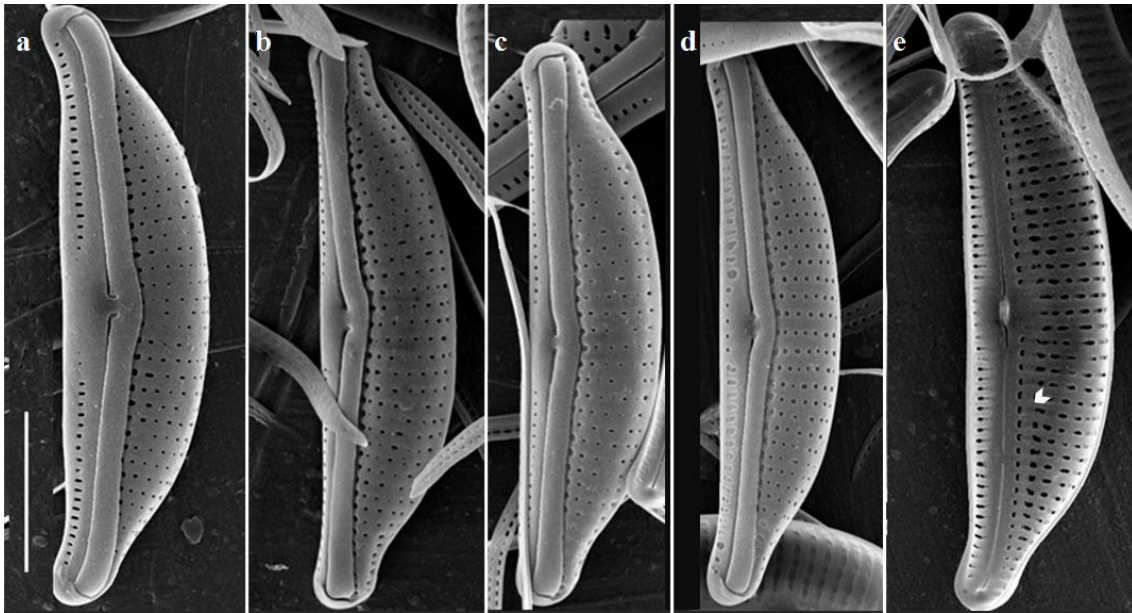


Figura 2.9: Imágenes de MEB de las valvas de *H. luciae* en medio *f/2*, en vista externa (**a-d**) e interna (**e**), donde se observa la costilla interna cercana a la zona del rafe (punta de flecha blanca). Escala= 10 μ m.

El número de areolas en las estrías dorsales fue casi siempre constante (**Tabla 2.7**), tanto para las células control como para los tratamientos en los medios *f/2-N* (**Figura 2.10**) y *f/2-P* (**Figura 2.11**).

Tabla 2.7: Largo de las areolas y número de areolas en 10 μ m de valvas de *H. luciae* en *f/2* (control), *f/2-N* y *f/2-P*. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a *f/2* están representadas por un asterisco. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n= 100$).

Medio de cultivo	Largo de areolas (μ m)	Número de areolas en 10 μ m
<i>f/2</i>	0,11 $\pm$ 0,005	37,6 $\pm$ 5,1
<i>f/2-P</i>	0,05 $\pm$ 0,004*	39,1 $\pm$ 6,1
<i>f/2-N</i>	0,08 $\pm$ 0,006*	38,3 $\pm$ 7,1

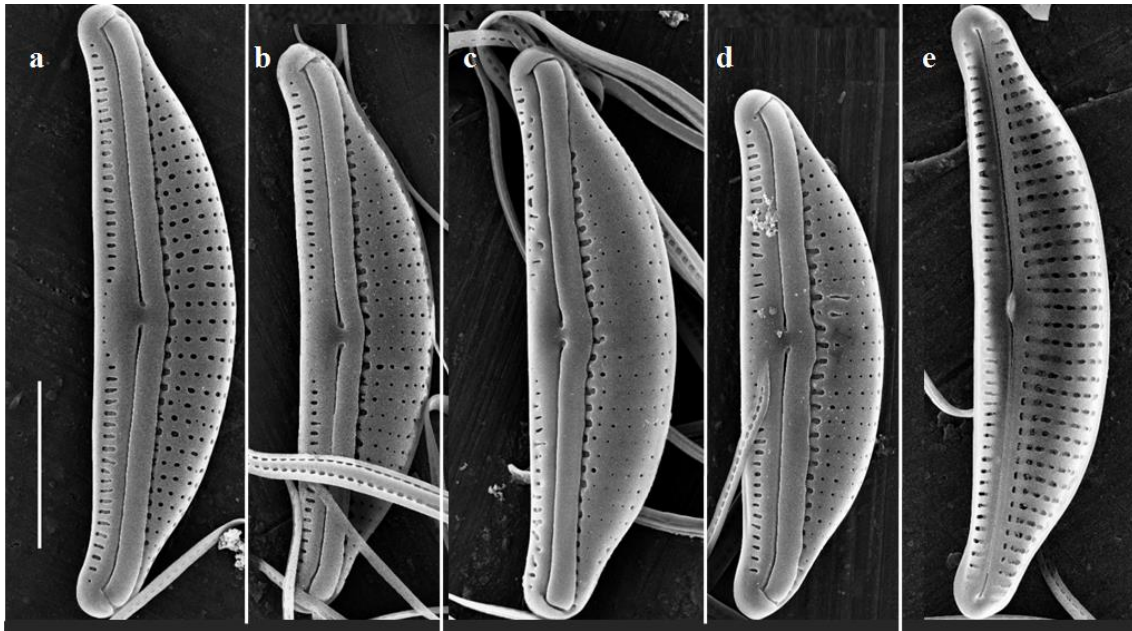


Figura 2.10 Imágenes de MEB de células de *H. luciae* en el medio f/2-N. Escala= 5 μ m.

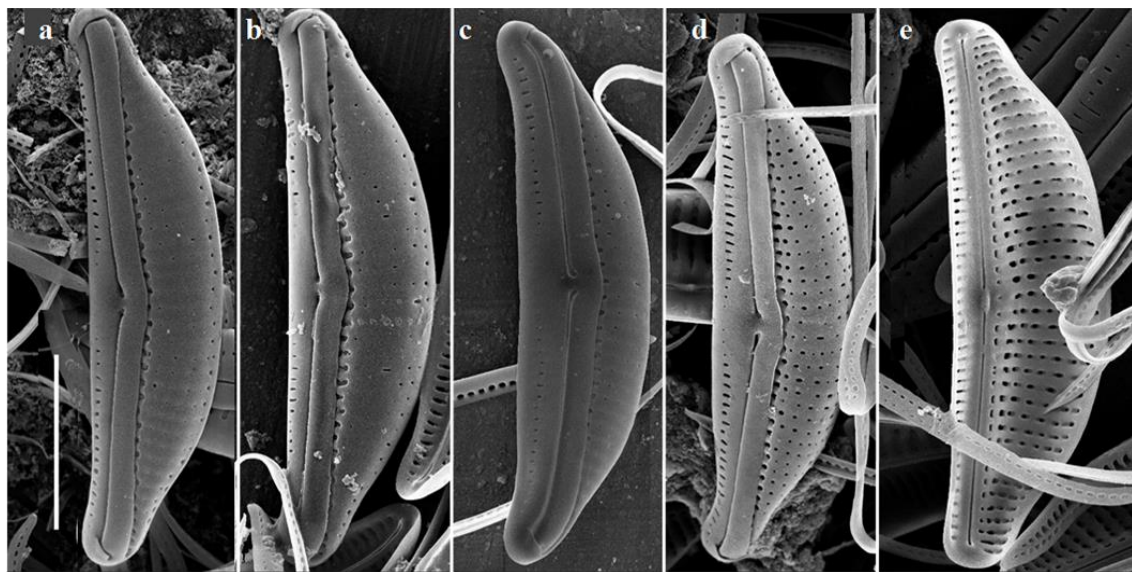


Figura 2.11: Imágenes de MEB de células de *H. luciae* en el medio f/2-P. Escala= 5 μ m.

Sólo en muy pocos casos se observó una reducción en la densidad de areolas (**Figura 2.11b**). Las areolas dorsales estaban ocluidas por hímenes (**Figura 2.12**).

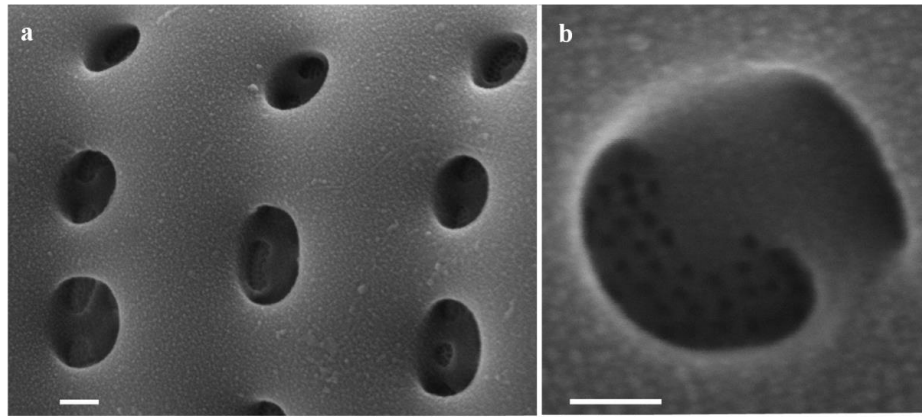


Figura 2.12: Vista externa de las areolas dorsales de *H. luciae* cultivada en medio *f/2* (a) areolas ocluidas por hímenes, (b) detalle del himen. Escala= 100 nm (a), 50 nm (b).

Las areolas de las valvas del medio completo eran redondeadas o transapicalmente elongadas (25-27 en 10 μm) y tenían una longitud entre 0,1 y 0,13 μm . En cambio, en las células de los cultivos *f/2-N* y *f/2-P*, la longitud de las areolas fue significativamente menor, llegando a observarse areolas puntiformes de 0,03 a 0,05 μm de diámetro (Tabla 2.7 y Figuras 2.13 y 2.14).

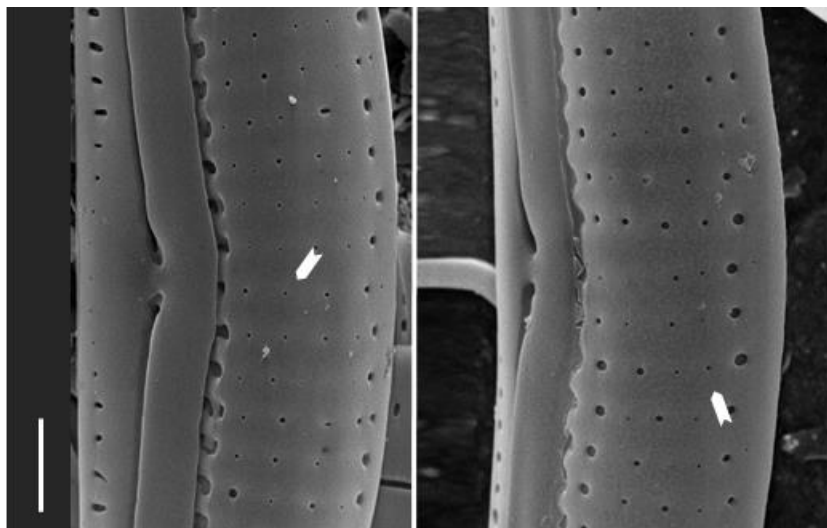


Figura 2.13: Imágenes de MEB de células de *H. luciae* cultivada en el medio *f/2-P*. Escala= 1 μm . La flecha indica areolas puntiformes.

En el medio *f/2-N*, se detectaron alteraciones en el patrón de areolas de las estrías dorsales (**Figura 2.14**), tales como dos areolas puntiformes en lugar de una alargada en sentido transapical (**Figura 2.14 a-b**) o la existencia de areolas fusionadas (**Figura 2.14c**).

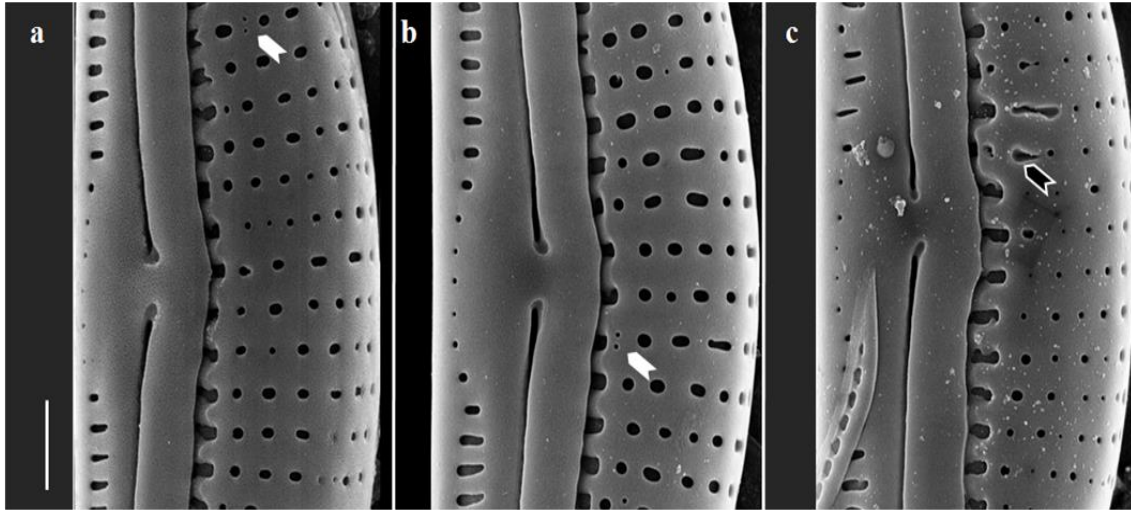


Figura 2.14: Imágenes de MEB de células de *H. luciae* cultivada en el medio *f/2-N*. Se observan valvas con areolas modificadas. En **a)** y **b)** la flecha blanca indica que hay dos areolas en lugar de una. En **c)** se observa una valva con areolas fusionadas (flecha negra). Escala= 1 μ m.

2.3.3.1. Biovolumen y área celular

El biovolumen y el área calculados para las células de *H. luciae* disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) respecto del control únicamente en las células cultivadas en medio *f/2-N* (**Tabla 2.8**); en dichas células aumentó significativamente ($P < 0,05$) la relación área/volumen.

Tabla 2.8: Morfometría en células de *H. luciae* en *f/2* (control), *f/2-N* y *f/2-P*. Diferencias significativa ($P < 0,05$) respecto a *f/2* representadas por un asterisco. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n= 100$).

Medio de cultivo	Área (μm^2)	Biovolumen(μm^3)	Área/volumen
<i>f/2</i>	$350,9 \pm 2,1$	$359,8 \pm 6,1$	$0,98 \pm 0,01$
<i>f/2-P</i>	$349,2 \pm 2,8$	$367,8 \pm 7,6$	$0,97 \pm 0,01$
<i>f/2-N</i>	$329,3 \pm 1,7^*$	$324,2 \pm 5,4^*$	$1,03 \pm 0,01^*$

2.4. Movilidad de las células de *Halamphora luciae*

2.4.1. Tipos de desplazamiento

La trayectoria más frecuente fue recta. En algunos casos se evidenció una rotación de las células sobre el eje de desplazamiento, generando un recorrido semejante al de un sacacorchos (**Figura 2.15a**). En esas ocasiones, las células exhibían un movimiento vibratorio a medida que avanzaban. Cuando algún tipo de obstáculo (por ejemplo, otra célula) impedía el avance, el movimiento se detenía y las algas permanecían en el mismo lugar o bien cambiaban la dirección. El cambio de trayectoria sobrevenía manteniendo uno de los extremos adherido al sustrato al mismo tiempo que un movimiento pivotante del extremo libre opuesto cambiaba la dirección (**Figura 2.15b**). Este patrón de deslizamiento fue idéntico en todas las condiciones de cultivo estudiadas.

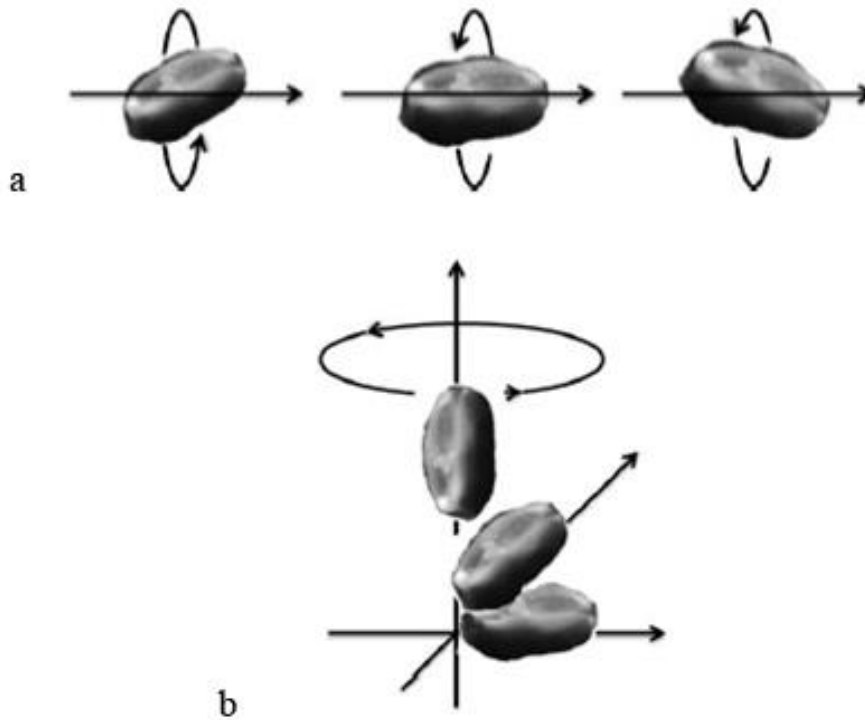


Figura 2.15: Patrones de movimiento observados en *H. luciae*. **a)** Recorrido tipo sacacorchos donde la célula gira alrededor de un eje. (La flecha horizontal indica la dirección de desplazamiento). **b)** Movimiento pivotante, donde un extremo de la célula se mantiene fijo al sustrato y el otro se mueve siguiendo una trayectoria circular; como consecuencia, el eje de desplazamiento puede adoptar diferentes direcciones en el plano.

Las células de *H. luciae* poseen un rafe en cada valva ubicado más próximo a la zona ventral (**Figura 2.16**).

El cingulo dorsal tiene una mayor cantidad de bandas que el ventral (**Figura 2.16**), por lo tanto cuando la diatomea se desplaza sobre una superficie, la parte más ancha del cingulo queda hacia arriba en dirección al observador mientras que la parte más angosta queda en contacto con el sustrato.

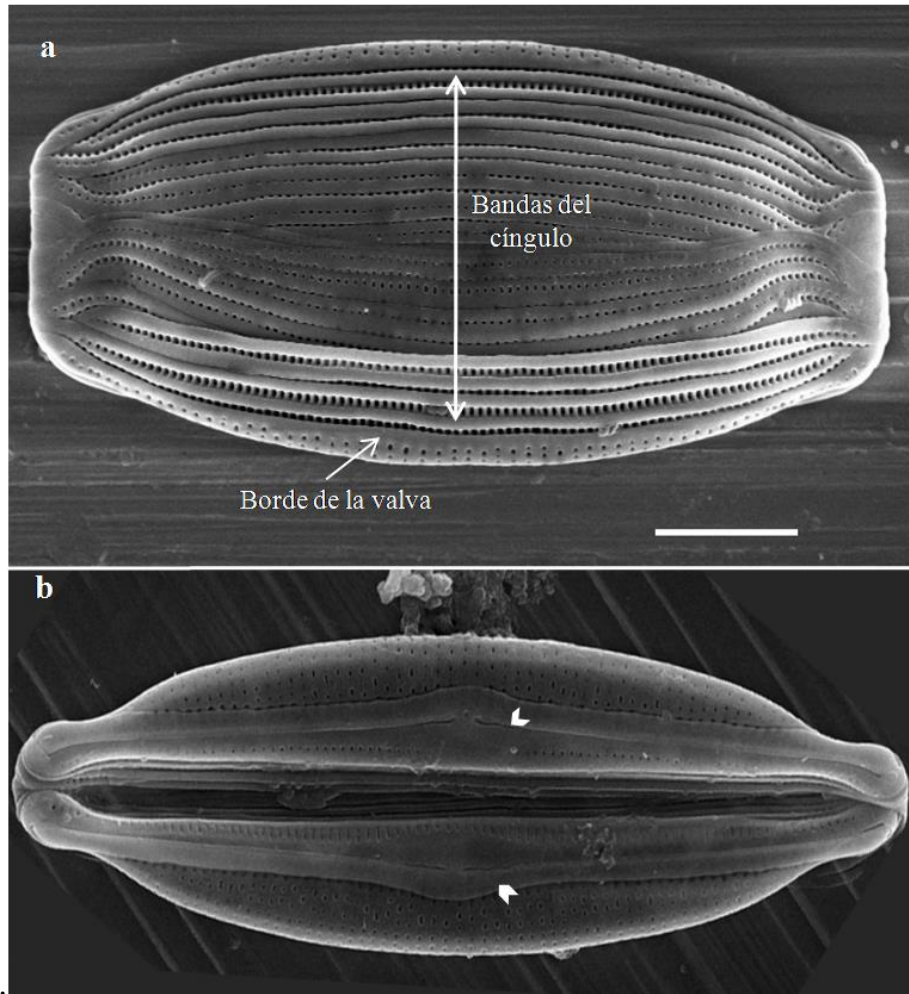


Figura 2.16: Imagen de MEB de *H. luciae* de **a)** la zona dorsal, revelando las bandas del cingulo y **b)** de la zona ventral, donde se observan las valvas cada una con su rafe (flecha). Escala= 5 μ m.

2.4.2. Velocidad de desplazamiento

Exceptuando las células crecidas en el medio $f/2$ -P, las diatomeas cultivadas en los medios $f/2$ y $f/2$ -N exhibieron una disminución significativa ($P < 0,05$) de la velocidad de desplazamiento luego de los 13 días de iniciada la experiencia (**Figura 2.17**). La menor velocidad promedio fue registrada en las células provenientes del medio $f/2$ -N durante todo el ensayo (**Figura 2.17**).

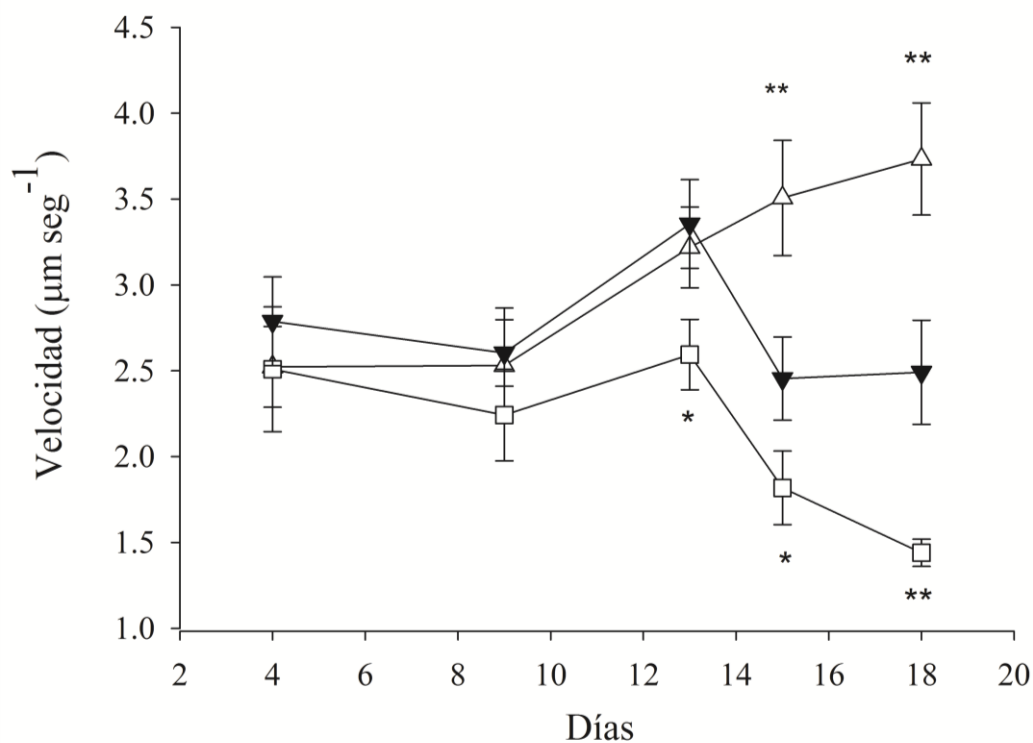


Figura 2.17: Velocidad de desplazamiento de *H. luciae* cultivada en medio *f/2* (triángulos negros), *f/2-N* (cuadrados blancos) y *f/2-P* (triángulos blancos). Los asteriscos indican diferencias significativas (un asterisco, $P < 0,05$ y dos asteriscos, $P < 0,01$) respecto del control para cada día. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=20$).

Dado que en todas las condiciones de cultivo se registraron células móviles e inmóviles, se comparó el porcentaje de células en movimiento en áreas de $0,2 \text{ mm}^2$ seleccionadas al azar (**Figura 2.18**).

El menor porcentaje de células en movimiento se registró en el cultivo *f/2-N*, mientras que el mayor porcentaje significativo ($P < 0,05$) lo exhibieron las células cultivadas en el medio *f/2-P* hasta el día 13.

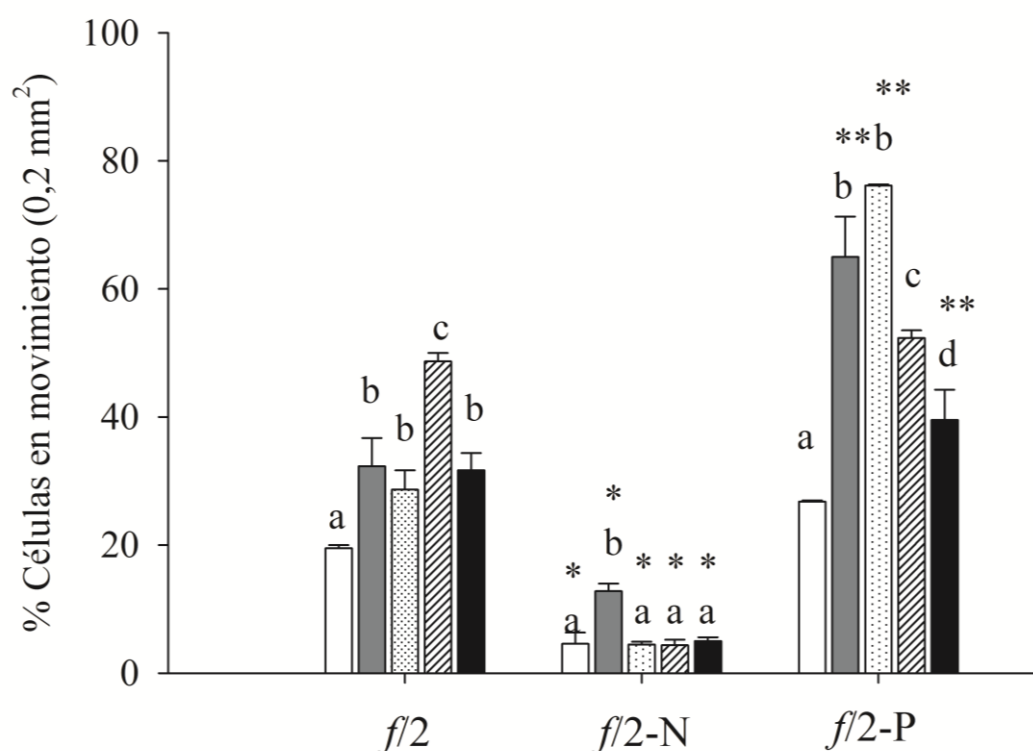


Figura 2.18: Porcentaje de células en movimiento cultivadas en el medio *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P* luego de 4 (barras blancas), 9 (barras grises), 13 (barras punteadas), 15 (barras rayadas) y 20 (barras negras) días de crecimiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) dentro de cada tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas (un asterisco, $P < 0,05$ y dos asteriscos, $P < 0,01$) respecto *f/2*. Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=20$).

2.4.3. Producción de s-EPS

Al tiempo que se obtenía la curva de crecimiento en cristalizadores (**Figura 2.2**), se cuantificó el contenido de hidratos de carbono totales de las s-EPS (véase **Métodos experimentales, ítem 5.11**) en medios *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N* en distintas fases de desarrollo del cultivo (**Figura 2.19**).

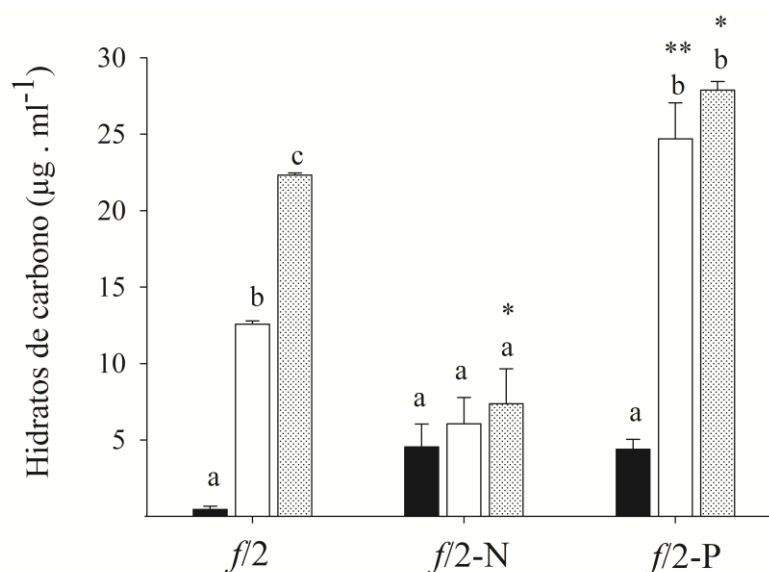


Figura 2.19: Liberación de s-EPS de *H. luciae* crecida en medio *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P*. Las mediciones se realizaron en cultivos en el **día 5**, fase exponencial (barras negras), **día 15**, estacionaria temprana (barras blancas) y **día 25**, estacionaria tardía (barras punteadas). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre fases de crecimiento dentro del mismo tratamiento. Los asteriscos indican diferencias respecto a *f/2* (un asterisco, $P < 0,05$ y dos asteriscos, $P < 0,01$). Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n= 3$).

En general, la secreción de las s-EPS tendió a aumentar en la fase estacionaria (**Figura 2.19**). Bajo carencia de P se observó la mayor producción de s-EPS en las fases estacionaria temprana y tardía (**Figura 2.19**). Por otro lado, la producción de las s-EPS fue significativamente menor en la fase estacionaria de los cultivos *f/2-N* respecto del control (**Figura 2.19**).

2.4.4. Tinción del mucílago extracelular con azul de toluidina

La aplicación de azul de toluidina reveló una abundante liberación de mucílago extracelular en las células cultivadas en el medio control (**Figura 2.20a**) y en *f/2-P* (**Figura 2.20c**). Por el contrario, la secreción fue escasa luego de 10 días de incubación en carencia de N (**Figura 2.20b**).

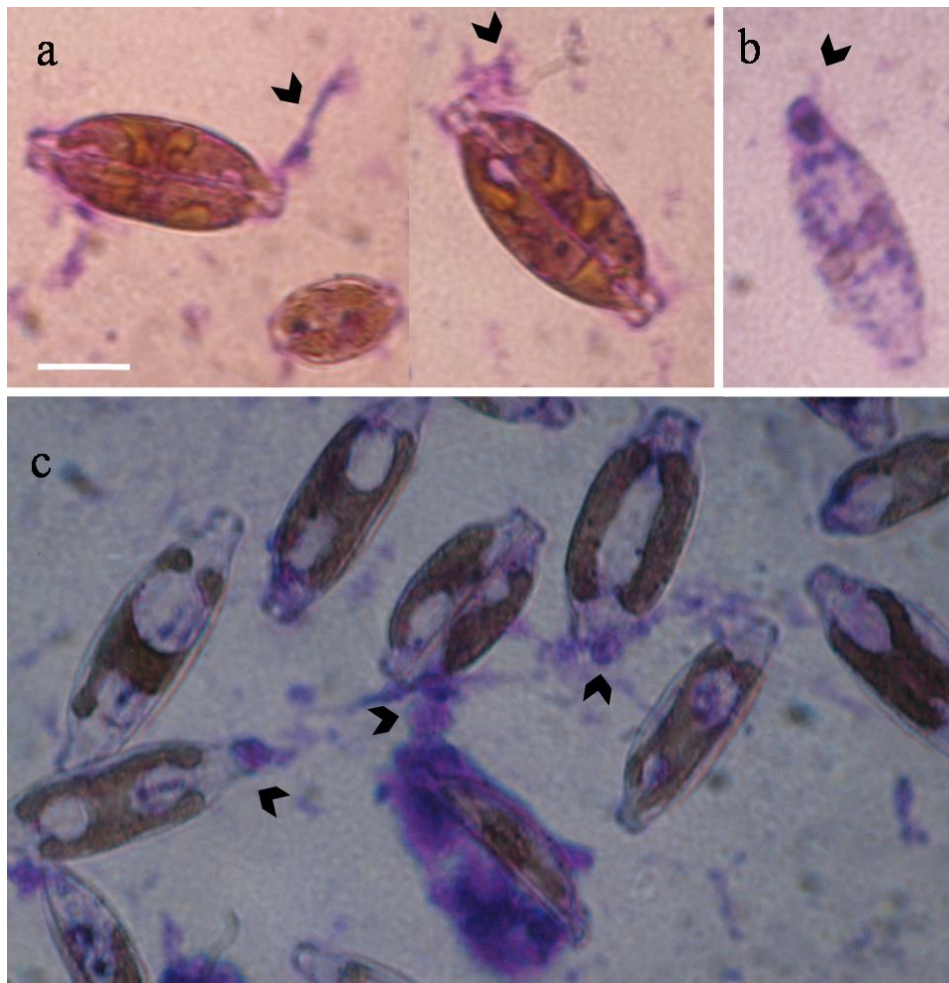


Figura 2.20: Tinción de mucílago extracelular de células de *H. luciae* cultivadas durante 10 días en los medios, **a)** *f/2*, **b)** *f/2-N* y **c)** *f/2-P*. Las flechas negras señalan la huella mucilaginosa. Escala= 10 μm .

2.4.5. Observación de la secreción de mucílago *in vivo* por ESEM

El proceso de deshidratación de las muestras requerido para las observaciones al MEB puede alterar la morfología de los mucílagos extracelulares dada su naturaleza altamente hidrofílica. A fin de minimizar dichas alteraciones se procedió a su observación mediante ESEM (**Figura 2.21**).

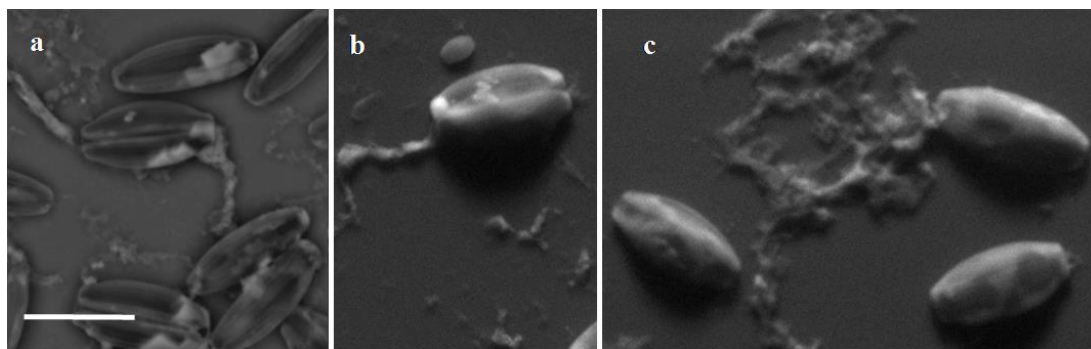


Figura 2.21: Imágenes de ESEM de células de *H. luciae* cultivada en los medios **a) f/2, b) f/2-N y c) f/2-P**. Escala= 20 μm .

Las imágenes de ESEM indicaron abundante secreción de mucílago a través del rafe de células a medida que se deslizaban sobre el sustrato. El cingulo dorsal, más ancho, aparecía orientado hacia la cara superior (**Figura 2.21b**). La acumulación de mucílago en el rafe y en los extremos de las células fue denotada por las áreas refringentes sobre los frústulos (**Figura 2.21a**). Los rastros o huellas de mucílago terminaban en el extremo distal más alejado de las células en una suerte de red de material mucilaginoso (**Figura 2.21c**) o formando cordones retorcidos (**Figura 2.21a**). También se observaron huellas de mucílago remanentes en el sustrato luego del alejamiento de las células. La secreción de mucílago fue menos copiosa en las células provenientes de f/2-N (**Figura 2.21 b**).

2.5. Actividad fosfatasa alcalina

2.5.1. Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina con el sustrato organofosforado *p*-nitrofenilfosfato (pNPP)

En general, la carencia de P en el medio de cultivo indujo la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) (**Figura 2.22**).

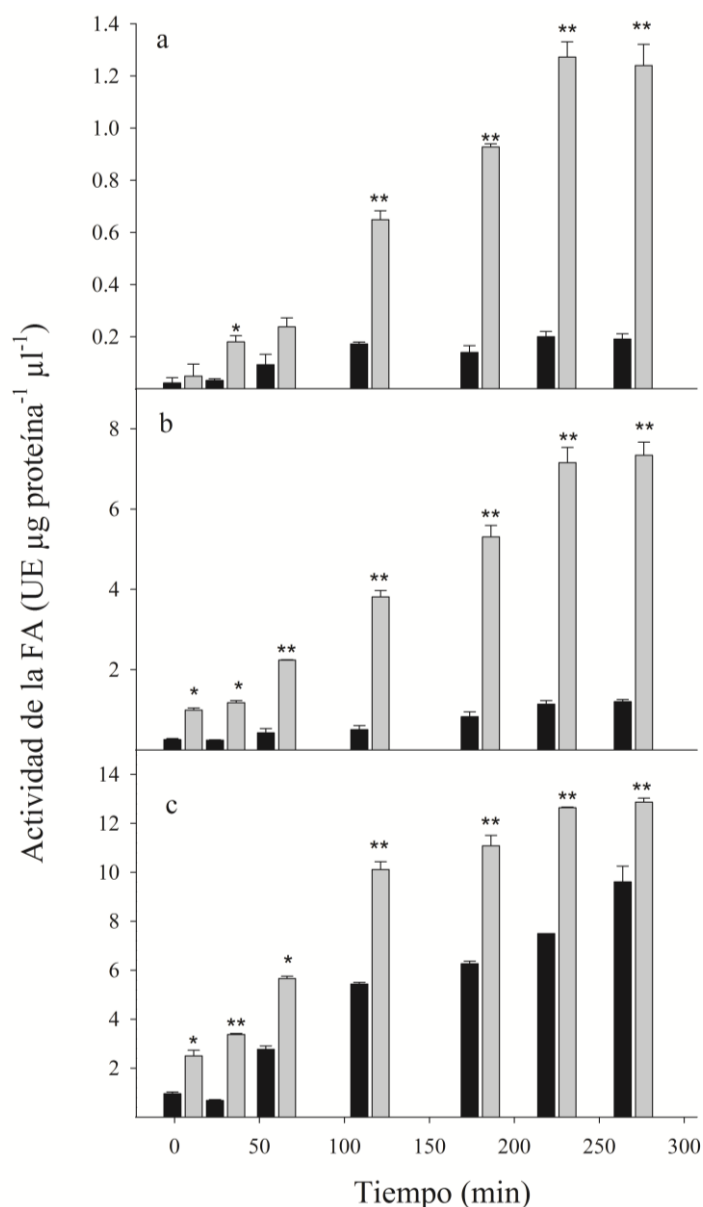


Figura 2.22: Actividad fosfatasa alcalina ($\mu\text{moles de producto } \mu\text{g}^{-1} \text{ proteína } \mu\text{l}^{-1}$) durante la incubación con *pNPP* en células de *H. luciae* cultivadas previamente en medio completo (barras negras) y medio carente de fósforo (barras grises) y cosechadas a los **a)** 5, **b)** 10 y **c)** 20 días. Los asteriscos indican diferencias respecto a *f/2* (un asterisco, $P < 0,05$ y dos asteriscos, $P < 0,01$). Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=3$).

Esta inducción fue menos evidente después de 5 días de carencia (**Figura 2.22a**) pero fue mucho más acentuada cuando la pre-incubación en ausencia de P se extendió durante 10 o 20 días (**Figura 2.22b-c**).

Cabe destacar que se observaron síntomas de deficiencia de P en los cultivos mantenidos en medio *f/2* durante 20 días, como lo indicó la detección de la actividad fosfatasa desde el comienzo de la incubación con el sustrato orgánico *pNPP* (**Figura 2.23**).

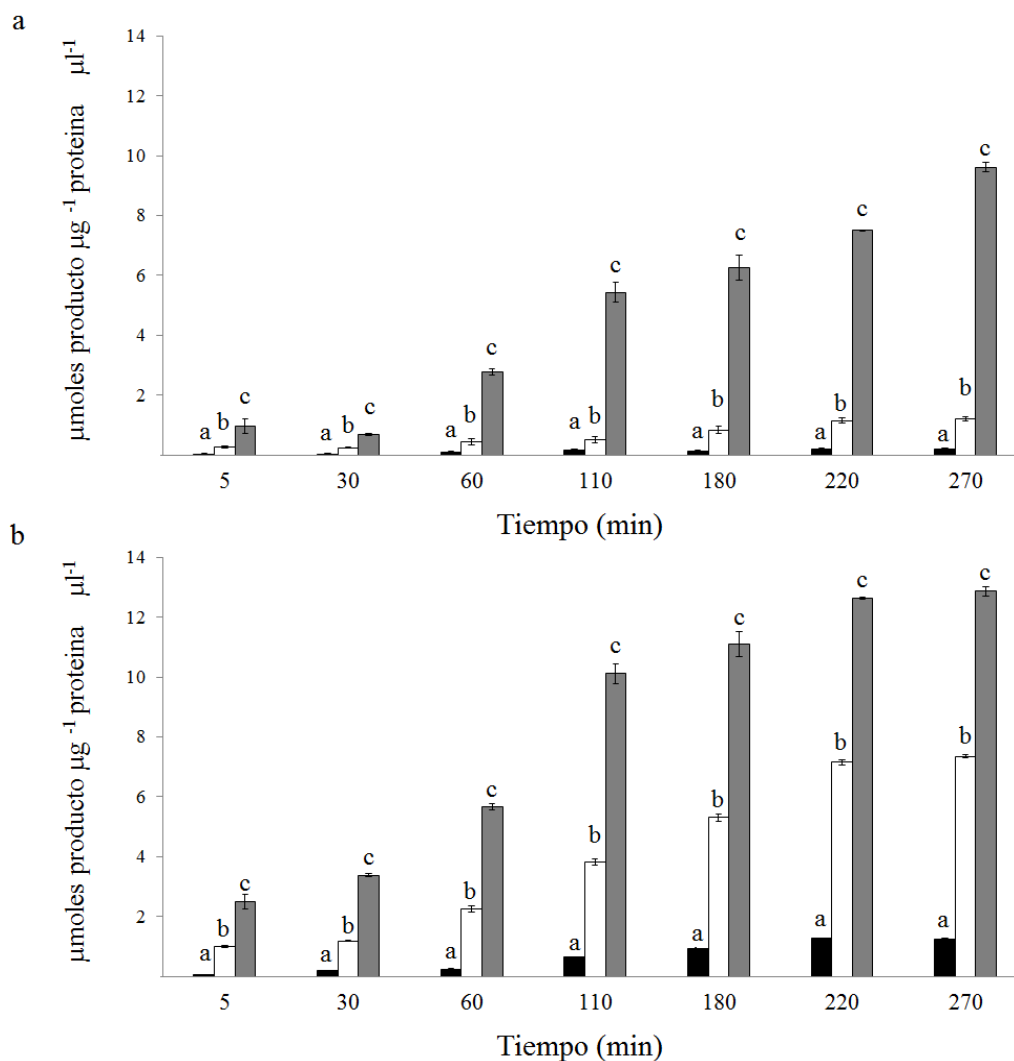


Figura 2.23: Efecto del envejecimiento del cultivo en la actividad de la fosfatasa alcalina (µmoles de producto µg⁻¹ proteína µl⁻¹) de células de *H. luciae* cultivadas previamente en **a)** medio completo y **b)** medio carente de fósforo, durante 5 (barras negras), 10 (barras blancas) y 20 días (barras grises). Letras distintas indican diferencias de la actividad entre cada tiempo del ensayo. Los valores corresponden a la media ± DS (*n* = 3).

Tal como se ve en la **Figura 2.23**, el envejecimiento celular indujo la actividad fosfatasa alcalina tanto en el medio completo como en el medio carenciado desde el inicio del ensayo (5 min) hasta su finalización a los 270 min. Nótese que las diferencias de la actividad fosfatasa se acentúan luego de 10 días de pre-hambreado.

2.5.2. Zimografía

En los zimogramas (véase **Métodos experimentales, ítem 5.15**) de los extractos de células luego de 10 días de cultivo en medio *f/2* y *f/2-P* la actividad fosfatasa alcalina apareció asociada a la banda de 61,2 kDa aproximadamente (**Figura 2.24**).

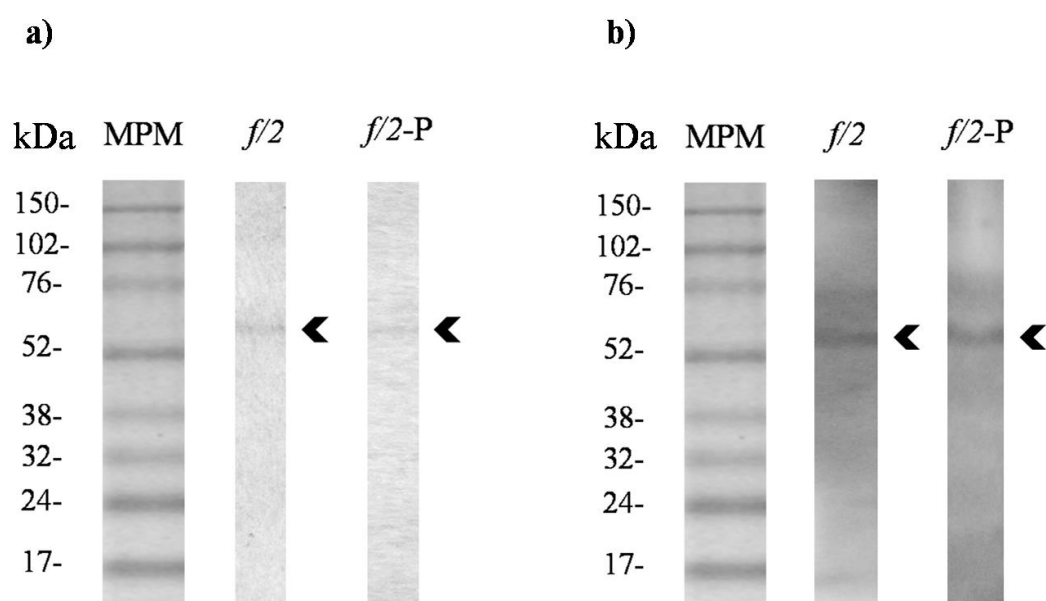


Figura 2.24: Zimograma (SDS-PAGE 10 %) de la enzima fosfatasa alcalina de *H. luciae* cultivada durante 10 días en medio *f/2* y *f/2-P*. **a)** Revelado de la actividad con NBT-BCIP, **b)** Tinción del gel con nitrato de plata. Los marcadores de peso molecular (MPM) se muestran en la primera calle. La flecha indica la banda de aproximadamente 61,2 kDa asociada con la actividad fosfatasa alcalina.

2.6. Actividad proteasa

2.6.1. Cuantificación de la actividad proteasa con azocaseína

La actividad proteasa difirió según la extensión del período de pre-hambre en medio *f*/2-N (**Figura 2.25**).

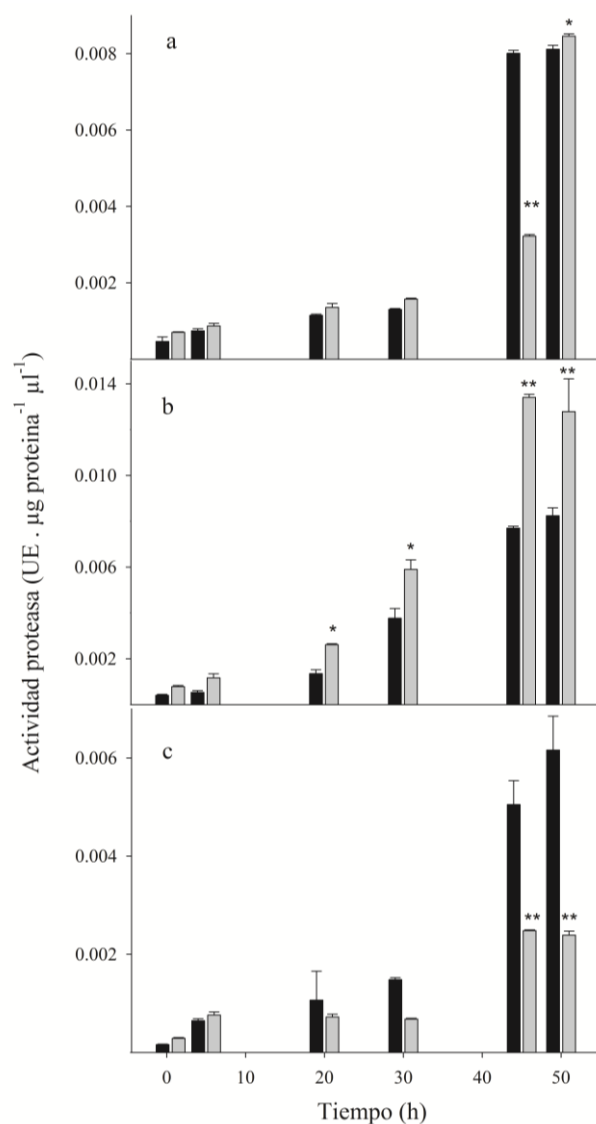


Figura 2.25: Actividad proteasa (10^6 μ moles de producto μ g⁻¹ de proteína μ l⁻¹) en el tiempo en células de *H. luciae* cultivadas en medio *f*/2 (barras negras) y *f*/2-N (barras grises) y cosechadas a los **a)** 5, **b)** 10 y **c)** 20 días. Los asteriscos indican diferencias respecto a *f*/2 (un asterisco, $P < 0,05$ y dos asteriscos, $P < 0,01$). Los valores corresponden a la media $\pm$ DS ($n=3$).

Luego de 10 días de hambreado, las células cultivadas en medio *f*/2-N mostraron una actividad proteasa significativamente mayor ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) al control transcurridas 20 h de incubación en presencia de azocaseína (**Figura 2.25b**). Cuando las células fueron sometidas a una pre-incubación más corta en ausencia de N, el incremento significativo ($P < 0,05$) en la actividad enzimática del tratamiento se manifestó luego de las 50 h de incubación con la azoproteína (**Figura 2.25a**). Sin embargo, si el periodo de pre-hambreado se prolongaba 20 días, las células del tratamiento *f*/2-N exhibían una actividad significativamente ($P < 0,01$) menor al control luego de 40 h de incubación (**Figura 2.25c**).

2.6.2. Zimografía

En los zimogramas de los extractos de células luego de 10 días de cultivo en medio *f*/2 y *f*/2-N, la actividad proteasa apareció asociada a dos bandas de aproximadamente 72,2 kDa y 174,7 kDa (**Figura 2.26**).

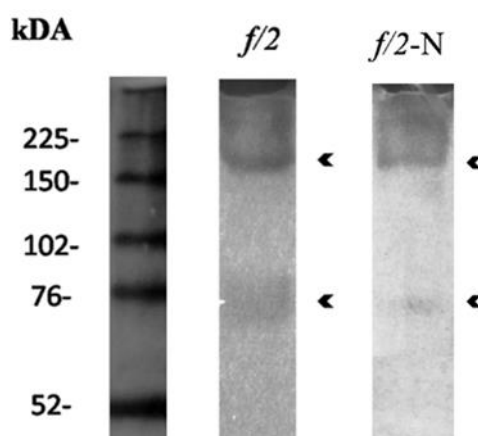


Figura 2.26: Zimograma (SDS-PAGE 10 % co-polimerizado con gelatina) de las enzimas proteasas de *H. luciae* cultivada en medio *f*/2 y *f*/2-N. Los marcadores de peso molecular (MPM) se muestran en la primera calle. Las flechas indican las bandas asociadas con la actividad proteasa. El gel fue revelado con azul de Coomasie.

DISCUSIÓN

2.7. Variables físico-químicas y aislamiento de diatomeas bentónicas del estuario de Bahía Blanca

Los valores de temperatura (12 °C) y salinidad (33 psu) al momento del muestreo fueron acordes a los rangos anuales usuales (Carbone *et al.* 2016, Guinder *et al.* 2017). El estuario posee una elevada salinidad (33-40 psu) y se encuentra en una región de clima templado y semiárido, con veranos lluviosos e inviernos secos. Comprende una superficie de 3000 km² y está formado por numerosos canales, planicies de marea, cangrejales, marismas e islas. Durante la bajamar quedan expuestas planicies de marea con sedimentos predominantemente de tipo limo-arcillosos y excepcionalmente limo arenosos (Gelos & Spagnuolo 1982).

Puerto Cuatrerros se encuentra en la zona interna del estuario, donde el canal tiene una profundidad de 5 metros. El agua con pH 8,10, contiene una elevada carga de materia orgánica e inorgánica en suspensión (Carbone *et al.* 2016) al recibir aportes de urbanizaciones, actividad agropecuaria e industrias lindantes. Además de materia orgánica, se han detectado metales pesados, hidrocarburos aromáticos y pesticidas organoclorados (La Colla *et al.* 2015, Negrin *et al.* 2016).

En relevamientos anteriores para Puerto Cuatrerros (Parodi & Barría de Cao 2003), las especies *Nitzschia* sp., *Surirella gema*, *Cocconeis* sp. se mencionan como las más abundantes en los sedimentos superficiales. Distintas especies de los géneros *Nitzschia* y *Navicula* aparecen frecuentemente en muestras de sedimentos estuariales (Underwood 1994). Scholz & Liebezeit (2012) aislaron 25 especies de un estuario del Mar del Norte, donde las pertenecientes a los géneros *Nitzschia*, *Navicula*, *Amphora* y *Achnanthes* presentaron la mayor tasa de crecimiento en cultivos en condiciones de laboratorio.

En el presente trabajo, las especies con mayor abundancia relativa en los tubos de aislamiento fueron *Halamphora luciae* y *Nitzschia pellucida*, ambas frecuentemente citadas para ambientes de aguas salobres (Krammer & Lange-Bertalot 1988, Levkov 2009). Debe tenerse en cuenta que su mayor abundancia relativa *in vitro* no refleja necesariamente la de la comunidad bentónica natural sino que indica el buen ajuste de estas especies a las condiciones de aislamiento y cultivo empleadas.

2.8. Incidencia del medio de cultivo sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos

Las tasas de crecimiento de *H. luciae* en el medio *f/2* se encuentran dentro del rango informado para *Halamphora coffeaeformis* (Martín *et al.* 2016) y para otras especies bentónicas aisladas del estuario de Bahía Blanca (Popovich *et al.* 2012) también cultivadas en el mismo medio. Scholz & Liebezeit (2012) informaron tasas entre 0,4 y 0,7 días⁻¹ en los aislamientos de varias especies del género *Amphora* (*A. angusta*, *A. arenaria*, *A. graeffii* y *A. exigua*) del Mar del Norte.

La incidencia de la limitación de nutrientes en la tasa de crecimiento depende de la especie. En las condiciones del bioensayo empleadas, la limitación de macronutrientes no afectó la tasa de crecimiento en *H. luciae*, a diferencia de lo informado para otras especies como *Coscinodiscus wailesii* y *Cylindrotheca fusiformis* (Magaletti *et al.* 2004, Armbretch *et al.* 2014), o de los resultados de un monitoreo de trece especies de cepas provenientes de colecciones de cultivo (Bromke *et al.* 2015).

La falta de alteración en la tasa de crecimiento en estos casos puede atribuirse a la absorción suntuaria de nutrientes (*luxury nutrient uptake*) (Eixler *et al.* 2006,

Diaz *et al.* 2008, Powell *et al.* 2009). Perry (1976) demostró que *Thalassiosira pseudonana* puede acumular entre 19 y 43 % de P en la forma de polifosfatos. Análogamente, Lomas & Glibert (2000) constataron la acumulación de nitrato intracelular en *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira weissflogii*. Contrariamente a estas observaciones, existen comunicaciones sobre la reducción de la tasa de crecimiento en condiciones de limitación de N en *Chaetoceros affinis* (Myklestad & Haug 1972) y *Cylindrotheca closterium* (Alcoverro *et al.* 2000, Staats *et al.* 2000), mientras que la escasez de P afectó negativamente el crecimiento exponencial de las diatomeas *Achnanthes brevipes*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylon tricornutum* (Guerrini *et al.* 2000, Magaletti *et al.* 2004, Urbani *et al.* 2005, Abdullahi *et al.* 2006).

En el caso de los cultivos de *H. luciae* en medios carenciados, la disminución del número final de células y de la tasa de crecimiento coincide con lo publicado para *Cylindrotheca closterium* y *Chaetoceros muelleri* (Staats *et al.* 2000, Leonardos & Geider 2004).

Adicionalmente, la relación fucoxantina / clorofila total se mantuvo estable en todas las condiciones de cultivo empleadas, aun cuando en los cultivos carentes de N disminuyó la cuantificación de ambos pigmentos. Una posible explicación es que la biosíntesis de ambos pigmentos ocurre en forma coordinada (Geider *et al.* 1993, Alipanah *et al.* 2015). Contrariamente, en *T. weissflogii*, el cociente fucoxantina / clorofila disminuyó bajo carencia de P (Liu *et al.* 2011), lo que sugiere que la regulación del ensamblado de los complejos antena en respuesta al estrés nutricional exhibe variabilidad interespecífica (Geider *et al.* 1993).

Debe tenerse en cuenta la enorme plasticidad metabólica de las diatomeas puede involucrar la activación de vías de reciclado de macromoléculas ricas en P o N bajo condiciones de deficiencia o limitación de dichos macronutrientes. Martin *et al.* (2011) informaron que bajo carencia de P predomina la ruptura masiva de fosfolípidos de las membranas plastidiales sobre la movilización de los polifosfatos almacenados. Dicho mecanismo suministra P suficiente para sustentar varios ciclos de divisiones celulares. Este reciclado de fosfolípidos en pos de la economía de P intracelular incluye su sustitución por sulfolípidos y lípidos de betaína (Van Mooy *et al.* 2009, Dyhrman *et al.* 2012, Abida *et al.* 2015).

Análogamente, la deficiencia de N en *Phaeodactylum tricornutum*, desencadena la canibalización de las proteínas del cloroplasto, promoviendo por un lado la asimilación de N proveniente de la desaminación proteica vía el ciclo de la urea y, por otro, la activación de las vías anapleróticas como la síntesis de TAGs y de generación de energía como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Yang *et al.* 2013, 2014a, Alipanah *et al.* 2015, Levitan *et al.* 2015). Como consecuencia, las diatomeas pueden acumular hasta 60 % de su peso seco en forma de TAGs y ácidos grasos, preferentemente saturados y monoinsaturados bajo carencia de N (Pulz & Gross 2004) o de N y Si (Thajuddin *et al.* 2015) en la denominada “fase lipogénica” (Hu *et al.* 2008; Levitan *et al.* 2015).

Los distintos perfiles de composición de lípidos de diatomeas exhiben un porcentaje considerable (20-30 %) de ácidos grasos saturados, principalmente ácidos mirístico (14:0) y palmítico (16:0) (Dunstan *et al.* 1994, Barnech Bielsa *et al.* 2016, Martín *et al.* 2016). Tanto el rendimiento como los perfiles de ácidos grasos han sido objeto de atención en la evaluación de las diatomeas como

materia prima para la obtención de biocombustible de alta calidad (Barnech Bielsa *et al.* 2016, Martín *et al.* 2016).

En *H. luciae* la acumulación de lípidos ocurrió en la etapa estacionaria tardía, en especial en ausencia de N. Aquellas células cultivadas en medio *f*/2-P mostraron un menor contenido de lípidos luego de los primeros 10 días respecto al medio completo y carente de N, aumentando su contenido lipídico a los 20 días con un valor similar al obtenido para las células cultivadas en medio completo. En *Phaeodactylum tricornutum* la carencia de P fue un disparador temprano para la acumulación de lípidos, pero la acumulación efectiva tiene lugar con el agotamiento de N del medio (Valenzuela *et al.* 2012). La acumulación de TAGs con el envejecimiento de los cultivos, aún en medio completo, ha sido repetidamente informada (Alonso *et al.* 2000, Hu *et al.* 2008, Popovich *et al.* 2012, Martín *et al.* 2016).

La cuantificación de lípidos totales de *H. luciae* por el método de la SPV resultó entre 0,5-1,9 µg de lípidos/100 µg PF en la fase estacionaria temprana, y 4-7,2 µg de lípidos/100 µg PF (véase **Figura 2.6**) en la fase estacionaria tardía, para las células cosechadas a los 10 y 20 días, respectivamente. Estos valores son semejantes a los publicados por Visca *et al.* (2017) y Mishra *et al.* (2014) con el ensayo de la SPV en distintas especies de algas verdes y por Makri *et al.* (2011) en distintas especies de la diatomea *Asterionella* mediante el método gravimétrico (Folch *et al.* 1957). Sin embargo, en general, resultan inferiores a otras estimaciones por el último método (Chen 2012, Barnech Bielsa *et al.* 2016, Martín *et al.* 2016, Yodsuwan *et al.* 2017).

Un requisito del método gravimétrico es contar con una biomasa mucho mayor a la que se obtuvo en los cultivos en cristalizadores. En consecuencia, se optó por

la cuantificación colorimétrica alternativa. Debe tenerse en cuenta que el método de la SPV detecta lípidos insaturados, especialmente monoinsaturados (Byreddy *et al.* 2016). De acuerdo con ello, las pendientes de las curvas de calibración disminuyeron conforme aumentaba el porcentaje de saturación de los ácidos grasos presentes en el aceite patrón. La menor de las pendientes correspondió al aceite de coco (> 80 % de ácidos grasos saturados), la mayor pendiente fue la obtenida con el aceite de oliva (25 % ácidos grasos saturados) y para la mezcla 1:1 de oliva y coco la pendiente alcanzó un valor intermedio entre las anteriores.

Por lo tanto para el método de la SPV, la cantidad de lípidos totales cuantificados dependerá, en gran medida, de la elección del estándar para la curva de calibración para evitar la subestimación o sobreestimación del contenido de lípidos de la muestra en cuestión.

En vista de estos resultados podemos aceptar parcialmente la **Hipótesis 1**, ya que en *H. luciae* sólo la carencia de N produjo la acumulación de lípidos en la fase estacionaria tardía. En ausencia de P, la acumulación de lípidos siguió un patrón semejante al de los cultivos envejecidos en medio completo.

2.9. Morfología y morfometría

Los cambios en el biovolumen y en el diámetro de las areolas de *H. luciae* guardan relación con la eficiencia de la incorporación de nutrientes y, por ende, con la tasa de crecimiento. En los organismos unicelulares como las diatomeas, los nutrientes inorgánicos son absorbidos en la superficie celular y, una vez dentro del citoplasma, transportados al compartimento celular donde serán asimilados. Una célula crecerá en tanto el balance entre lo que absorbe y lo que consume sea

positivo; ello implica que a medida que dicho balance tienda a uno, una célula alcanzará un tamaño máximo (Kiørboe 2008).

Superadas las dimensiones máximas, la absorción no cubrirá los requerimientos celulares de asimilación de nutrientes y como consecuencia la célula no aumentará de tamaño (Reynolds 1984, Geider *et al.* 1986). Hein *et al.* (1995) compararon la constante de saturación media (K_s), la velocidad de incorporación (V_m) y la eficiencia del consumo (α) de nutrientes nitrogenados (sales de nitrato y de amonio) en microalgas y macroalgas con diferente relación superficie:volumen (S:V). La V_m y la α aumentaron mientras que la K_s disminuyó con el incremento de la relación S:V, indicando que las algas con mayor relación S:V requirieron de una menor concentración de nutrientes nitrogenados para alcanzar la saturación del consumo.

Los estuarios como el de Bahía Blanca son ambientes ricos en nutrientes. En este tipo de ecosistema, donde las diatomeas suelen predominar en la comunidad microbentónica (Saburova & Polikarpov 2003), la abundancia de nutrientes permite que las células alcancen mayor tamaño (Sarhou *et al.* 2005, Yamamoto *et al.* 2012). Por el contrario, la respuesta frecuente de las poblaciones de diatomeas a la limitación de nutrientes y/o a cambios marcados de los factores abióticos es la reducción del tamaño celular (Scholz & Liebezeit 2012). Ello conduce a un incremento de la relación S:V que favorecerá el intercambio de gases y solutos, tornándolas más competentes en un escenario de estrés nutricional (Sarhou *et al.* 2005).

En *H. luciae*, la reducción de la tasa de crecimiento conjuntamente con la disminución del volumen celular se registró únicamente ante la carencia de N. Similares resultados fueron comunicados por Lynn *et al.* (2000) en

Stephanodiscus minutulus y Martín *et al.* (2016) en *Halamphora coffeaeformis*. Sin embargo, en ausencia de P, la reducción de la tasa de crecimiento no estuvo acompañada de cambios significativos en la relación S:V, aunque en este caso, las areolas fueron las de menor tamaño y los frústulos mostraron la mayor densidad de areolas puntiformes, hecho que podría dificultar el intercambio con el medio afectando negativamente la tasa de crecimiento.

Estos resultados permiten aceptar la **Hipótesis 2** en el caso de carencia de N. En ausencia de P no se registraron cambios significativos en la relación S:V. En cambio, la **Hipótesis 3** se verificó para los cultivos en ambos medios carenciados, con areolas fusionadas en ausencia de N y reducción de tamaño (areolas puntiformes) en ausencia de P.

2.10. Velocidad de desplazamiento y secreción de mucílago

Según la definición de Underwood & Paterson (2003), los hidratos de carbono medidos en los sobrenadantes libres de células corresponden a la fracción de las s-EPS (EPS soluble, véase **Sección 2**) que comprenden tanto moléculas de bajo y de alto peso molecular que no tienen una asociación estrecha con las células. Siguiendo este criterio, las huellas de mucílago se asignan a la fracción de las s-EPS de alto PM (véase **Sección 2**). Las s-EPS son continuamente liberadas al medio independientemente de las condiciones de luz y oscuridad (de Brouwer *et al.* 2002).

Si asumimos una relación entre la movilidad y la abundancia de las s-EPS, las huellas de mucílago deberían ser más abundantes en aquellas células que exhiben mayor velocidad de desplazamiento y mayor porcentaje de células en movimiento, como las células del medio *f*/2 y aquellas cultivadas en medio *f*/2-P.

La tinción con azul de toluidina reveló la abundante huella mucilaginoso remanente del desplazamiento de las células en ambos medios.

Con la utilización de ESEM fue posible visualizar las diferencias en la producción de mucílago en los tres medios de cultivo *in vivo* sin alterar su naturaleza hidrofílica (Chiovitti *et al.* 2006). A medida que las células se desplazaban sobre el sustrato, dejaban a su paso un rastro que se tornó más difuso y con límites menos definidos en las partes más viejas, indicando la hidratación y solubilización parcial de los polisacáridos del mucílago. Los hidratos de carbono solubilizados conforman la fracción de las s-EPS de bajo peso molecular (Underwood & Paterson 2003).

Aunque la producción de mucílago extracelular es específica para cada especie (Penna *et al.* 1999, Chiovitti *et al.* 2003 a-b, de Brouwer *et al.* 2006), la carencia de nutrientes o la desviación de la relación N:P del valor de 16 en la relación de Redfield (Geider & La Roche 2002) pueden estimular la secreción extracelular de mucílago en las diatomeas (Myklestad 1995, Ruddy *et al.* 1998, Alcoverro *et al.* 2000, Leandro *et al.* 2003, Underwood *et al.* 2004, Abdullahi *et al.* 2006).

La mayor producción de las EPS ocurre generalmente en la transición de la fase exponencial y la estacionaria (Urbani *et al.* 2005, Abdullahi *et al.* 2006). Cuando la capacidad de fijar carbono por fotosíntesis excede la capacidad de almacenamiento dentro de la célula, se favorece la secreción de hidratos de carbono (de Brouwer & Stal 2002, Brembu *et al.* 2017).

Para *H. luciae*, la ausencia de P estimuló la producción de s-EPS, como reportaron Penna *et al.* (1999) para *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema costatum* y Ai *et al.* (2015) para *Thalassiosira pseudonana*, mientras que la carencia de N en un

medio con P produjo una reducción en la secreción de las s-EPS, como fue informado por Guerrini *et al.* (2000) para la diatomea *Achnanthes brevipes*.

De acuerdo a las diferencias registradas en la abundancia de secreción extracelular en los diferentes medios de cultivo, se puede aceptar la **Hipótesis 4**.

En cuanto a la velocidad de desplazamiento de las células de *H. luciae* (1,5-3,5 $\mu\text{m s}^{-1}$) la misma se encuentra dentro del rango de 0,1-25 $\mu\text{m s}^{-1}$ informado para otras especies (Cohn & Disparti 1994, Consalvey *et al.* 2004, Chiovitti *et al.* 2006, Bondoc *et al.* 2018).

Con variaciones de acuerdo a la especie, el movimiento de las diatomeas responde a diversos estímulos ambientales como la temperatura (Cohn *et al.* 2003, Svensson *et al.* 2014), la salinidad (Apoya-Horton *et al.* 2006), los nutrientes (Revsbech *et al.* 1983, Saburova & Polikarpov 2003), la presencia de compuestos tóxicos (Thompson *et al.* 2008) y la luz (Cohn 2001, Apoya-Horton *et al.* 2006, Blommaert *et al.* 2018). En el caso de la luz, tanto la longitud de onda como la intensidad inciden en la movilidad (Ezequiel *et al.* 2015). El movimiento de las diatomeas responde a las bandas del azul y del rojo del espectro visible (Cohn *et al.* 1999). Por otro lado, las respuestas fototácticas son generalmente negativas a intensidades superiores a 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cohn *et al.* 2004, McLachlan *et al.* 2009, Blommaert *et al.* 2018) y positivas a intensidades inferiores a ese valor (Witkowski *et al.* 2012). Al igual que en otros organismos, en el fototactismo intervienen fotoreceptores (Depauw *et al.* 2012, Cohn *et al.* 2015, Jaubert *et al.* 2017) como aureocromos (Schellenberger Costa *et al.* 2013) y criptocromos (Juhas *et al.* 2014).

El tipo de desplazamiento es similar al informado para *Cylindrotheca closterium* (Apoya-Horton *et al.* 2006). Estos autores atribuyeron el movimiento

“pivotante” de la célula a la percepción de un gradiente químico de nutrientes en el sustrato que influye directamente sobre el movimiento. En condiciones sub-óptimas de nutrientes, el movimiento pivotante permite la percepción de la “ruta óptima de los nutrientes”, contribuyendo a que el desplazamiento se reanude en la dirección más propicia.

La carencia de nitrógeno afectó tanto la velocidad como el porcentaje de células en movimiento en *H. luciae*. Witkowski *et al.* (2012) informaron que bajo deficiencia de N y P disminuyó la movilidad de *Navicula* sp. En nuestro caso, bajo carencia de P observamos un aumento de la velocidad y del porcentaje de células en movimiento, incluso en la fase estacionaria tardía, tal como fue registrado por Bondoc *et al.* (2018) para *Seminavis robusta*. Como se puntualizó anteriormente, en estas condiciones hubo una disminución de la tasa de crecimiento.

El ensamblado-desensamblado del citoesqueleto y su asociación al complejo de adhesión y secreción de mucílago durante el desplazamiento consumen energía celular y podría suponerse que el aumento de la movilidad fue en detrimento de la tasa de crecimiento. Por lo tanto, se puede aceptar la **Hipótesis 5** dado que la velocidad de desplazamiento fue modificada por la composición del medio de cultivo.

2.11. Actividad enzimática

La hidrólisis de sustratos orgánicos por parte de las enzimas extracelulares o de membrana plasmática permite sobrellevar situaciones de escasez de N o P. En el caso de *H. luciae*, la necesidad de incorporar fosfato o nitrógeno fue estimulada por varios días de cultivo de las células en medio carente de estos nutrientes. No

puede descartarse una posible actividad enzimática basal y otros mecanismos de regulación enzimáticos. Se cuantificó una baja actividad enzimática constitutiva al inicio de cada uno de los ensayos. Hay evidencias informadas tanto para enzimas constitutivas e inducidas por el sustrato en diferentes tipos de algas (Hernández *et al.* 2002).

La inducción de la respuesta enzimática fue diferente para las fosfatasa y las proteasas. La actividad fosfatasa se observó prácticamente desde el inicio de la incubación (min) en presencia del organofosfato *pNPP*, independientemente si el tiempo de incubación en ausencia de P fue de 5, 10 o 20 días. En cambio, la inducción de actividad proteasa requirió de al menos 20 h (tanto en control como en los tratamientos) de incubación en presencia de azocaseína, lo que sugiere la síntesis *de novo* de proteínas.

El tiempo de hambreado previo también afectó la medición de la actividad proteasa en controles y tratamientos. Solo cuando los cultivos fueron sometidos a 10 días de carencia de N se observó una mayor actividad proteasa en los cultivos *f/2-N* respecto a los controles, aunque con carencia de N durante 20 días, la inducción de la actividad fue menor en aquellas células carentes de N respecto de los controles. Si asumimos que la actividad de esta enzima implica síntesis *de novo* de las proteínas, la prolongación del hambreado previo podría afectar las vías biosintéticas.

En los zimogramas, la actividad fosfatasa alcalina de *H. luciae* coincidió con la banda de 61,2 kDa aproximadamente, muy similar al informado por Lin *et al.* (2013) para la fosfatasa alcalina de *P. tricornutum*. Sin embargo, a diferencia de estos autores, no observamos diferencias en intensidad del revelado de la actividad enzimática en las células provenientes de medio carenciado con respecto

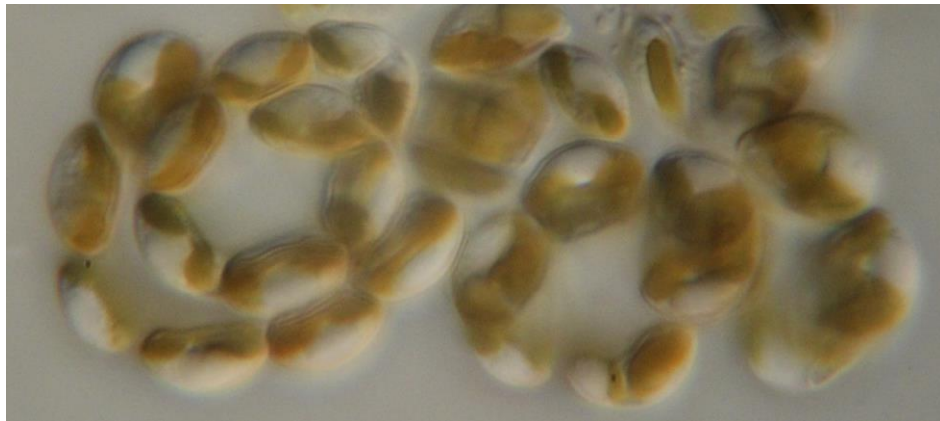
al control. Dado que la cantidad de proteína sembrada en el gel fue la misma para los dos extractos celulares (provenientes de *f/2* y *f/2-P*), podemos suponer que el período de hambreado de 10 días utilizado en el presente trabajo, mayor que el de 2 a 7 días empleado por Lin *et al.* (2013) condujo al agotamiento de P en el medio control, incidiendo sobre la actividad enzimática.

En cuanto a la actividad proteasa, en los zimogramas correspondió a dos bandas de peso molecular 72,2 kDa y 174,7 kDa. La intensidad de estas bandas fue levemente mayor en los extractos de las células provenientes de medio carenciado en N. La banda de 72,2 kDa es semejante a la reportada por Nagao *et al.* (2012) para la diatomea *Chaetoceros gracilis*. Los resultados de proteómica sugieren que esta banda correspondería a una Zn Proteasa-ATP dependiente plastidial (véase la **Sección 2, Tabla 4.14**).

La inducción de las actividades fosfatasa alcalina y proteasa bajo carencia de P y N, respectivamente, permiten corroborar las **Hipótesis 6** y **7** planteadas.

SECCIÓN 2

INTRODUCCIÓN



**Aplicación de técnicas de espectrometría
de masa en el estudio de polisacáridos y
proteínas de diatomeas**

3.1. El frústulo: sílice y materia orgánica con una arquitectura compleja

Los componentes silíceos del frústulo están acompañados de materia orgánica que se distribuye en: **a)** una cubierta externa, **b)** una capa localizada entre la membrana plasmática y la cubierta silícea, el diatopetum y **c)** una serie de moléculas orgánicas atrapadas dentro de la matriz de sílice (Pickett-Heaps *et al.* 1990, Aumeier & Mensel 2012, Tesson & Hildebrand 2013, Bedoshvili *et al.* 2018). Adicionalmente, las células están envueltas en mucílago extracelular (EPS) con mayor o menor grado de asociación a la cubierta celular (Underwood & Paterson 2003). Entre los componentes orgánicos embebidos en el entramado silíceo se identificaron proteínas como las silafinas, cingulinas y cadenas de poliaminas (Sumper *et al.* 2005, 2007, Scheffel *et al.* 2011) y polisacáridos complejos (Le Costaouëc *et al.* 2017 y bibliografía allí citada).

3.1.1. Polisacáridos

Los polisacáridos constituyen entre 10-80 % de la materia orgánica de las diatomeas. De acuerdo a su localización celular se los clasifica en tres grupos principales: estructurales, de reserva y extracelulares (Granum & Myklestad 2001).

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, de sus siglas en inglés *extracellular polymeric substances*) son liberadas al medio a través de áreas especializadas en el frústulo: el rafe de algunas diatomeas pennadas, los procesos que atraviesan la valva (rimopórtula, fultopórtula) y/o regiones del frústulo engrosadas con sílice y perforadas por poros (ocelos), en el caso de las especies céntricas o pennadas sin rafe (véase **Sección 1, Introducción**). Las EPS intervienen en la adhesión y movilidad sobre un sustrato en las diatomeas

bentónicas y facilitan la flotabilidad en la columna de agua en las especies planctónicas.

Distintos factores ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, la intensidad lumínica o la presencia de metales pesados y agrotóxicos, pueden modificar la tasa de secreción de las EPS (Magaletti *et al.* 2004, Urbani *et al.* 2005).

El polisacárido de reserva, la crisolaminarina, es un (1→3)-β-D-glucano con grado variable de ramificación en el C-6 y/o en el C-2 (Granum *et al.* 2002, Stone 2006). El contenido de crisolaminarina varía con el estado fisiológico de las células y las condiciones ambientales (Granum & Mykkestad 2001, Xia *et al.* 2013, 2014, Caballero *et al.* 2016) pudiendo alcanzar valores superiores a 80 % del peso seco cuando un cultivo se somete a carencia de nitrógeno (Vårum & Mykkestad 1984).

Los polisacáridos estructurales aparecen entremezclados en la matriz de sílice de las cubiertas celulares. Tal como lo señalan Le Costaouëc *et al.* (2017), el aislamiento y purificación de polisacáridos a partir de las cubiertas celulares de microalgas es complejo, lo que ha llevado a la resolución estructural en contados casos. Se han descrito glucuromananos sulfatados (Chiovitti *et al.* 2003b, Chiovitti *et al.* 2005, Le Costaouëc *et al.* 2017). Adicionalmente, Tesson y Hildebrand (2013) reportaron la presencia de calosa, un (1→3)-β-D-glucano no ramificado en las bandas del cingulo.

3.2. Sustancias poliméricas extracelulares

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), fueron extensamente estudiadas por sus múltiples funciones en los sistemas acuáticos, incluyendo, entre

otras, la agregación de partículas de los sedimentos y la formación de “nieve marina”, su participación en el ciclo biogeoquímico del carbono, en el desplazamiento por deslizamiento de las diatomeas sobre el sustrato, en su encapsulamiento dentro de la matriz de biofilms y en la fijación a distintas superficies en las especies sésiles (Xiao & Zheng 2016 y bibliografía allí citada). Más recientemente, el estudio de las EPS se ha orientado hacia aspectos aplicados. Las propiedades adhesivas de los mucílagos de diatomeas generan problemas de deterioro por incrustaciones en construcciones costeras y embarcaciones (Molino & Wetherbee 2008). En el caso de embarcaciones, estas incrustaciones en los cascos aumentan considerablemente la fricción con el consecuente incremento de consumo de combustible (Schultz 2007). El uso de biocidas ha sido infructuoso, con el agravante de que causan daño ambiental en los cuerpos acuáticos (Callow & Callow 2011). Este problema ha incentivado el desarrollo de pinturas antibiodeterioro, los polímeros novedosos más recientes “bioinspirados” mediante la aplicaciones de nanotecnología (Callow & Callow 2011).

Por otra parte, actuando como interfases adherentes sobre las superficies de tejidos, las EPS bloquean la adhesión de microorganismos patogénicos, posibilitando el diseño de terapias anti-adhesivas o bloqueantes de receptores celulares en infecciones y otros procesos inflamatorios (Guzman-Murillo & Ascencio 2000).

En suma, la caracterización estructural de las EPS podría revelarlas como un subproducto valioso aumentando la competitividad de las biorrefinerías de microalgas (Barnech Bielsa *et al.* 2016).

Underwood & Paterson (2003) clasifican las EPS, en dos grupos: las **b-EPS** o “*bound*” EPS en estrecho contacto con la superficie de las cubiertas celulares y

las solubles en el medio (**s-EPS**), que comprenden productos de bajo y alto peso molecular, sin contacto directo con los frústulos (**Figura 3.1**).

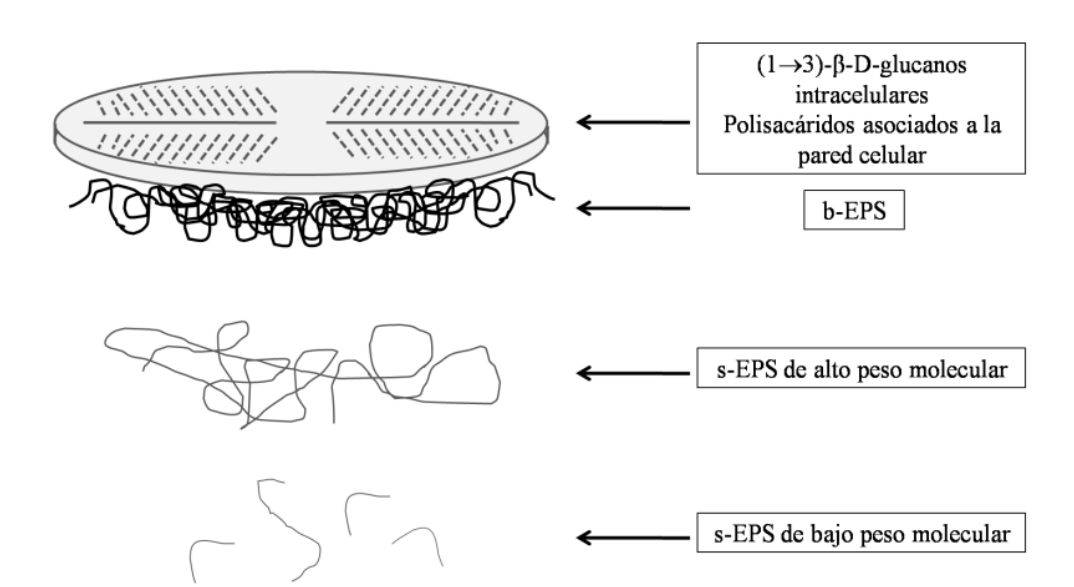


Figura 3.1: Localización de diferentes polisacáridos producidos por las diatomeas. Las s-EPS pueden provenir de la ruptura o solubilización parcial de las b-EPS (Imagen adaptada de Underwood & Paterson 2003).

Como se observa en la **Figura 3.1**, la delimitación entre una y otra fracción de EPS no es sencilla (Decho 1994, Nielsen & Jahn 1999, Underwood & Paterson 2003). Para Nielsen & Jahn (1999) las s-EPS son producto de la degradación del b-EPS. Por otro lado, Underwood & Paterson (2003) sostienen que las s-EPS no provienen de las b-EPS y que la composición de ambos extractos es muy diferente. Lo que es coincidente es que la composición de las EPS es muy variable y depende, entre otras cosas, de la especie a analizar, las condiciones de cultivo, si se trata de un bioagregado o un cultivo unialgal.

Cuando el material a analizar proviene de un bioagregado natural, las EPS incluirán macromoléculas provenientes de toda la flora microbiana junto con la de las diatomeas y el aporte de polímeros o productos de lisis celular tanto de

diatomeas como de otros microorganismos a la matriz del biofilm contribuyen a las propiedades fisicoquímicas del gel matricial. En esos microambientes, las EPS de las diatomeas constituyen una fuente de carbono orgánico tanto para organismos heterotróficos como para bacterias e invertebrados (Staats *et al.* 1999, Decho 2000, De Brouwer *et al.* 2002, Underwood *et al.* 2004).

En células obtenidas en cultivos unialgales axénicos, el grado de asociación del polímero a la superficie celular define la fracción de EPS; los geles y mucílagos están en estrecho contacto con la cubierta del frústulo (b-EPS), mientras que los hidratos de carbono disueltos en el medio acuoso pertenecen a la fracción de las s-EPS. Operativamente, al separar por centrifugación, los primeros quedan en el pellet celular mientras que los segundos se recuperan del sobrenadante (Nielsen & Jahn 1999). A partir de este procedimiento operativo, en el presente trabajo se consideró que las huellas mucilaginosas sobre la superficie de desplazamiento que no estaban en contacto con la superficie celular, corresponden a las s-EPS de alto peso molecular (Underwood & Paterson 2003).

3.3. Composición de las EPS

Las EPS están compuestas por proteínas e hidratos de carbono (Hoagland *et al.* 1993). Si forman geles de consistencia rígida adquieren diversas morfologías como tubos y fibrillas en las formas menos hidratadas, y films de adhesión en las más hidratadas (Gügi *et al.* 2015).

Los heteropolisacáridos aislados a partir de las EPS presentan una gran diversidad de monosacáridos componentes, entre los que se han citado ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos en menores proporciones (Underwood & Paterson 2003, Delattre *et al.* 2016, Xiao &

Zheng 2016). Además, algunos de los azúcares pueden estar sustituidos por ésteres sulfato (Chiovitti *et al.* 2003b) y/o grupos metilo (Chiovitti *et al.* 2003a).

Hasta el momento los estudios estructurales de las s-EPS son parciales y existen escasas referencias al tipo de unión entre los monosacáridos componentes (Gügi *et al.* 2015).

3.4. Polisacárido de reserva

La crisolaminarina, el principal polisacárido de reserva en las diatomeas (Xia *et al.* 2013), se acumula en vacuolas (Granum *et al.* 2002). De estructura semejante a la laminarina de las algas pardas, se diferencia por la ausencia de manitol. La cadena esquelética de (1→3)-β-D-glucopiranosas (n= 20-60) puede presentar ramificaciones de longitud variable sobre el C-6 y/o el C-2 (**Figura 3.2**) (Chiovitti *et al.* 2004, Størseth *et al.* 2006, Caballero *et al.* 2016, Daglio *et al.* 2018).

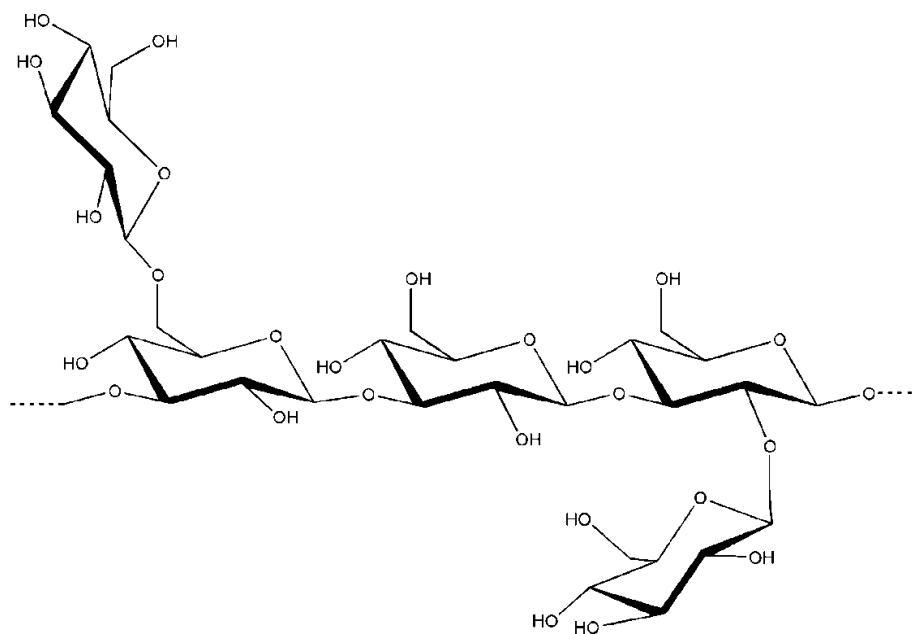


Figura 3.2: Estructura de la crisolaminarina, polisacárido de reserva de las diatomeas compuesto por una cadena principal de (1→3)-β-D-glucano, que puede presentar ramificaciones en β-(1→6) y/o β-(1→2). En esta figura se ejemplifica con ramificaciones simples de glucosa.

El conocimiento de la vía biosintética de la crisolaminarina aún es incompleto (Wagner *et al.* 2017). Se identificaron algunas enzimas clave como la UDP-glucosa pirofosforilasa que transfiere el grupo glucosil de la UDP-Glc a la cadena del (1→3)-β-D-glucano naciente (Roessler 1987, Zhu *et al.* 2016) (**Figura 3.3**).

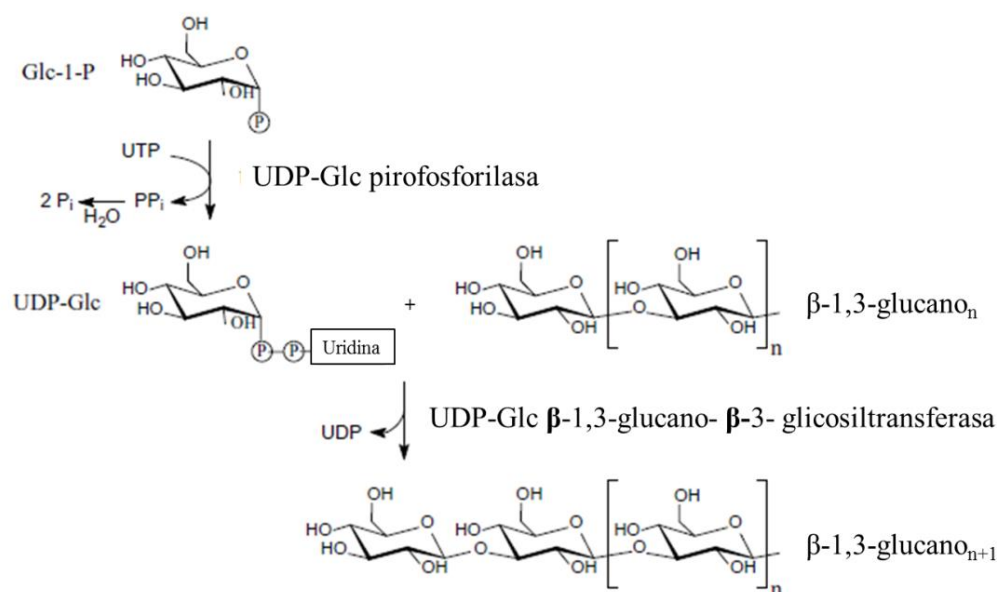


Figura 3.3: Uno de los pasos de la biosíntesis de crisolaminarina catalizado por la UDP-glucosa pirofosforilasa. Abreviaturas: **Glc**: Glucosa; **Glc-1-P**: Glucosa-1-fosfato.

Utilizando bicarbonato marcado con ¹⁴C en experiencias en cultivos fotoautotróficos de distintas especies de diatomeas se detectó la acumulación inicial de la marca radioactiva en los glucanos intracelulares, seguida a las 3 horas aproximadamente por la aparición del marcador radioactivo en las EPS (Smith & Underwood 2000). En células incubadas en oscuridad, la secreción de EPS continuó a expensas de la concomitante disminución del glucano de reserva (Smith & Underwood 2000).

Aplicación de técnicas de espectrometría de masa para el estudio de polisacáridos y proteínas

3.5. Fundamentos de la espectrometría de masa

La aplicación de la espectrometría de masa (MS) como técnica analítica en química, biología, ciencias de la salud y agrarias ha cobrado creciente importancia en los últimos años con el continuo desarrollo instrumental (El-Aneed *et al.* 2009). Esta técnica se basa en la formación de iones gaseosos cargados positiva o negativamente, que pueden ser separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z , donde m es la masa del ión molecular en unidades atómicas Dalton y z es el número de cargas del mismo). En un espectro masa, el **eje x** representa los valores de m/z mientras que el **eje y** indica la intensidad de la señal o cantidad de un determinado analito.

El análisis por MS brinda información única ya que permite, con rapidez y sensibilidad, identificar, cuantificar y aportar datos estructurales determinando con precisión las masas de átomos y moléculas transformados previamente en iones, mediante la respuesta de sus trayectorias a varias combinaciones de campos eléctricos y magnéticos (El-Anead *et al.* 2009).

Todos los espectrómetros de masa cuentan con una fuente de iones gaseosos, uno o más analizadores, un detector y un sistema de vacío (**Figura 3.4**). La muestra es introducida por la entrada del equipo hacia la fuente de ionización, donde los iones generados en fase gaseosa a partir del analito (A) son transferidos al analizador, responsable de su separación de acuerdo a su relación m/z . Por último, el detector registra la m/z y la intensidad relacionada con la cantidad de iones que llegan de una dada m/z .

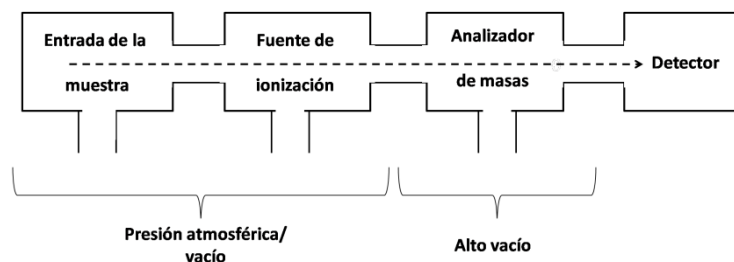


Figura 3.4: Esquema de los componentes de un espectrómetro de masa.

Todos los espectrómetros cuentan además con un sistema de alto vacío para evitar la pérdida de iones por colisiones entre sí. Estas colisiones pueden inducir la fragmentación e incluso impedir la llegada de los iones al detector, con pérdida de resolución y sensibilidad del instrumento (Hoffman & Stroobant 2007).

La gran variedad de equipamiento disponible en MS difiere fundamentalmente en los métodos empleados para generar los iones según distintos fenómenos físico-químicos de volatilización y ionización. Muchas de estas técnicas de espectrometría se utilizan acopladas a un equipo de cromatografía gaseosa (CG) si la muestra es volátil o líquida de alta resolución (HPLC) para la separación de compuestos biológicos como ácidos grasos, proteínas e hidratos de carbono.

3.5.1. Técnicas de ionización fuerte y suave

De manera general, los métodos de ionización pueden clasificarse en ionización fuerte y suave. Las técnicas de ionización fuerte tienden a la disociación de enlaces químicos y a la obtención de un gran número de iones por fragmentación en el espectro de masa. En las técnicas de ionización suave se obtienen espectros de masa con pocos iones fragmento y con iones precursores relativamente intensos que facilitan la determinación de la masa molecular del compuesto.

El primer método de ionización utilizado fue el de **impacto electrónico (EI)**. Los iones se generan a partir de un bombardeo con un haz de electrones sobre los analitos gaseosos neutros; si el analito es sólido o líquido a temperatura ambiente, se lo volatiliza previamente calentando hasta obtener el gas. Este bombardeo causa la expulsión de los electrones de los analitos, formándose el catión radical.

Este método se aplica para los análisis de compuestos de bajo peso molecular, fáciles de volatilizar y termoestables. El alto grado de fragmentación resultante dificulta la observación de los iones moleculares en el espectro. El EI no es apto para el análisis de moléculas termolábiles, como proteínas, aminoácidos e hidratos de carbono.

En los años 70 y 80, comenzaron los primeros experimentos para obtener los iones gaseosos de moléculas térmicamente inestables sin descomposición en un único paso. Estas técnicas de volatilización/ionización se denominaron técnicas de desorción e incluían, entre otras, **FAB** (de sus siglas en inglés, *fast atom bombardment*) y **LDI** (de sus siglas en inglés, *laser desorption/ionization*).

En el caso de FAB, A era depositado sobre un porta muestras metálico que se introducía en la cámara de ionización en alto vacío. Luego era bombardeado con un haz de átomos neutros acelerados, como He o Xe. En el caso del LDI la ionización se inducía por la acción de un láser y estaba estrechamente relacionada con la fotoquímica de los compuestos (Landoni *et al.* 2008).

Estos métodos, actualmente no utilizados, ampliaron tanto el rango de peso molecular de los compuestos como el uso de la técnica para el análisis de moléculas termosensibles.

A fines de la década del 80 se introdujeron dos técnicas de ionización suaves: **UV-MALDI** (desorción/ionización asistida por una matriz e inducida por un láser

ultravioleta) y **ESI** (la volatilización/ionización por nebulización en un campo eléctrico) causando una revolución en el análisis estructural de macromoléculas o biopolímeros de alto peso molecular como proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos entre otros metabolitos (Tanaka *et al.* 1988, Fenn *et al.* 1989, Mc Lafferty & Turecek 1993, El-Aneed *et al.* 2009).

La espectrometría de masa UV-MALDI desplazó a la técnica FAB en el estudio de azúcares y de compuestos glicoconjugados, dado que posibilita la ionización de moléculas de alto peso molecular como glicoproteínas, oligosacáridos y glucanos cíclicos con 10-100 veces mayor sensibilidad.

En UV-MALDI MS, A es depositado junto con una matriz sólida fotosensible (M) sobre un portamuestras. Esta mezcla seca se introduce en la cámara de ionización en alto vacío y se irradia con un láser ultravioleta (UV) donde se produce la desorción/ionización de A y M (Mc Lafferty & Turecek 1993). La aplicación de esta técnica en el análisis de hidratos de carbono posibilita el análisis de una mezcla de compuestos sin necesidad de separación ni de derivatización previa. Esta técnica fue desarrollada en principio para el análisis de péptidos y proteínas, y luego se extendió para el estudio de los hidratos de carbono (Harvey 1999).

En el caso de ESI MS, la solución polar que contiene el analito se convierte en una nube de gotas cargadas que se somete a la acción de un campo eléctrico fuerte, el solvente se evapora y los iones moleculares gaseosos generados son enfocados hacia el analizador (Fenn *et al.* 1989).

3.5.2. Analizadores

Paralelamente, los analizadores debieron perfeccionarse con el fin de satisfacer los requerimientos respecto al rango de masa de los compuestos (rango dinámico de análisis), la sensibilidad y el análisis de muestras en forma confiable.

Actualmente existen analizadores de masa de tipo cuadrupolo, trampa iónica, sector magnético/eléctrico, tiempo de vuelo (TOF), Orbitrap y resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICR) y varias combinaciones híbridas de estos.

El grupo de analizadores de baja resolución incluye a los cuadrupolos (Q) y a las trampas iónicas. Estos analizadores tienen resolución unitaria, es decir que pueden resolver iones que difieren en una unidad de masa, siempre y cuando el ancho del pico sea el adecuado. Su bajo precio, pequeño tamaño y alta velocidad de barrido, les otorga versatilidad para aplicaciones en espectrometría de masa *tándem*.

El desarrollo de analizadores de alta resolución, como el tiempo de vuelo (TOF), el Orbitrap (Hu *et al.* 2005) y la resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICR), ha posibilitado medidas de masa precisas (<5 ppm para el TOF y <1 ppm para el Orbitrap y FT-ICR).

En la espectrometría de masa en *tándem* (MS_n) se alinean dos o más analizadores de manera de poder analizar los iones producto que se generan por fragmentación a partir del ión molecular.

Las variantes instrumentales más utilizadas en MS_n incluyen ordenar en serie dos analizadores de tiempo de vuelo (TOF-TOF), o un analizador de tipo cuadrupolo y uno de tiempo de vuelo (Q-TOF) acoplados al método de ionización MALDI. En el caso de equipos con ionización por nebulización (ESI) pueden

encontrarse ordenamientos similares (Q-TOF) y otras variantes como dos analizadores de tipo cuadrupolo en serie (Q-q-Q).

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) opera midiendo el tiempo (entre 1-2 min) que le toma a un ión de energía cinética conocida viajar hasta el detector. Para poder discriminar los iones con alta resolución en base a sus tiempos de vuelo, se deben eliminar las colisiones, lo que requiere el uso de muy alto vacío (10^{-5} Pa). Por medio de una o más mallas de aceleración se imparten cerca de 100 eV de energía cinética de traslación a todos los iones, de modo de agruparlos de forma más compacta e impartirles la misma energía cinética inicial. Luego, los iones viajan en una zona libre de campo por lo que su velocidad se mantiene constante. La masa de los iones (m/z) se calcula en base a su tiempo de vuelo, que siempre que la energía cinética inicial sea idéntica, será más prolongado cuanto más grande sea el ion. Dado que se producen iones no fragmentados y con carga única, la masa de los iones se puede determinar con facilidad a partir del espectro resultante.

El espectro TOF es un simple registro de la señal del detector en función del tiempo (t). A partir de t , m/z se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{m}{z} = 2E_{cin} \frac{t^2}{s^2}$$

donde: s es la longitud del tubo de vuelo, m es la masa, z la carga y E_{cin} la energía cinética del ion. La resolución obtenida en el espectro de masa está determinada por el camino libre que recorren los iones (Schiller *et al.* 2004).

3.5.3. Carga de los iones

Cuando la ionización ocurre en fase gaseosa, los iones formados son monocargados, ya que es poco probable que en fase gaseosa dos o más especies reactivas reaccionen con la misma molécula neutra en un período corto de tiempo para generar un ión múltiplemente cargado, tanto por la repulsión de cargas como por la probabilidad de colisiones (Covey *et al.* 2009). Cuando la ionización ocurre en fase líquida, como en ESI, la aparición de iones múltiplemente cargados es frecuente (El-Aneed *et al.* 2009).

Los iones gaseosos de una muestra pueden generarse por la protonación o desprotonación (reacciones ácido/base), generándose $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ y por la formación de aductos con cationes/aniones como por ejemplo, $[M+Na]^+$ o $[M+Cl]^-$ (Zenobi & Knochenmuss 1998).

3.6. Espectrometría de masa UV-MALDI

La técnica de ionización MALDI es una de las elegidas para el análisis de mezclas complejas debido a que es rápida, sensible y que además tiene la ventaja de no requerir derivatización previa de la muestra (Harvey 1999, Hoffman & Stroobant 2007).

La muestra a analizar (A) se mezcla junto con la matriz (M) y se deposita en un portamuestras. El láser se enfoca en forma pulsada (cada pulso tiene una duración de 2-3 ns), hacia el electrodo portamuestras a través de un sistema óptico de lentes. Los iones resultantes se someten a la aceleración de un campo eléctrico que provoca el desplazamiento de los mismos a través de un camino libre (Schiller *et al.* 2004) hasta que finalmente alcanzan el detector (**Figura 3.5**).

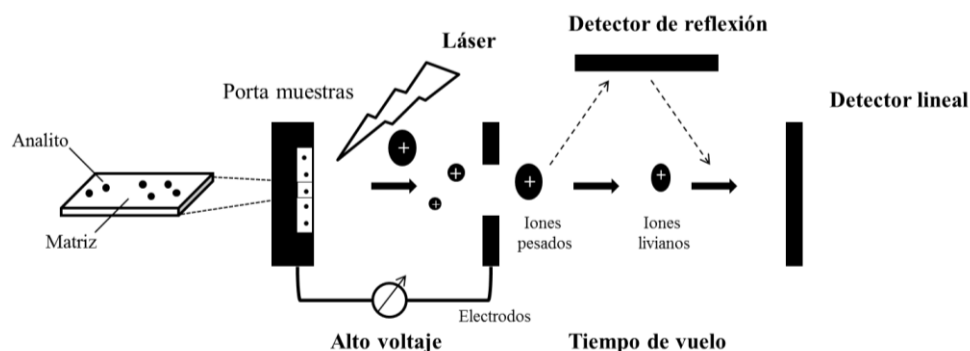


Figura 3.5: Esquema del recorrido de los iones en un equipo MALDI-TOF.

Los láseres que emiten fotones en el rango de la región UV (260-360 nm) son los utilizados casi exclusivamente en UV-MALDI MS (Harvey 1999, 2006). Los equipos poseen generalmente un láser de nitrógeno ($\lambda_{em} = 337$) o un láser Nd:YAG ($\lambda_{em} = 266$ nm).

UV-MALDI MS ha sido utilizada para el mapeo de la distribución superficial de distintos compuestos en tejidos y materiales no volátiles. Permite, por ejemplo, el análisis de péptidos, proteínas y otras biomoléculas directamente en la porción del tejido o dentro de células (Hoffman & Stroobant 2007, Nicolau *et al.* 2014, Daglio *et al.* 2018).

Las desventajas de esta técnica son la baja reproducibilidad de las señales obtenidas entre los disparos sucesivos del láser sobre la misma muestra, la alta dependencia de los resultados con el método de preparación de muestra utilizado y la heterogeneidad de las muestras.

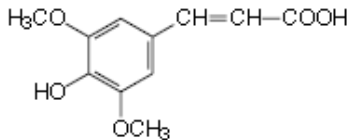
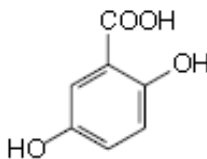
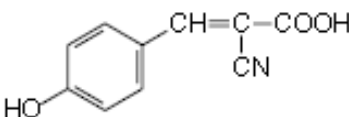
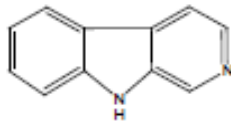
Por otro lado, la presencia de sales, buffers y otras sustancias puede afectar la obtención del espectro de la mezcla A y M, y de acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda su remoción (Fukuyama *et al.* 2005, Hoffman & Stroobant 2007).

3.6.1. Matrices utilizadas

Las matrices generalmente utilizadas son compuestos orgánicos aromáticos con un grupo carboxilo y con una alta absorción a la longitud de onda de emisión del láser. Esto induce la desorción del analito y promueve su ionización/volatilización. La función de la matriz es, por un lado, absorber la energía del láser para poder ionizar el analito y por otro, separar las moléculas de analito para evitar la formación de agregados, por lo tanto, la matriz y la muestra se mezclan con un exceso molar de matriz (100-1000 veces), que evita el impacto directo del láser sobre el analito.

En la **Tabla 3.1** se muestran los compuestos más frecuentemente utilizados en UV-MALDI MS.

Tabla 3.1: Matrices orgánicas utilizadas en UV-MALDI MS

Fórmula química	Matriz	Uso
	Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico, SA)	Proteínas, glicoproteínas y polímeros sintéticos
	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico, DHBA)	Proteínas y glicoproteínas, hidratos de carbono, polímeros sintéticos
	Ácido- α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA)	Proteínas y glicoproteínas, y polímeros sintéticos
	Nor-harmano (nHo)	Oligosacáridos ácidos

Es altamente deseable que la matriz genere señales muy pequeñas (para evitar interferencias), que proporcione un único aducto del analito y que tenga baja tendencia a la generación de clusters con la muestra (Harvey 1999).

La aplicación de la combinación de dos matrices es una alternativa para perfeccionar la habilidad individual de cada matriz y mejorar la calidad del espectro (Hashir *et al.* 2008, Laštovičková *et al.* 2009).

El SA es utilizado generalmente para proteínas de alto peso molecular (Schwartz *et al.* 2003). Una de las matrices utilizadas en MALDI es el DHBA; aunque originalmente introducida para el análisis de proteínas, es actualmente la más utilizada para el análisis de hidratos de carbono y lípidos (Dreisewerd 2014). Produce principalmente especies de tipo $[A+Na]^+$ y $[A+K]^+$. La mezcla con CHCA resultó de aplicabilidad limitada para oligosacáridos, pero confirmó su utilidad para inulinas (Dreisewerd 2014). Las β -carbolinas, una familia de alcaloides naturales presentes en plantas, demostraron ser matrices útiles en el análisis de azúcares no cíclicos y cíclicos. Son compuestos heterocíclicos nitrogenados que difieren en sus sustituyentes, entre las que encontramos el nHo.

3.6.2. Preparación de la muestra

La realización de experimentos utilizando la técnica UV-MALDI puede dividirse en dos etapas:

Primera etapa:

En esta etapa, el compuesto a analizar (A) se mezcla en una solución que contiene la especie química que actuará como la matriz (M). La matriz minimiza los daños indirectos que el láser puede ocasionar sobre A al absorber la mayor

parte de la energía térmica generada e incrementa la eficiencia del uso de la energía del láser.

Existen diferentes modos de preparación de la muestra. El método más utilizado es el de **mezcla** (**Figura 3.6a**), en el cual se mezclan partes iguales de la solución de matriz y del analito, ambas preparadas en solventes miscibles entre sí. Se deposita 1 μl de la mezcla sobre el portamuestras y se lleva a sequedad por evaporación del solvente a temperatura ambiente (véase **Métodos experimentales, ítem 5.24**).

El segundo método frecuentemente usado es el de capas sucesivas o **sándwich** (**Figura 3.6b**), en el cual se colocan, por ejemplo, 0,5 μl de solución de M sobre el electrodo portamuestras. Se seca a temperatura ambiente. Luego, se colocan sobre la primer capa 0,5 μl de solución de A, se seca y nuevamente 0,5 μl de solución de M, llevando a sequedad.

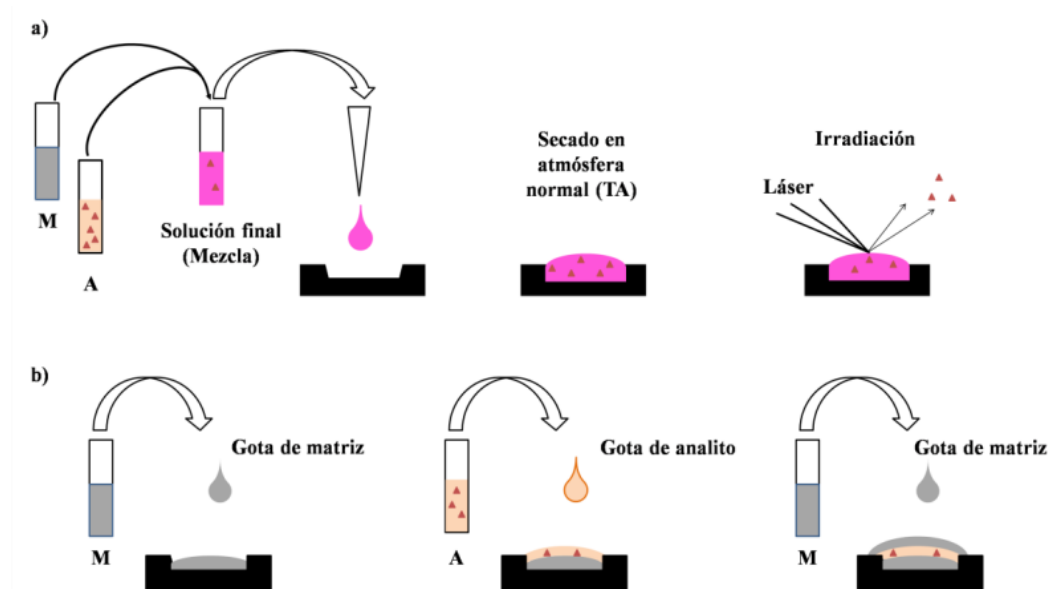


Figura 3.6: Métodos de preparación de la muestra para análisis por UV-MALDI MS. **a)** Método mezcla, **(b)** Método de capas sucesivas. En todos los casos se dejan secar la matriz (M) o el analito (A) a presión atmosférica y temperatura ambiente (TA) (Imagen adaptada de Erra-Balsells 2004).

Segunda etapa:

La segunda etapa involucra la ablación de la muestra sólida por medio de un láser UV que impacta sobre su superficie bajo condiciones de vacío dentro de la cámara de ionización (**Figura 3.7**).

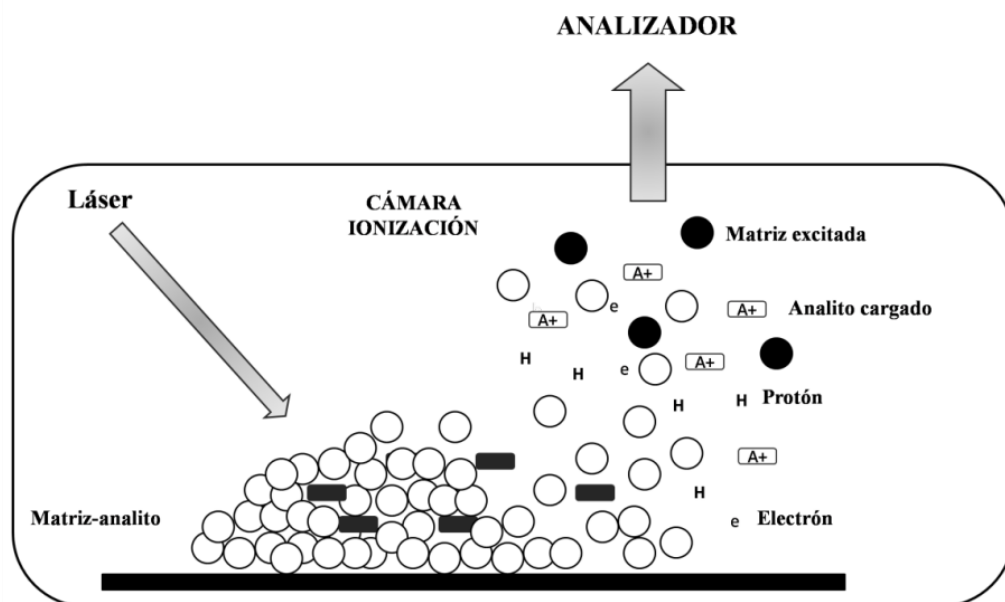


Figura 3.7: Proceso de ionización en UV-MALDI. La mezcla de matriz-analito es bombardeada con un láser UV que excita a la matriz (círculo blanco), la cual a su vez transfiere esta energía al analito (rectángulo negro). De esta forma se produce la ionización y desorción de los analitos (rectángulo blanco) como especies monocargadas (Figura adaptada de El-Aneed *et al.* 2009).

Aun no se conoce con exactitud como ocurre la ionización/volatilización de A y M en la cámara de ionización, aunque se postula que, cuando el haz de láser impacta sobre la mezcla, induce un rápido calentamiento de la mezcla por acumulación de energía térmica. Como consecuencia hay una sublimación local de moléculas de M, la ablación superficial de la porción de material y la vaporización de M a una fase gaseosa, incorporando consigo por arrastre mecánico y/o electrostático las moléculas de A. Durante este proceso se produce la ionización de las moléculas volatilizadas por intercambio de electrones y/o de

protones (protonación/desprotonación), o por interacción con unidades que poseen carga neta, como iones metálicos (Na^+ , K^+) (McLafferty & Turecek 1993, Harvey 1999). Los iones en fase gaseosa son luego enfocados por un campo eléctrico hacia el analizador.

3.7. Volatilización/ionización por nebulización en un campo eléctrico (ESI)

La introducción de la técnica de ionización basada en la generación a partir de la solución de A de una nube (“spray”) formada por diminutas gotas cargadas eléctricamente y sometida a la acción de un fuerte campo eléctrico, permitió el análisis de compuestos termolábiles de alto peso molecular. Este método de ionización fue denominado “*electrospray ionization*” (ESI).

Dentro de sus ventajas, se puede destacar que es el método de ionización menos invasivo de las propiedades del analito, salvo en lo que refiere a su volatilización y ionización. Por dicha razón es posible estudiar complejos moleculares debidos a interacciones no-covalentes dativas débiles como, entre otros, complejos proteína-proteína, enzima-substrato o proteína-ligando, estudios de la cinética del plegado de proteínas, etc.

El método ESI requiere que A se encuentre en solución en un medio polar que es introducido en forma de flujo continuo a través de un capilar a la región donde se aplica un elevado campo eléctrico (3-4 kV) generándose iones moleculares gaseosos intactos.

En el caso del ESI, para un dado analito A de peso molecular m se origina una familia de iones moleculares gaseosos policargados. Esta familia de señales tiene valores de m/z tales que z pertenece a un conjunto de números enteros sucesivos ($z=1, 2, 3$, etc.; $m/z = m/1, m/2, m/3$, etc) (Hoffman & Stroobant 2007). La

capacidad que tendrá A de generar moléculas gaseosas cargadas y z , dependerá directamente de m (tipo y número de grupos funcionales polares que presente). A mayor peso molecular, mayor número de grupos polares y mayor probabilidad de generar iones policargados ($z > 1$).

La primera explicación del fenómeno de generación de una nube con microgotas cargadas fue formulada por Dole *et al.* (1968). Esta descripción del principio por el que se produce el "electrospray" y su comportamiento bajo la acción de un fuerte campo eléctrico, incluye el modelo que contempla la formación de cargas residuales. Las microgotas cargadas contraen su volumen al ser sometidas a un fuerte campo eléctrico.

Cuando el número de cargas electrostáticas superficiales del mismo signo es mayor que las que puede estabilizar una gota de un dado tamaño, según las repulsiones de Coulomb, se produce la "explosión de Raleigh", es decir una eyección de moléculas de la superficie de la gota que pasan al estado gaseoso llevándose una o varias cargas, y disminuyendo de esta manera las fuerzas repulsivas en la superficie (**Figura 3.8**). Esta "explosión" produce una microgota cargada de menor tamaño. Si en esta gota no se cumple la relación número de cargas repulsivas:superficie total de la gota, vuelve a producirse una explosión, con pasaje al estado gaseoso de más moléculas que componen la gota mono o policargada.

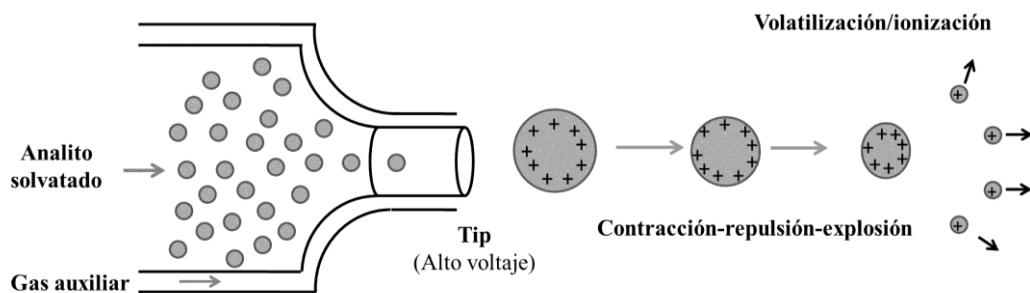


Figura 3.8: Formación de iones por ESI. La solución de la muestra pasa a través de un capilar cargado, formándose gotas cargadas en la cámara de ionización (presión atmosférica). Se esquematiza el modelo de Dole para explicar las cargas residuales presentes en las moléculas del analito desolvatadas.

Cabe señalar que, para un analito su ionización en modo positivo puede deberse a la fijación de protones o cationes (Na^+ , K^+ , Li^+ , etc.) y en el modo negativo puede producirse la pérdida de protones y/o de cationes en compuestos salinos. Esto puede introducir complicaciones en el estudio por ESI-MS, debido a la presencia de iones policargados múltiples.

Lo que hoy se conoce como método de volatilización/ionización ESI es una modificación del método de Dole formulado por Fenn (Fenn *et al.* 1989), quien demostró que era posible determinar, a partir de la familia de iones generada debido a la policarga de un mismo ion molecular, su peso molecular con una exactitud del 0,01 %. Para optimizar el proceso de desolvatación, se agregó un gas inerte (*drying gas*) (**Figura 3.8**).

3.8. Estudio de proteínas mediante proteómica

El término proteoma fue definido en los años 90 como el conjunto total de proteínas resultado de la expresión genómica de una célula, tejido u organismo (Wasinger *et al.* 1995). El establecimiento de la espectrometría de masa aplicada a moléculas biológicas (ESI y MALDI) y el desarrollo de técnicas de separación de

proteínas y péptidos como la electroforesis PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) y la cromatografía HPLC permitieron la consolidación y difusión de la proteómica como disciplina científica.

La variabilidad en el proteoma dependerá de la expresión diferencial de los genes de acuerdo a las condiciones fisiológicas, el procesamiento alternativo de los intrones y las modificaciones post-traduccionales de las proteínas. La proteómica es por lo tanto, el estudio del proteoma.

En los experimentos de proteómica denominados “bottom-up” (Steen & Mann 2004, Zhang & Ge 2011) la proteína de interés (o el conjunto de proteínas) son digeridas con una enzima de corte específico en péptidos de menor tamaño y separados por elución en una columna de HPLC (**Figura 3.9**).

Seleccionando los péptidos eluidos de acuerdo a su abundancia, se someten a la fragmentación por MS-MS (MS₂). El patrón experimental de fragmentación de cada péptido se compara con el espectro teórico (*in silico*) de una base de datos adecuada, y como resultado se infiere qué proteína origina ese péptido específico (**Figura 3.9**).

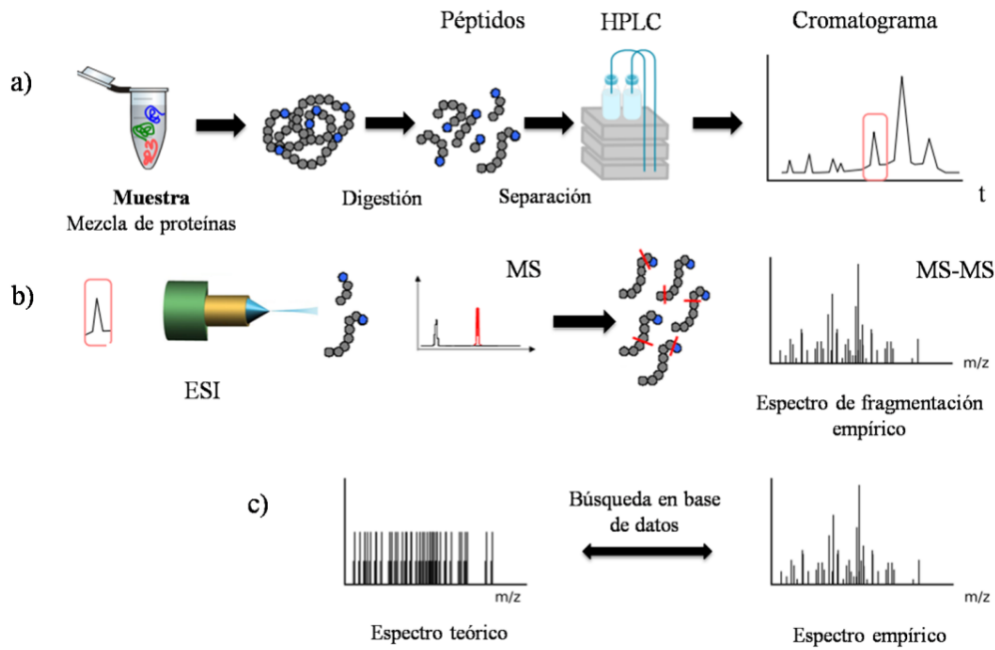


Figura 3.9: Etapas en un experimento de proteómica. **a)** En primer lugar la muestra de proteínas es digerida en péptidos que se separan cromatográficamente, frecuentemente por HPLC. A medida que eluyen los péptidos, son introducidos en el espectrómetro de masa generando su correspondiente espectro. **b)** Cada péptido puede seleccionarse y fragmentarse obteniendo un segundo espectro de fragmentación MS-MS característico. **c)** Por último el motor de búsqueda compara los espectros empíricos con espectros teóricos asignando una puntuación de acuerdo al grado de coincidencia entre ambos espectros.

3.8.1. Digestión de proteínas en péptidos

Tras la obtención de una muestra de proteínas, el primer paso consiste en su digestión mediante una enzima proteolítica que corta en puntos específicos de la secuencia dando lugar a un conjunto de péptidos. Esta digestión previa es necesaria, ya que la manipulación de las proteínas nativas es más complicada.

La enzima proteolítica tradicionalmente utilizada es la tripsina, que corta los enlaces peptídicos de arginina (R) o lisina (K) siempre que no exista una prolina (P) adyacente. Dada la frecuencia media de R y K, los péptidos trípticos producto de la acción de la tripsina tienen un tamaño adecuado para el análisis por MS.

También es posible emplear otras proteasas, siempre que se conozca su patrón de corte.

3.8.2. Separación de péptidos y proteínas

Dado que el patrón de péptidos resultantes de la digestión mediante una enzima proteolítica es específico, los espectros de masa de los péptidos permiten la identificación de la proteína. Sin embargo, a pesar de esta especificidad, en una mezcla proteica se genera un enorme número de péptidos, muchos de los cuales pueden poseer masas muy similares. Por ese motivo, para obtener una “huella dactilar peptídica” se requiere que la proteína se encuentre previamente purificada, generalmente a partir de una banda de 1D-PAGE o de una mancha de 2D-PAGE.

Cuando el objetivo es la identificación del máximo número de proteínas en un solo experimento, puede partirse de una muestra más compleja de proteínas, como es el caso de la presente Tesis.

Sabiendo que a partir de cada proteína se generan múltiples péptidos (trípticos), el grado de complejidad aumenta tras la digestión. Por este motivo, para evitar que la mezcla de péptidos sea demasiado compleja para la resolución en el análisis MS, previamente a la introducción de los péptidos en el espectrómetro se realiza una cromatografía separando los péptidos para ionización, de manera que lleguen al analizador de masa de forma gradual, generalmente por separación por cromatografía HPLC.

El tipo más común de cromatografía usada en proteómica es la de fase reversa, donde la fase estacionaria, no polar, está compuesta por unas micro-esferas de sílice recubiertas de cadenas alquilo de 18 átomos de C (C_{18}). Una vez que se

produjo la separación cromatográfica, los péptidos son ionizados e introducidos en el espectrómetro de masa.

3.8.3. Espectrometría de masa en tándem (MS_n)

Los péptidos, separados en el espectrómetro de masa en base a su relación m/z , generan señales cuyas intensidades son registradas en el detector.

El objetivo en proteómica consiste en la elección del mejor candidato de una lista de posibles péptidos generados por el espectro, a fin de inferir la proteína que dio origen a ese péptido. En la espectrometría de masa MS_n , los péptidos, una vez ionizados y en el interior del analizador, son sometidos a una fragmentación adicional (**Figura 3.10**).

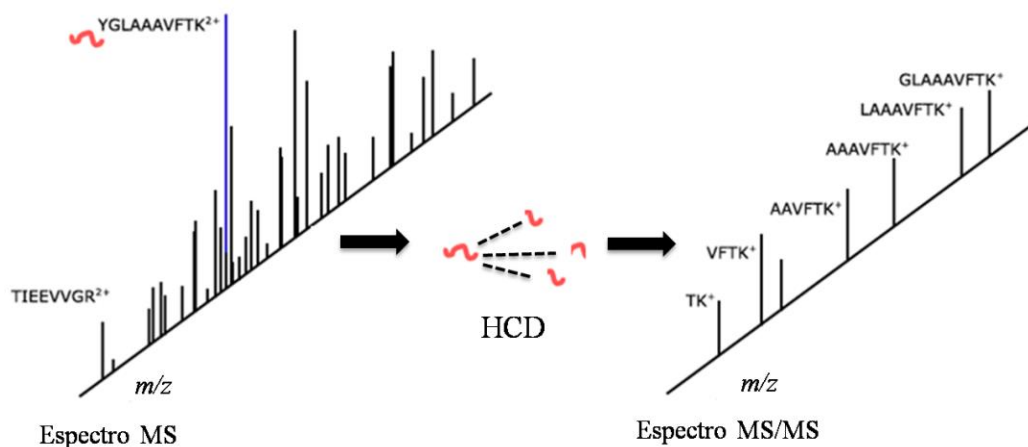


Figura 3.10: En la MS en tándem se seleccionan generalmente los péptidos precursores de mayor intensidad en el MS_1 para ser fragmentados y generar en este caso el espectro MS_2 .

El proceso de adquisición de espectros tiene varias etapas. En primer lugar, el instrumento hace un barrido de todos los péptidos ionizados introducidos en el espectrómetro y registra los llamados espectros MS_1 , con los valores m/z y las intensidades para cada ion.

Los péptidos se fragmentan generando iones más pequeños cuyo patrón de fragmentación responde más específicamente a la secuencia original. Esto aumenta el poder de resolución del análisis, ya que permite distinguir péptidos que, intactos, tienen masas muy similares, pero cuyos patrones de fragmentación MS_n son diferentes.

El espectro MS_2 adquirido, o espectro de fragmentación, registra los valores m/z e intensidades de los fragmentos de cada uno de los péptidos precursores aislados y fragmentados. Este patrón de fragmentación contiene la información necesaria para deducir la secuencia de aminoácidos del péptido de origen.

Una de las técnicas de fragmentación que se utilizan para analizadores de tipo Orbitrap es la **HCD** (Disociación por Colisión de Alta Energía, de sus siglas en inglés *High Energy Collision Dissociation*) (Olsen *et al.* 2007). La misma consiste en hacer colisionar las moléculas del analito (digerido previamente por la enzima correspondiente) con átomos o moléculas de gases nobles. La colisión provoca que parte de la energía cinética del ion sea transformada en energía vibracional, llevando a la ruptura de la cadena peptídica.

3.8.4. Asignación péptido-espectro

En un experimento típico de proteómica pueden generarse miles de espectros por hora. Se han desarrollado diversas herramientas de software para facilitar la asignación de secuencias peptídicas a los espectros MS_n . A cada uno de estos pares péptido-espectro se les denomina PSM (Asignación Péptido-Espectro de sus siglas en inglés *Peptide-Spectrum Match*).

La estrategia más utilizada para la obtención de una lista de PSM consiste en utilizar una base de datos de secuencias, donde se establece una correlación entre

el espectro MS_n obtenido empíricamente y espectros teóricos predichos a partir de secuencias.

Existe una gran variedad de motores de búsqueda que comparan los espectros registrados con los teóricos recopilados a partir de diversas fuentes de información, tales como el patrón de corte de la enzima proteolítica utilizada, los valores m/z de los fragmentos que se producirían a partir de los péptidos, la frecuencia estimada de cada tipo de fragmento y las secuencias de las proteínas en una base de datos de referencia.

Los motores de búsqueda asignan a cada espectro empírico obtenido un péptido, el mejor candidato de una lista de los posibles péptidos que han generado ese espectro, con una cierta medida de puntuación en función del grado de similitud entre espectro empírico y teórico.

La estrategia consiste en realizar una digestión teórica de las secuencias de proteínas de referencia, teniendo en cuenta los parámetros especificados. Así, para cada espectro observado, el motor de búsqueda recorre las secuencias en una base de datos seleccionando aquellos péptidos con valores m/z similares al del ion precursor en el espectro empírico y que se encuentran dentro del rango de tolerancia permitido, dando un espectro teórico para cada uno. A continuación se establece el grado de similitud de cada espectro adquirido con los espectros teóricos de cada uno de los péptidos candidatos, usando distintas funciones de puntuación.

La puntuación utilizada para el análisis de péptidos de la presente Tesis fue SEQUEST (Eng *et al.* 1994). Para cada espectro adquirido, SEQUEST calcula la puntuación de correlación (Xcorr) para todos los candidatos con los que es comparado. En primer lugar, se crea un espectro empírico procesado en el que los

picos de baja intensidad son eliminados y el resto de valores m/z son redondeados al valor entero más próximo. Para cada candidato se crea un espectro teórico usando unas reglas de fragmentación simplificadas. Básicamente, Xcorr contabiliza el número de fragmentos coincidentes entre el espectro empírico (procesado) y el espectro teórico.

3.8.5. Evaluación estadística

El procesamiento de los miles de espectros generados es un aspecto fundamental para la interpretación de los resultados. No a todos los espectros MS_n generados se les asigna un péptido, y a su vez, de todo el conjunto de PSM, sólo una fracción de ellos son correctos, es decir el espectro corresponde realmente a la secuencia asignada. Por eso, el desarrollo de métodos de evaluación de la calidad, en términos de confianza estadística, es una tarea crucial para filtrar los resultados generados.

Para la estimación de la tasa FDR (de sus siglas en inglés, *False Discovery Rate*) se recurre a una base de datos llamada señuelo o *decoy*. Los espectros MS_n son comparados con espectros teóricos derivados de secuencias señuelo que son secuencias que no corresponden a ninguna proteína. De esta forma, se puede tener la certeza de que los resultados de identificaciones correspondientes a secuencias señuelo corresponden a identificaciones incorrectas.

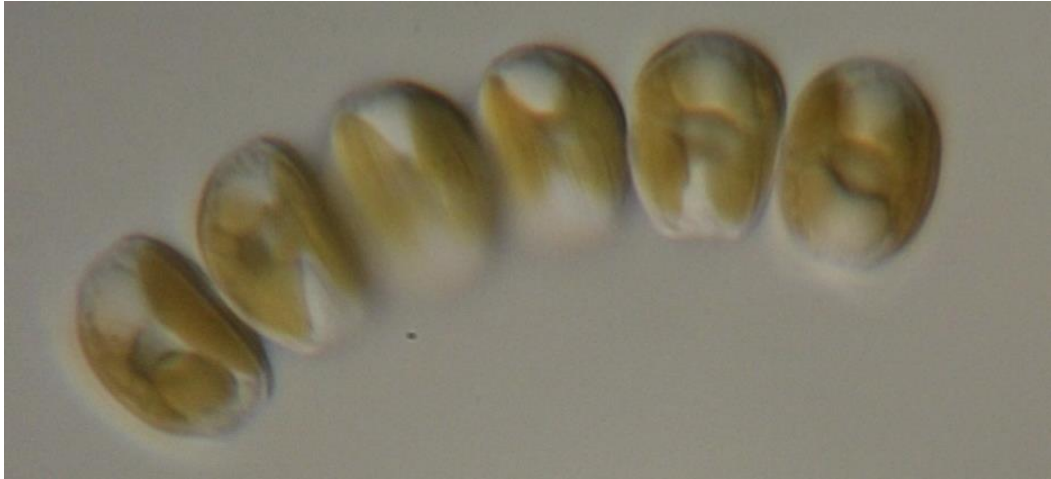
3.8.6. Inferencia de proteínas a partir de péptidos

En un experimento de proteómica, desde el momento de la digestión de las proteínas, todo el análisis se realiza a nivel de péptidos. Esto provoca una

dificultad para ensamblar una lista de proteínas que podría encontrarse en la muestra analizada.

Uno de los principales motivos que complican la inferencia de las proteínas se refiere a la pérdida de la correspondencia péptido-proteína debida fundamentalmente a la detección de péptidos compartidos cuyas secuencias están en diferentes proteínas. En algunos casos el procesamiento alternativo de intrones provoca la existencia de isoformas de una proteína en la muestra. De estas, sólo algunas tienen en su secuencia péptidos trípticos exclusivos que permiten, en caso de ser detectados, concluir la identidad de la proteína fehacientemente.

RESULTADOS



Aplicación de la espectrometría de masa
para el estudio de los polisacáridos y el
proteoma de *Halimphora luciae*

4.1. Caracterización de las s-EPS de *H. luciae* en distintas condiciones de cultivo

4.1.1 Cromatografía de permeación en gel

Uno de los inconvenientes ocasionados al aislar los polisacáridos a partir de la solución de cultivo en agua de mar es que los productos siempre se obtienen acompañados de gran cantidad de sales.

La fracción S3 (véase **Métodos experimentales, ítem 5.16.1**) fue la única que dio reacción positiva con la técnica del fenol-sulfúrico. Los rendimientos de S3 fueron: *f*/2: 97,3 mg (40,6 mg l⁻¹), *f*/2-N 30,8 mg (27,4 mg l⁻¹), *f*/2-P 27,4 mg (20.6 mg l⁻¹).

Dado su mayor rendimiento, se ensayó en primera instancia el desalado del producto S3 de las s-EPS del medio completo *f*/2 por cromatografía de permeación en gel (**Figura 4.1**).

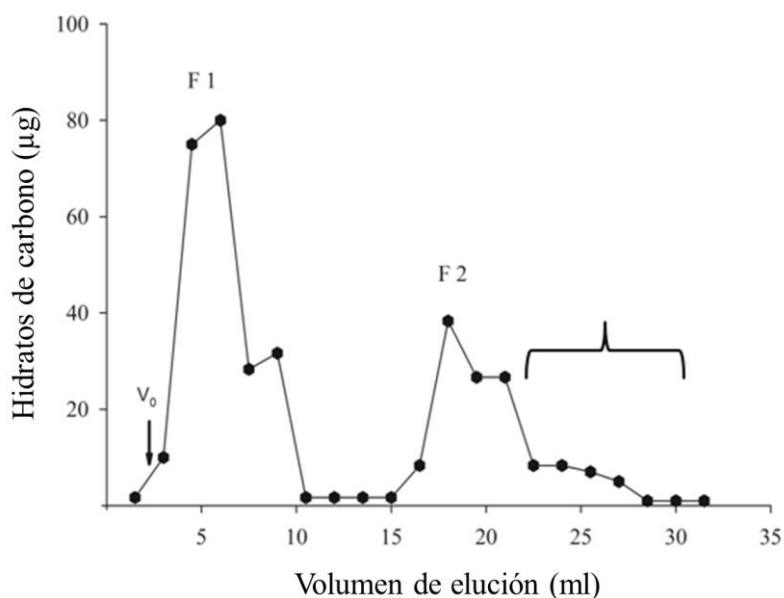


Figura 4.1: Perfil de elución del producto S3 de las s-EPS de cultivos en medio completo *f*/2 en la columna empacada con Bio-Gel P-2. La llave indica el rango de elución donde se detectaron sales. La flecha señala el V_0 .

Las fracciones positivas para la reacción de fenol-ácido sulfúrico para hidratos de carbono (F1 y F2) fueron recolectadas y liofilizadas, a fin de calcular su rendimiento y el porcentaje de hidratos de carbono (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1: Análisis de las fracciones F1 y F2 obtenidas por cromatografía en la columna con Bio-Gel P-2 del producto S3 de las s-EPS de cultivos en medio completo.

Fracción	Rendimiento (mg/100 mg totales)	Hidratos de carbono (%)
F1	7,5	1,18
F2	2,4	0,4

La fracción F1 fue elegida en los siguientes ensayos por ser la que presentó mayor rendimiento y mayor porcentaje de hidratos de carbono.

Por otro lado, ante la sensible disminución de masa del producto luego del desalado, se omitió este procedimiento para los extractos de los medios *f*/2-N y *f*/2-P que contaban con una masa inicial total de 20-30 mg de cada uno.

Tanto la fracción F1 del medio completo como los extractos S3 de los medios *f*/2-N y *f*/2-P se denominaron en los ensayos subsiguientes como s-EPS_C (medio completo *f*/2), s-EPS-N (medio carente de nitrógeno) y s-EPS-P (medio carente de fósforo).

4.1.2. Composición de hidratos de carbono y proteínas

El porcentaje de hidratos de carbono y de proteínas de las s-EPS del medio completo y los carenciados obtenido a los 10 días de iniciado el cultivo se muestra en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2: Contenido de proteínas, hidratos de carbono y relación de hidratos de carbono: proteínas de las s-EPS de *H. luciae* obtenidas a los 10 días de cultivo. Los contenidos se expresan como media $\pm$ DS ($n=3$).

	s-EPSc	s-EPS-N	s-EPS-P
Proteínas (%)	2,28 $\pm$ 0,9	1,12 $\pm$ 0,1	1,03 $\pm$ 0,4
Hidratos de carbono (%)	0,97 $\pm$ 0,3	2,16 $\pm$ 0,7	3,22 $\pm$ 1,1
Hidratos de carbono:proteínas	0,42 $\pm$ 0.1	1,92 $\pm$ 0.6	3,12 $\pm$ 1.2

Las s-EPS-N y s-EPS-P presentaron una mayor relación hidratos de carbono: proteínas (**Tabla 4.2**) como consecuencia de un aumento de los hidratos de carbono en los medios carenciados (véase **ítem 2.4.3**), junto con una disminución de casi 50 % en el contenido de proteínas.

4.1.3. Composición de monosacáridos

La **Tabla 4.3** muestra la composición de monosacáridos de las s-EPSc, s-EPS-N y s-EPS-P obtenida por CG y posterior confirmación de la identidad de los monosacáridos por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (CG-MS) utilizando los patrones correspondientes.

Tabla 4.3: Composición en monosacáridos (mol %) de las s-EPSc, s-EPS-N y s-EPS-P de *H. luciae*. Los porcentajes molares se expresan como media $\pm$ DS ($n=2$).

	s-EPSc	s-EPS-N	s-EPS-P
Ram	2 $\pm$ 0,8	17 $\pm$ 3,2	3 $\pm$ 1,3
Fuc	4 $\pm$ 1,4	16 $\pm$ 4,5	4 $\pm$ 0,6
Ara	2 $\pm$ 0,4	Tr	11 $\pm$ 0,6
Xil	8 $\pm$ 5,4	4 $\pm$ 2,4	4 $\pm$ 2,2
3-MeXil	10 $\pm$ 4,4	-	-
2,3-Me ₂ Xil	Tr	-	-
3,5-Me ₂ Xil	Tr	-	-
Man	7 $\pm$ 1,7	11 $\pm$ 2,1	12 $\pm$ 0,04
Gal	15 $\pm$ 2,8	34 $\pm$ 3,5	55 $\pm$ 2,9
Glc	52 $\pm$ 9,5	18 $\pm$ 2,8	11 $\pm$ 1,1

Abreviaturas: **Ram**= Ramnosa; **Fuc**= Fucosa; **Ara**= Arabinosa; **Xil**= Xilosa; **3-MeXil**= 3-*O*-metilxilosa; **2,3-Me₂Xil**= 2,3- di-*O*-metilxilosa; **3,5-Me₂Xil**= 3,5-di-*O*-metilxilosa; **Man**= Manosa; **Gal**= Galactosa; **Glc**= Glucosa; **tr**= traza (< 1 mol %).

La hidrólisis ácida de las s-EPSc de *H. luciae* rindió glucosa como el monosacárido más abundante, mientras que la galactosa fue el monosacárido mayoritario en los hidrolizados de las s-EPS-N y s-EPS-P. Consecuentemente, la relación galactosa: glucosa en los diferentes s-EPS fue 1:3,5 para el medio completo 1:0,5 y 1:0,2 para los medios carenciados en N y P, respectivamente. Conjuntamente con el aumento del porcentaje molar de galactosa en los medios carenciados, se observó mayor proporción de manosa, al mismo tiempo que un mayor contenido de ramnosa y fucosa en el s-EPS-N, y de arabinosa en el s-EPS-P.

Después del análisis de CG-MS, algunas señales del medio completo se identificaron como mono-y di-*O*-metil xilosas (3-*O*-metilxilosa, 2,3-di-*O*-

metilxilosa y la 3,5-di-*O*-metilxilosa). No se detectaron aminoazúcares en las s-EPS de ninguno los tres medios de cultivo.

4.1.4. Análisis por UV-MALDI-TOF MS de las s-EPS

El análisis de las s-EPS por MALDI-TOF MS reveló diferencias en los espectros de los productos obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo.

La matriz utilizada en los espectros de los s-EPS fue una mezcla de DHBA: SA (véase **Métodos experimentales, ítem 5.24**). El espectro de s-EPSc (**Figura 4.2**) exhibe intervalos de m/z de 162 unidades, consistente con residuos de hexosas en el rango molecular desde m/z 691,5 hasta 2960,4.

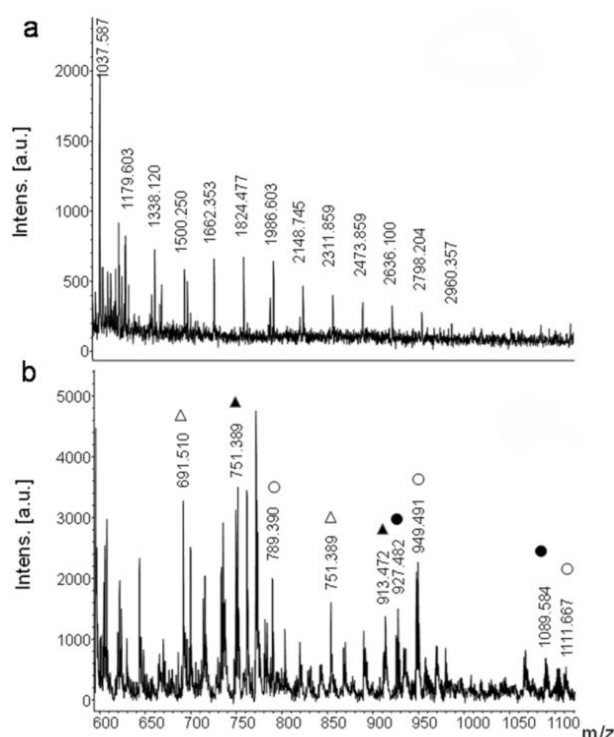


Figura 4.2: Espectro de masa MALDI de las s-EPSc liberadas por *H. luciae*. **a)** Señales detectadas correspondientes a hexosas en rangos moleculares m/z altos (m/z 1.037,6–2.960,4); **b)** Señales detectadas correspondientes a hexosas en rangos moleculares m/z bajos (m/z 691,5–1111,7), los intervalos de m/z 162 son indicados con triángulos y círculos blancos y negros.

Los espectros de MALDI de las s-EPS-N (**Figura 4.3**) presentan solamente dos señales en la región de mayores pesos moleculares (m/z 1806,5 y 1968,6) con intervalos de m/z 162 (**Figura 4.3** recuadro). En la zona de pesos moleculares más bajos (región de m/z 605,8-1002,3) aparecen algunos intervalos de m/z 132 y m/z 146, consistentes con residuos de pentosas y de desoxihexosas, respectivamente (**Figura 4.3**).

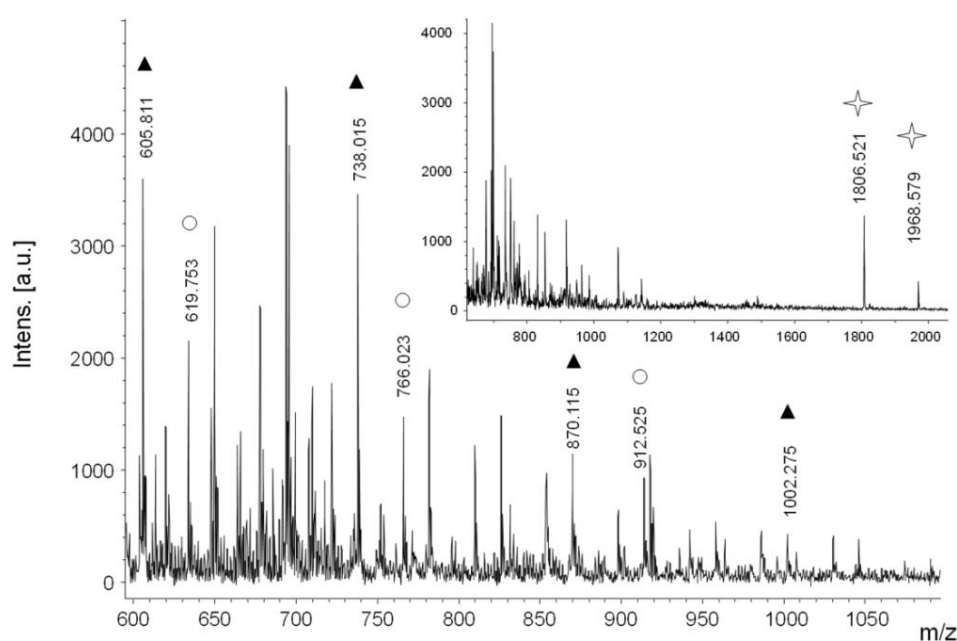


Figura 4.3: Espectro de masa MALDI de las s-EPS-N liberadas por *H. luciae*. Se detectaron en el rango m/z de bajo peso molecular (605,8-1002,3) las fracciones que contienen pentosas y desoxi hexosas. En el recuadro se observan las señales de hexosas detectadas en un rango m/z molecular alto (1806,5-1968,6). Se marcan los intervalos de m/z 132 (triángulos negros), 146 (círculos blancos) y 162 (estrellas blancas).

En el caso del espectro de las s-EPS-P se detectaron tres señales de mayor intensidad en m/z 1053,4, 1175,8 y 1191,8 (**Figura 4.4**). A diferencia de los

espectros de la **Figura 4.2** y **4.3**, no se detectaron intervalos correspondientes a residuos de pentosa ni de hexosa.

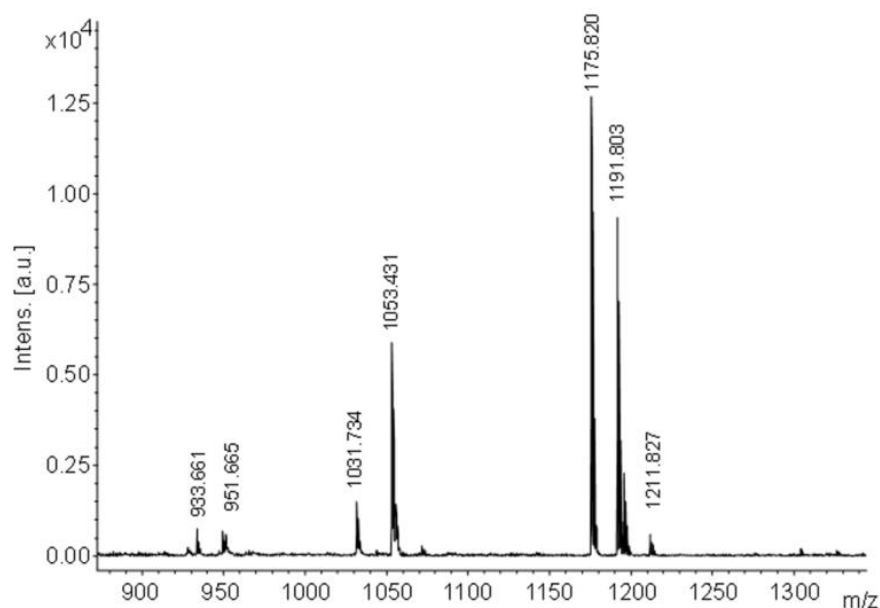


Figura 4.4: Espectro de masa MALDI de las s-EPS-P liberadas por *H. luciae*.

4.2. Análisis de las extracciones acuosas a partir de células de *H. luciae*

4.2.1. Cromatografía de permeación en gel

Los extractos acuosos obtenidos por extracción secuencial a temperatura ambiente (RTW) y a 100 °C (W 100.1) (véase **Métodos experimentales, ítem 5.16.2**) de células cultivadas en el medio completo *f/2*, fueron desalados utilizando la cromatografía de permeación en gel (**Figura 4.5**).

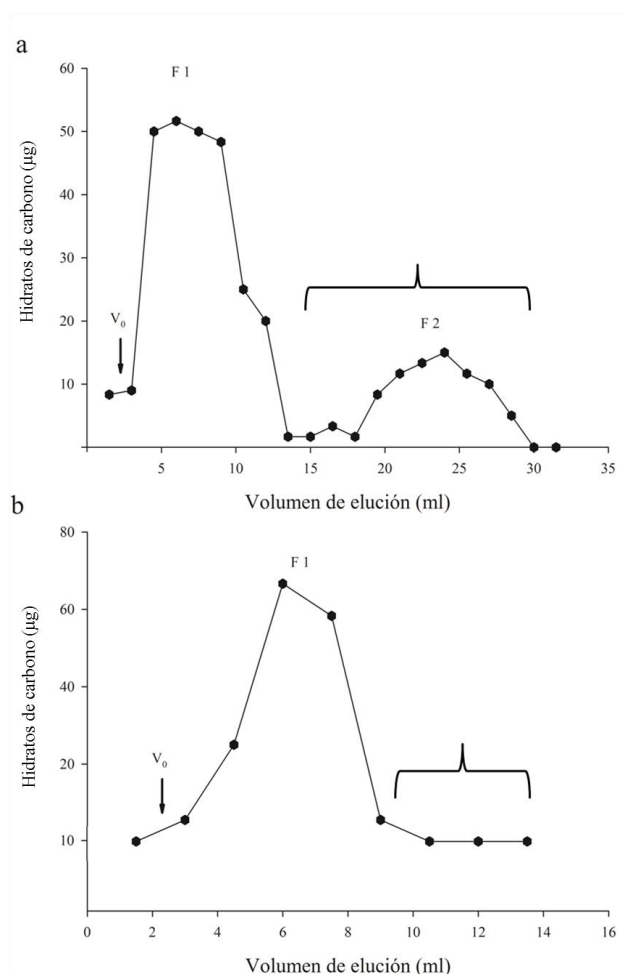


Figura 4.5: Perfil de elución de **(a)** RTW en columna empacada con Bio-Gel P-2 y **(b)** W 100.1 en Sephadex G-10. La llave indica el rango de ml donde se detectaron sales. La flecha indica el V_0 .

El análisis de las fracciones provenientes de la cromatografía de permeación en geles se resume en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.4: Análisis de las fracciones RTW y W 100.1 obtenidas por cromatografía de permeación en geles con una columna empacada con Bio-Gel P-2 para RTW y Sephadex G-10 para W 100.1.

	Fracción	Rendimiento (mg/100 mg totales)	Hidratos de carbono (%)
RTW	F1	11,5	3,1
	F2	41,3	0,9
W 100.1	F1	7,4	6,9

Si se tiene en cuenta el rendimiento en masa en el producto RTW, la fracción F2 presenta el mayor rendimiento, relacionado con la contaminación con sales (**Figura 4.5a, Tabla 4.4**). Por otro lado, en la fracción de mayor peso molecular (F1) se presentó un mayor porcentaje de hidratos de carbono respecto a la de menor peso molecular (F2) (**Tabla 4.4**).

La cromatografía de permeación en gel de W 100.1 sólo resolvió una única fracción positiva para hidratos de carbono (**Figura 4.5b**) con un porcentaje de alrededor de 7 % (**Tabla 4.4**).

Para las determinaciones subsiguientes se utilizaron la fracción F1 de RTW y el producto W 100.1 sin fraccionar.

Debido al bajo rendimiento obtenido luego de desalar las muestras RTW y W 100.1, el extracto W 100.2 no fue sometido a este proceso (véase **Métodos experimentales, Figura 5.7**).

4.2.2. Composición de monosacáridos

La composición de monosacáridos del extracto acuoso RTW (**Tabla 4.5**) presentó un contenido mayoritario de glucosa seguido de pequeños porcentajes molares de galactosa, fucosa y manosa.

En el caso de W 100.1 se observó un incremento en el porcentaje molar de fucosa y galactosa, y una disminución del de glucosa. Esta tendencia se repite y acentúa en W 100.2, donde el porcentaje molar de glucosa se reduce aproximadamente tres veces respecto del de la fracción RTW.

Tabla 4.5: Monosacáridos constituyentes (mol %) de los extractos acuosos obtenidos de células de *H. luciae* cultivadas en medio *f/2*. Los datos se expresan como media $\pm$ DS ($n=2$). Se indica con **tr** a trazas (< 1 mol %).

	RTW	W 100.1	W 100.2
Ram	Tr	$4 \pm 0,5$	$6 \pm 0,6$
Fuc	$8 \pm 0,5$	$26 \pm 2,1$	$28 \pm 1,4$
Ara	Tr	-	$6 \pm 0,6$
Xil	$4 \pm 0,9$	$3 \pm 0,5$	$8 \pm 0,2$
Man	$7 \pm 2,2$	$9 \pm 2,4$	$11 \pm 1,4$
Gal	$15 \pm 1,5$	$21 \pm 0,6$	$21 \pm 1,1$
Glc	$66 \pm 3,1$	$37 \pm 0,3$	$20 \pm 0,1$

4.2.3. Análisis por UV-MALDI-TOF MS de los extractos acuosos

Los extractos RTW y W 100.1 fueron analizados por MALDI MS (véase **Métodos experimentales, ítem 5.24.1**) utilizando como matriz una mezcla de DHBA: SA (**Figura 4.6**).

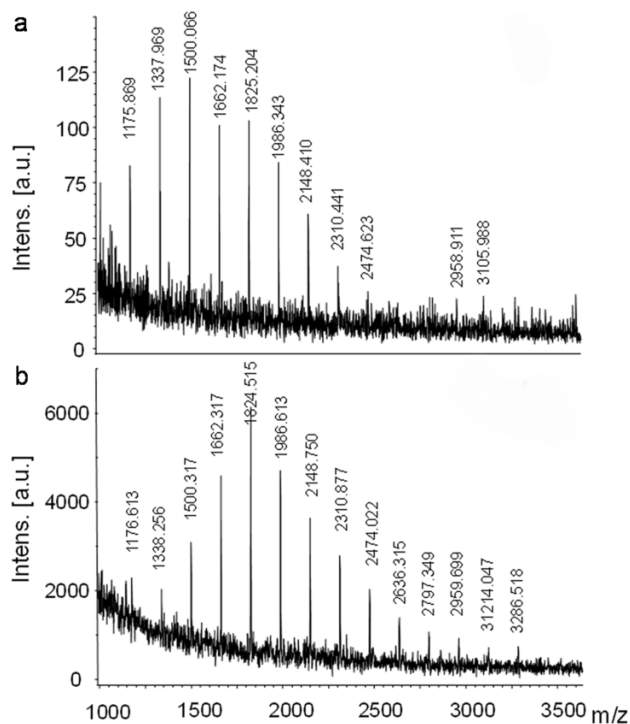


Figura 4.6: Espectro de MALDI de los extractos **(a)** RTW y **(b)** W 100.1 obtenidos a partir de células de *H. luciae* cultivadas en medio *f/2*.

En ambos espectros se detectaron únicamente intervalos de m/z 162 consistentes con residuos de hexosas (**Figura 4.6**) en el rango molecular de m/z 1175,9-3106,0 para RTW y de 1176,6-3286,5 para W 100.1.

Teniendo en cuenta que RTW estaba compuesto mayoritariamente por glucosa, se puede asumir que, aunque la espectrometría de masa MALDI-TOF no permite identificar monosacáridos, los intervalos de m/z 162 sugieren el perfil de un glucano.

El grado de polimerización (DP), el $\bar{M}_n$ y el $\bar{M}_w$ fueron calculados para los extractos acuosos RTW y W 100.1 (**Tabla 4.6**).

Tabla 4.6: Pesos moleculares promedio obtenidos por MALDI MS de los extractos RTW y W 100.1 de *H. luciae* cultivada en medio $f/2$.

	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$DP_{\max}^a$	DP_n^b	DP_{rango}
RTW	1769	1893	9	13	7-19
W 100.1	2255	2120	11	14	7-20

^a DP correspondiente al ion más abundante.

^b DP promedio calculado considerando todos los iones observados.

4.2.4. Análisis estructural de RTW por metilación

A fin de confirmar la presencia de un glucano en RTW, se llevó a cabo el análisis estructural por metilación (**Tabla 4.7**).

Cabe destacar que la crisolaminarina, el glucano de reserva de las diatomeas, es soluble en agua.

Tabla 4.7: Composición de monosacáridos (mol %) de los productos RTW-m1 y RTW-m2 producidos por metilación y posterior hidrólisis del extracto F1_{RTW} de *H.luciae*. Los datos se expresan como media $\pm$ DS ($n=2$).

Monosacárido	Unión glicosídica deducida	RTW-m1	RTW-m2
2,3,4,6-Me ₄ Glc	Terminal	22,2 $\pm$ 1,1	21,8 $\pm$ 1,4
2,4,6-Me ₃ Glc	1 $\rightarrow$ 3	22,7 $\pm$ 0,5	47,4 $\pm$ 3,9
4,6-Me ₂ Glc	1 $\rightarrow$ 3	10,2 $\pm$ 1,8	10,4 $\pm$ 1,7
	2-substituido		
2,4-Me ₂ Glc	1 $\rightarrow$ 3	8,3 $\pm$ 2,2	12,7 $\pm$ 2,3
	6- substituido		
Glc		36,4 $\pm$ 2,3	8,5 $\pm$ 2,9

Abreviaturas: **2,4-Me₂Glc**=1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-2,4-di-*O*-metilglucitol; **4,6-Me₂Glc**= 1,2,3,5-tetra-*O*-acetil-4,6-di-*O*-metilglucitol; **2,4,6-Me₃Glc** = 1,3,5-tri-*O*-acetil-2,4,6-tri-*O*-metilglucitol; **2,3,4,6-Me₄Glc**=1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucitol.

El análisis por metilación confirmó la presencia de un (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucano con ramificación en C-6 y en C-2 (**Tabla 4.7**). La disminución sustancial del porcentaje molar de glucosa no metilada en un primer paso de metilación (RTW-m1) (de 36 a 8 %) sólo fue posible luego de un segundo paso de metilación (RTW-m2).

Ante el bajo rendimiento obtenido luego de este segundo paso de metilación (10,5 mg), se optó por no continuar con un tercer intento de metilación. La relación de la glucosa terminal tetrametilada de RTW-m2 (21,8 %) con respecto al resto de las unidades (78,2 %) indica que la cadena principal de glucano está sustituida aproximadamente cada cuatro residuos, con una relación de 4,6-Me₂Glc:2,4-Me₂Glc cercana 1:1. El grado de ramificación (*DB*) obtenido fue de aproximadamente 0,28.

4.3. Análisis de las células de *H. luciae*

4.3.1. Composición de hidratos de carbono y proteínas

El contenido de proteínas e hidratos de carbono totales de las células de *H. luciae* cultivadas en medio *f*/2, *f*/2-N y *f*/2-P fue analizado cosechando las células los días 5, 10, 15, 25 y 35 correspondientes a las distintas fases de crecimiento (véase **Métodos experimentales**, ítems 5.19 y 5.20).

En cuanto a los hidratos de carbono totales, se observó un aumento significativo en los cultivos carenciados respecto del control en la exponencial tardía (**Figura 4.7**).

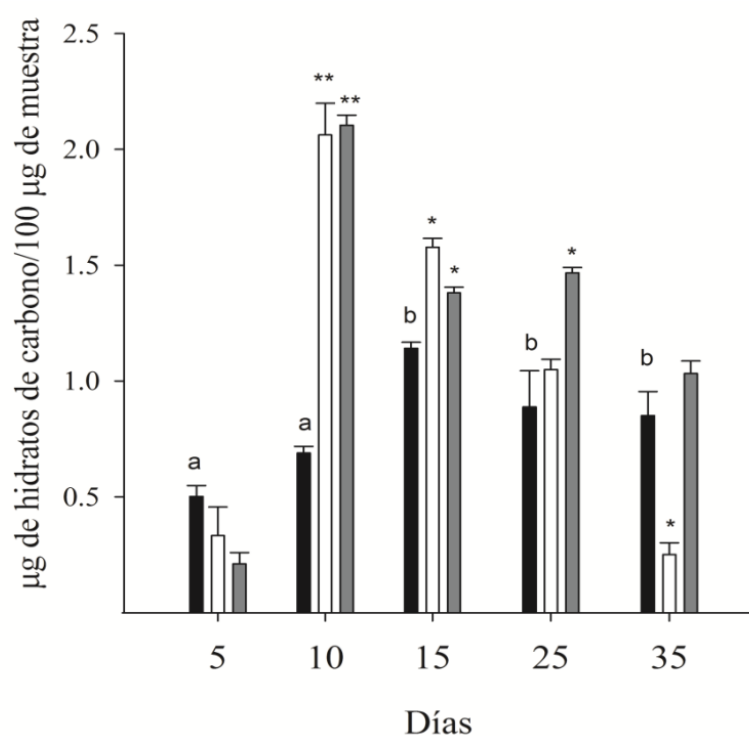


Figura 4.7: Hidratos de carbono de células *H. luciae* crecidas en medio *f*/2 (negro), *f*/2-N (blanco) y *f*/2-P (gris). Los asteriscos indican diferencias significativas (un asterisco, $P < 0,05$; dos asteriscos, $P < 0,01$) respecto del control para cada día. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en la composición de hidratos de carbono de las células cultivadas en medio *f*/2 entre los distintos días.

Luego de un pico máximo a los 10 días de cultivo (tanto para $f/2$ -N como para $f/2$ -P), se detectó una reducción en el contenido de hidratos de carbono con el tiempo, sobre todo en las células cultivadas en $f/2$ -N.

En el caso de las células cultivadas en el medio completo, el contenido máximo de hidratos de carbono fue registrado a partir de la fase estacionaria tardía (días 15-35) ($P > 0,05$) (**Figura 4.7**).

Las células de los medios $f/2$ -N y $f/2$ -P muestran una relación hidratos de carbono: proteínas significativamente mayor a partir de la fase exponencial tardía hasta la estacionaria tardía respecto del medio completo (**Figura 4.8**), como consecuencia de una disminución en el contenido de proteínas de los medios carenciados respecto del medio completo, siendo de 3-17 veces menor para $f/2$ -N y de 3-6 veces menor para $f/2$ -P. En el control esta relación se mantiene prácticamente constante, excepto por una pequeña disminución a los 10 días.

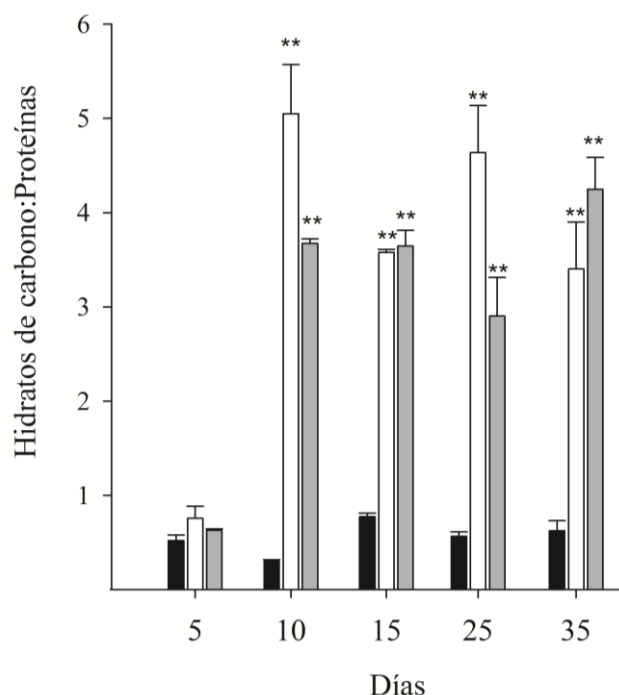


Figura 4.8: Relación hidratos de carbono: proteínas en células *H. luciae* crecidas en medio $f/2$ (negro), $f/2$ -N (blanco) y $f/2$ -P (gris). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,01$) respecto del control para cada día.

4.3.2. Monosacáridos componentes de las células hidrolizadas

En la **Tabla 4.8.** se indica la composición de monosacáridos de las células hidrolizadas (véase **Métodos experimentales, ítem 5.21.1**) luego de ser cultivadas durante 10, 20 y 30 días en medio *f/2*, y 10 días en medio *f/2-N* y *f/2-P*.

Tabla 4.8: Composición de monosacáridos (% molar) de los extractos obtenidos de la hidrólisis de las células de *H.luciae* cultivadas en medio *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P*. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto de *f/2*_{10d}. Los datos se expresan como media $\pm$ DS ($n=3$). Se indica con **tr** a trazas (< 1 mol %).

Monosacárido	<i>f/2</i> _{10d} ^a	<i>f/2</i> _{20d} ^b	<i>f/2</i> _{30d} ^c	<i>f/2-N</i> ^d	<i>f/2-P</i> ^d
Ram	2,1 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,4	Tr	2,1 $\pm$ 1,4
Fuc	15,2 $\pm$ 1,3	11,5 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 1,6	2,2 $\pm$ 0,1*	2,5 $\pm$ 0,9*
Ara	tr	-	-	Tr	-
Xil	tr	1,9 $\pm$ 1,2	-	Tr	17,5 $\pm$ 2,3*
Man	3,2 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 1,5	Tr	8,9 $\pm$ 4,1
Gal	34,6 $\pm$ 1,1	21,5 $\pm$ 0,4*	16,1 $\pm$ 0,1*	2,9 $\pm$ 0,9*	6,2 $\pm$ 0,5*
Glc	43,9 $\pm$ 0,8	58,9 $\pm$ 0,9*	62,5 $\pm$ 0,5*	94,9 $\pm$ 0,3*	62,8 $\pm$ 1,3*

^aCélulas cultivadas en medio *f/2* y cosechadas el día 10.

^bCélulas cultivadas en medio *f/2* y cosechadas el día 20.

^cCélulas cultivadas en medio *f/2* y cosechadas el día 30.

^dCélulas cosechadas en el día 10.

Para el mismo tiempo de cosecha (10 días), se detectaron porcentajes molares significativamente mayores ($P < 0,05$) de glucosa y menores ($P < 0,05$) de galactosa y fucosa en las células crecidas en los medios *f/2-P* y *f/2-N* con respecto a las cultivadas en el medio *f/2*_{10d} (**Tabla 4.8**). El porcentaje molar de la xilosa fue mayor ($P < 0,05$) en las células de medio *f/2-P* respecto de los otros dos medios, que solo exhibieron trazas de este monosacárido. En el caso de las células *f/2*_{20d} y

$f/2_{30d}$, se observó un incremento significativo ($P < 0,05$) en el porcentaje molar de glucosa y una disminución significativa ($P < 0,05$) en el de galactosa cuando se comparó con células $f/2_{10d}$ (Tabla 4.8).

4.3.3. Análisis por UV-MALDI-TOF MS de las células enteras

Para el estudio de los efectos de la carencia de macro nutrientes sobre los perfiles de polisacáridos se realizó el análisis por espectrometría de masa MALDI de las células de *H. luciae* crecidas durante 15 días en medio $f/2$, $f/2$ -N y $f/2$ -P (Figura 4.9). La matriz utilizada fue CHCA.

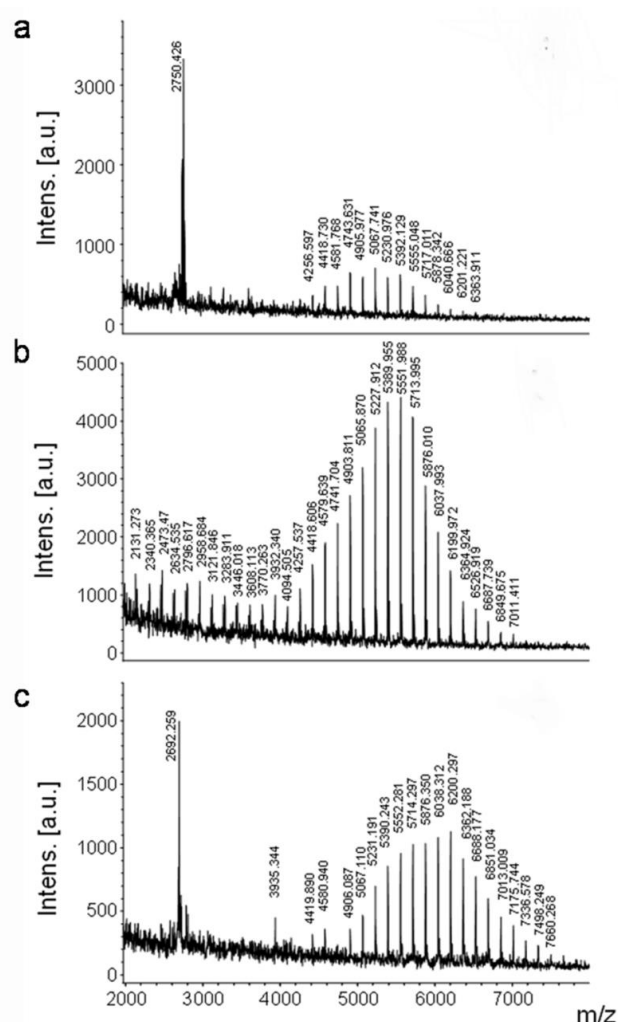


Figura 4.9: Espectro de MALDI de las células de *H. luciae* cultivadas 15 días en diferentes medios de cultivo. **(a)** $f/2$ (control), **(b)** $f/2$ -N y **(c)** $f/2$ -P.

En todos los medios de cultivo, los espectros de MALDI de las células presentaron intervalos de m/z 162 (**Figura 4.9**). Las células que crecieron en medio completo exhibieron señales en el rango molecular de m/z 4256,6-6363,9 (**Figura 4.9a**). En las células crecidas en $f/2$ -N se detectó la mayor abundancia de señales en el rango de m/z 2473,5-7011,4 (**Figura 4.9b**), mientras que las células $f/2$ -P presentaron señales en el rango m/z 4906,1-7660,3 (**Figura 4.9c**).

Tabla 4.9: Pesos moleculares promedio obtenidos por espectrometría de masa MALDI de células de *H. luciae* cultivadas en distintos medios de cultivo y cosechadas a diferentes tiempos creciendo en medio $f/2$.

	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$DP_{\max}^c$	DP_n^d	DP_{rango}
Medio de cultivo ^a					
$f/2$	5192	5243	32	32	26-38
$f/2$ -N	4921	5062	34	30	15-43
$f/2$ -P	5983	6073	38	38	27-47
Edad de cultivo ^b					
5	3936	4223	19	27	14-38
10	4666	4931	32	29	15-40
15	4703	5104	32	29	13-42
25	5187	5267	32	32	23-41
35	4973	5221	32	30	14-44

^a Las células de *H. luciae* crecieron durante 15 días.

^b Células cultivadas en medio $f/2$.

^c Grado de polimerización (DP) correspondiente al ion más abundante.

^d DP = promedio considerando todos los iones observados respecto del promedio pesado.

El $\overline{M}_n$ y el $\overline{M}_w$ de los polisacáridos de las células del medio completo fue menor respecto a aquellas crecidas en medio *f*/2-P y similar al de *f*/2-N (**Tabla 4.9**).

La abundancia relativa de los iones observados en el espectro de MALDI señaló que el perfil de los polisacáridos sobre todo del medio *f*/2-P se desplaza hacia pesos moleculares mayores respecto al perfil obtenido para células de medio completo, indicando un mayor grado de polimerización (*DP*) para este medio. Los resultados indicaron una variación más pequeña para *f*/2-N luego de 15 días de cultivo respecto del medio completo (**Figura 4.10**).

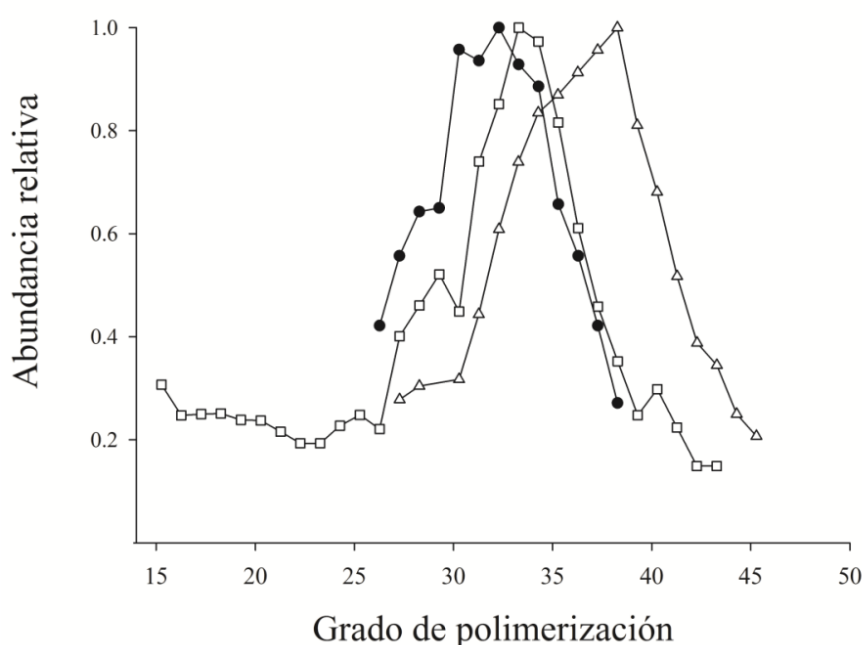


Figura 4.10: Distribución del grado de polimerización de los polímeros de las células de *H. luciae* cultivada en medio *f*/2 (círculos negros), *f*/2-N (cuadrados blancos) y *f*/2-P (triángulos blancos). Para el cálculo de la abundancia relativa se representó como unidad al ion de mayor intensidad.

Es interesante destacar que la proporción de oligómeros de bajo peso molecular en el medio *f*/2-N es mayor que en el control y en *f*/2-P (**Figura 4.10**), dando un rango de *DP* de 15-43 (**Tabla 4.9**).

Como el envejecimiento de los cultivos acompaña al agotamiento de los nutrientes, se hicieron paralelamente experiencias utilizando células cultivadas en medio completo $f/2$ cosechadas a diferentes tiempos finales (**Figura 4.11**).

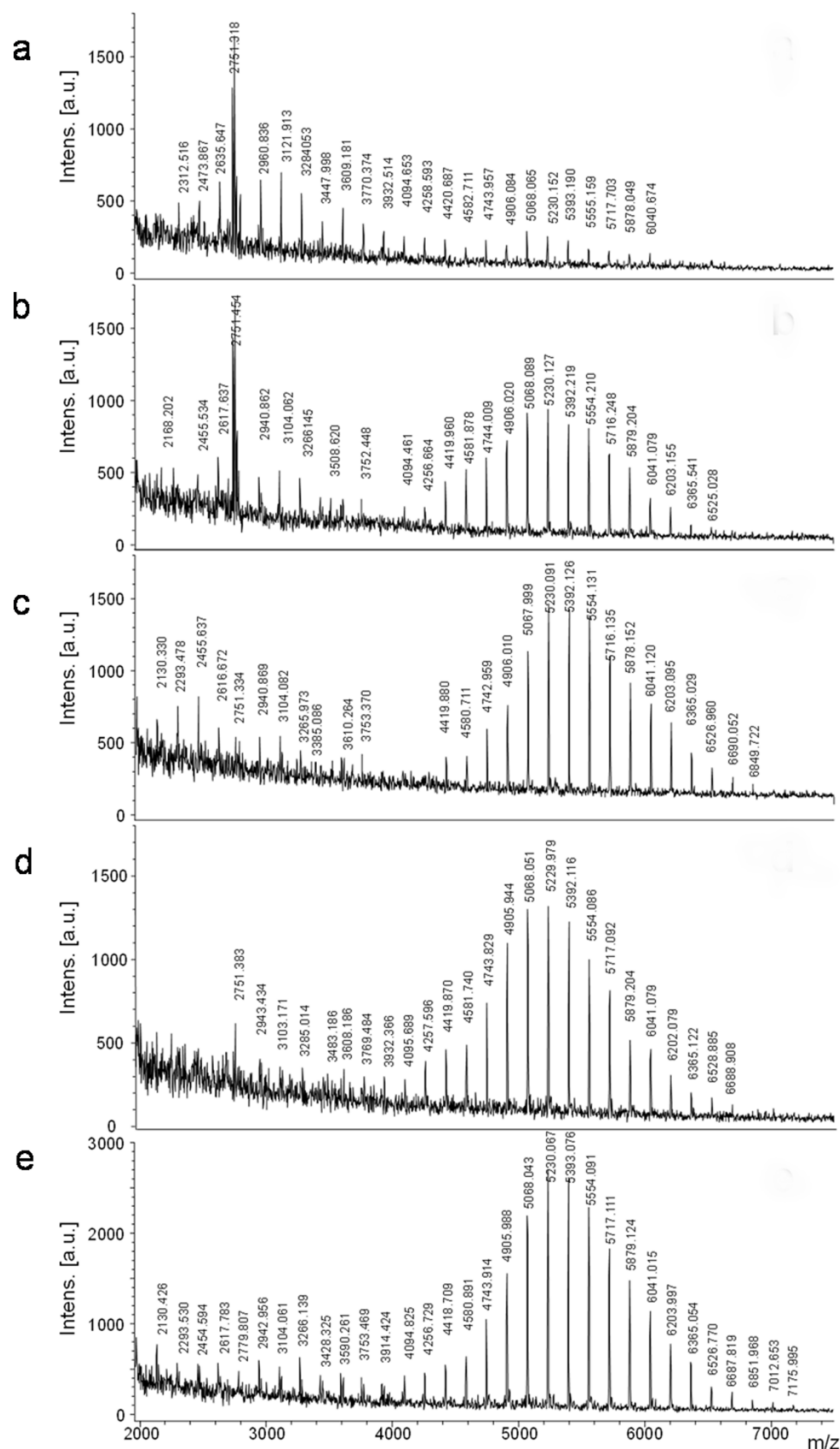


Figura 4.11: Espectro de MALDI de las células de *H. luciae* crecidas en medio $f/2$ y cosechadas a (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 25 y (e) 35 días.

Los análisis de MALDI-TOF de las células muestran en todos los casos intervalos de m/z de 162 unidades (**Figura 4.11**). La matriz utilizada fue SA (véase **Métodos experimentales, ítem 5.24**).

En el día 5 (fase exponencial temprana) se detectaron dos distribuciones de señales, una correspondiente a oligómeros de bajo peso molecular con m/z 2312,5-4420,7 y la otra, a oligómeros de mayor peso molecular con m/z 4582,7-6040,7 (**Figura 4.11a**), con mayor intensidad de los iones dentro del primer grupo. En el día 10 (fase exponencial tardía) también se observaron estos dos grupos de señales, pero la señal de mayor intensidad correspondía a oligómeros de mayor peso molecular con m/z 4094,5-6525,0 (**Figura 4.11b**). Los días 15 (fase estacionaria temprana), 25 y 35 (fase estacionaria tardía) presentaron una campana con predominio de señales correspondientes a oligómeros de mayor peso molecular (día 15: m/z 4419,8-6849,7; día 25: m/z 3769,5-6688,9; día 35: m/z 2130,4-7176,0) (**Figura 4.11c-e**).

En células cosechadas a los 5 y 10 días se observaron señales de elevada intensidad de m/z 2751,3 y 2751,5, respectivamente (**Figura 4.11a-b**), disminuyendo a medida que aumentaba la edad de cultivo.

La **Tabla 4.9** muestra el desplazamiento gradual del perfil hacia mayores pesos moleculares a medida que las células se encontraban en fases más avanzadas de crecimiento.

El gráfico de la **Figura 4.12** evidencia que la bimodalidad del espectro va desdibujándose gradualmente hasta finalmente desaparecer después del día 15.

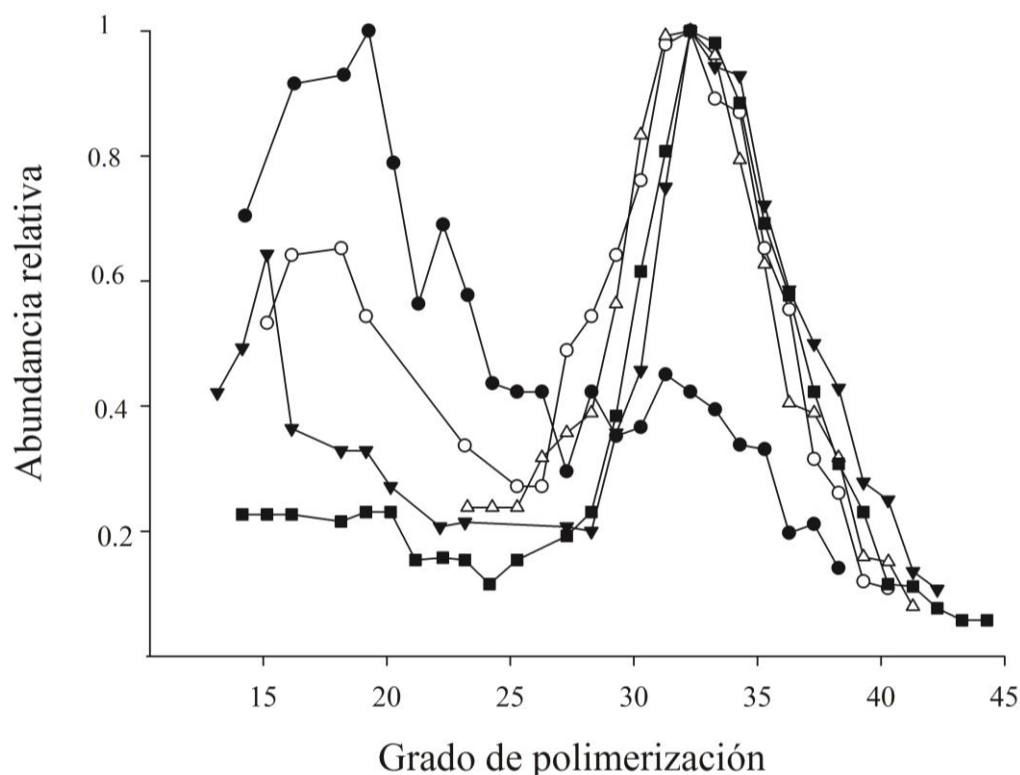


Figura 4.12: Distribución del grado de polimerización de los polímeros de las células de *H. luciae* cultivadas 5 (círculos negros), 10 (círculos blancos), 15 (triángulos negros), 25 (triángulos blancos) y 35 (cuadrados negros) días. La abundancia relativa se basó en el polímero que presentaba el ion de mayor intensidad, representado como una unidad en la curva.

4.3.4. Monosacáridos componentes y análisis por UV-MALDI-TOF MS de células congeladas

La **Figura 4.13** muestra el espectro de masa UV-MALDI-TOF de células cultivadas en el medio completo, cosechadas a los 15 días, luego congeladas y liofilizadas.

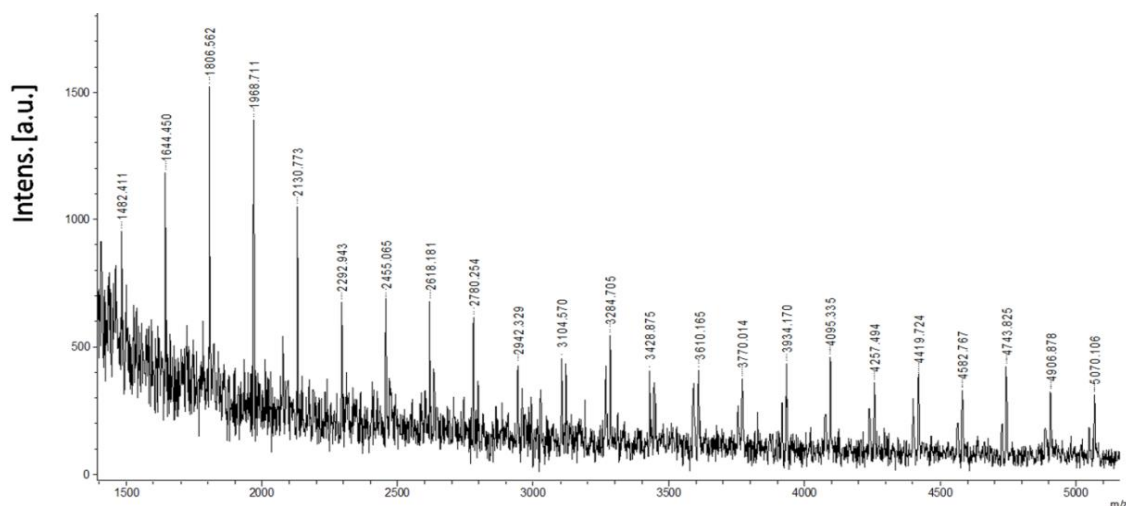


Figura 4.13: Espectro de MALDI de las células de *H. luciae* congeladas y liofilizadas crecidas en medio *f/2* y cosechadas a los 15 días. Matriz: mezcla de DHBA:CHCA.

Al igual que en los espectros de las células frescas de 15 días, se observaron intervalos de m/z de 162 (**Figura 4.13**). En las células congeladas aparecieron oligómeros de menor peso molecular con m/z 1482,4-5070,1 con DP_n de 20 y DP_{rango} de 9-31. A su vez, los valores de $\bar{M}_n$ y $\bar{M}_w$ fueron 2728,7 y 3132,4 respectivamente, menores que los correspondientes a las células frescas (**Tabla 4.9**).

Debido a la diferencia en DP , $\bar{M}_n$ y $\bar{M}_w$ de los perfiles de MALDI de las células congeladas respecto de las células sin congelar, el análisis de la composición de monosacáridos fue fundamental para corroborar la presencia de oligómeros provenientes de la crisolaminarina (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10: Composición de monosacáridos (% molar) de la hidrólisis de las células congeladas de *H. luciae* cultivadas en medio *f/2*. Los contenidos se expresan como media $\pm$ DS ($n=3$). Se indica **tr** para trazas (< 1 mol %).

	% molar
Ram	1,5 $\pm$ 0,4
Fuc	29,1 $\pm$ 0,6
Ara	tr
Xil	4,6 $\pm$ 0,4
Man	12,4 $\pm$ 1,8
Gal	28,7 $\pm$ 4,1
Glc	23,7 $\pm$ 1,8

A partir del análisis de composición de monosacáridos realizado sobre células congeladas se corroboró una mayor abundancia de fucosa, galactosa y manosa. Esta composición fue diferente a la realizada sobre las células frescas (**Tabla 4.8**), donde la glucosa fue el monosacárido dominante, revelando que el material hidrolizado incluiría monómeros de polisacáridos de los frústulos junto con oligómeros de crisolaminarina.

4.3.5. Detección de (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucanos con azul de anilina

Células crecidas durante 10 días en medio *f/2* y *f/2-P* exhiben una franja de fluorescencia en las bandas del cingulo cuando se tiñen con azul de anilina (**Figura 4.14**), indicador de la presencia de calosa. En los medios carenciados se detectaron vesículas fluorescentes de (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucanos, que dada su ubicación intracelular se asignaron a vacuolas de crisolaminarina (**Figura 4.14 a-b**). Se observó autofluorescencia de la clorofila con excitación en el azul las células cultivadas en los distintos medios (**Figura 4.14 c-d**).

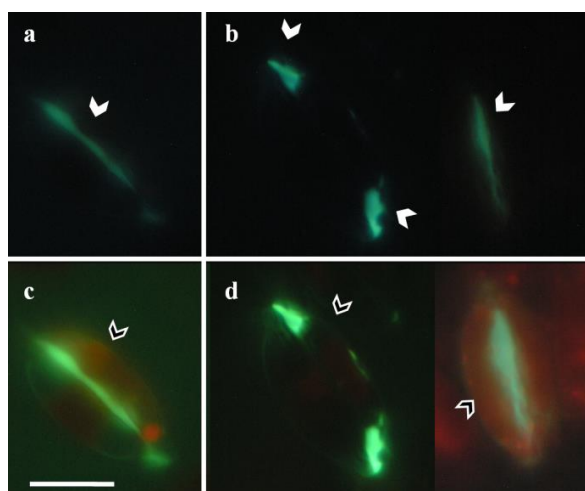


Figura 4.14: Células de *H. luciae* cultivadas durante 10 días en medio *f/2* (**a** y **c**) y *f/2-P* (**b** y **d**) teñidas con azul de anilina. **a-b**) Imágenes con fluorescencia con filtro UV indican la presencia de un (1→3)-β-D-glucano (flechas blancas) y **c-d**) con filtro azul donde se ve la autofluorescencia de la clorofila (flechas negras). Escala= 10 μm.

En las células cultivadas durante **20 días** aparecieron vacuolas fluorescentes de (1→3)-β-D-glucano en los tres medios de cultivo (**Figura 4.15**).

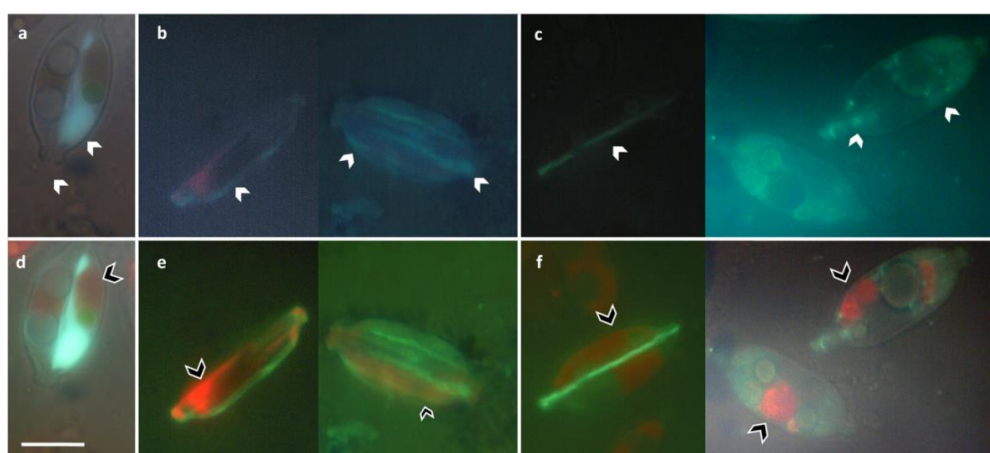


Figura 4.15: Células de *H. luciae* cultivadas durante 20 días en medio *f/2* (**a** y **d**), *f/2-P* (**b** y **e**) y *f/2-N* (**c** y **f**) y teñidas con azul de anilina. **a-c**) Imágenes de fluorescencia con filtro UV indican la presencia de un (1→3)-β-D-glucano (flechas blancas) y **d-f**) con filtro azul se observa la autofluorescencia de la clorofila (flechas negras). Escala= 10 μm.

En el control se observó una vacuola de gran tamaño mientras que en los medios carenciados aparecieron varias vacuolas pequeñas, principalmente en el medio *f/2-N* (**Figura 4.15**). También se detectó fluorescencia en las bandas del cíngulo en los medios carenciados (**Figura 4.15 b y c**).

4.4. Análisis de proteínas totales por electroforesis SDS-PAGE

4.4.1. Obtención de los extractos proteicos

Los extractos proteicos fueron obtenidos a partir de células de *H. luciae* cultivadas durante 10 días en medio *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N*. Las extracciones que se realizaron con SDS 2 % (véase **Métodos experimentales, ítem 5.25**) fueron sometidas al análisis de proteínas y de hidratos de carbono (**Tabla 4.11**). Los extractos obtenidos de los medios *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P* se denominaron **SDS_C**, **SDS_N** y **SDS_P**, respectivamente

Tabla 4.11: Contenido de proteínas e hidratos de carbono ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ totales) de los extractos obtenidos a partir de la solubilización en SDS 2 %.

	SDS _C	SDS _P	SDS _N
Proteínas	37,8 $\pm$ 0,16	13,5 $\pm$ 0,57	7,78 $\pm$ 0,53
Hidratos de carbono	26,1 $\pm$ 1,2	36,6 $\pm$ 0,87	48,6 $\pm$ 1,02

4.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de los productos extraídos con SDS 2 %, dieron como resultado varias bandas (**Figura 4.16**). El volumen de siembra de los extractos con SDS 2 % fue de 10 μl .

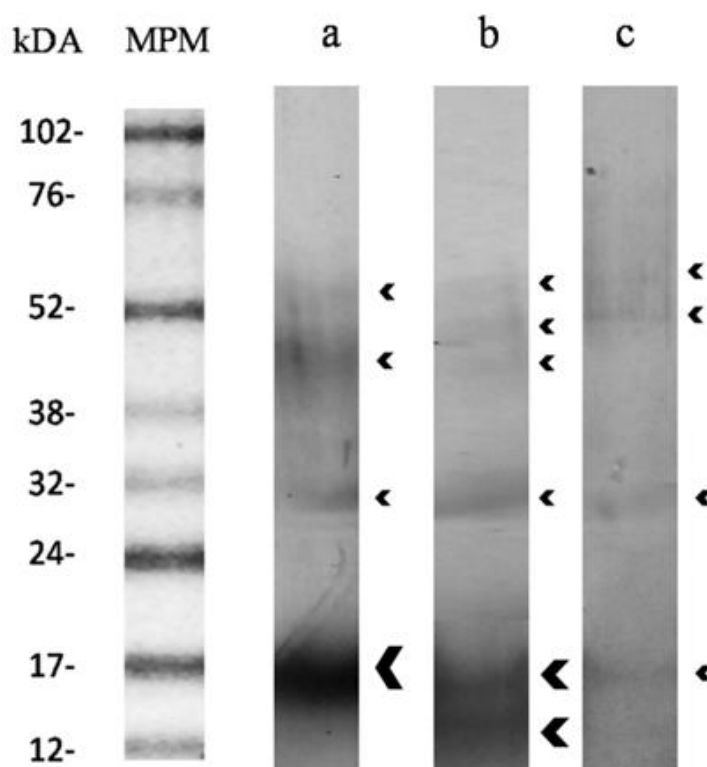


Figura 4.16: Análisis de las proteínas de *H. luciae* por SDS-PAGE 10 %. Los marcadores de peso molecular (MPM) se observan en la primera columna. Las proteínas de los extractos SDS_c (**a**), SDS_{-p} (**b**) y SDS_{-N} (**c**). Las bandas de proteínas fueron visualizadas con la tinción de nitrato de plata.

Las bandas obtenidas en los tres extractos fueron numerosas y similares entre sí (**Figura 4.16**). En el caso de SDS_{-N} se observó una menor intensidad de las bandas respecto a las obtenidas para SDS_c y SDS_{-p}.

4.4.3. Análisis por HPLC-ESI de proteínas totales

La caracterización de proteínas de los extractos obtenidos SDS_c, SDS_{-p} y SDS_{-N} fue realizada por HPLC-ESI. Cada uno de los extractos fueron digeridos previamente con tripsina (véase **Métodos experimentales, ítem 5.27**) y analizados por un nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa ESI.

Para SDS_C, SDS_P y SDS_N fueron realizados respectivamente un promedio de 28400, 24900 y 25200 espectros de masa, donde hubo coincidencia entre los péptidos obtenidos luego del corte con tripsina y las proteínas correspondientes con un alto nivel de confiabilidad.

La información brindada por el programa Proteome Discoverer para cada proteína encontrada se indica en la **Tabla 4.12**.

Tabla 4.12: Ejemplo de algunos de los parámetros presentados por el Proteome Discover para una proteína. El cuadro inferior muestra las secuencias de péptidos encontrados en la muestra que coinciden con la proteína en cuestión.

Código	Descripción	Nº de péptidos	Nº de péptidos únicos	Nº de PSM	Nº AA*	MW (kDa)*	pI*	Score Seq. HT
A0T0F1	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic= <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (strain CCAP 1055/1)	5	2	71	505	54,6	5,2	249,6

Confianza	Secuencia	Modificación	Nº de PSM	Nº de proteínas	MH ⁺ (Da)*
High	VYGLDQVMSELLEFED	1 Oxidación	2	3	2087,9
High	VDNIGTVLQVGDGIAR		1	2	1626,8
High	EAYPGDVLYLHSLR		3	7	1553,7
High	VGSAAQTKAMKK		1	1	1219,6
High	ATLIVYDDLTK		2	2	1251,6

*Valores teóricos

Al comparar las secuencias peptídicas de alto nivel de confianza con la base de datos de diatomeas del programa Proteome Discoverer y Uniprot (UP), se

asignaron un total de 371 (SDSc), 141 (SDS_p) y 100 (SDS_N) proteínas. En la **Tabla 4.13** se detallan las proteínas correspondientes a SDSc.

Las proteínas asignadas se agruparon teniendo en cuenta su ubicación en los distintos compartimentos celulares y su función en las diferentes vías metabólicas identificadas.

Además se detectó la presencia de proteínas que al momento de la escritura de esta tesis están clasificadas como proteínas “sin caracterizar” (*Uncharacterized*) y “predichas” (*Predicted*) (véase **Métodos experimentales, ítem 5.27.3**). Estas sumaron un total de total de 70 para SDSc, 31 para SDS_p y 20 para SDS_N.

Tabla 4.13: Proteínas de *H. luciae* obtenidas luego del tratamiento con SDS 2 % del medio completo. Todas las proteínas son reportadas con su nombre, identificador del programa UP (UP Id), compartimento celular donde se ubica y función.

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
FOTOSÍNTESIS Y FIJACIÓN DEL CARBONO			
a. Complejo antena			
Proteína –Fucoxantina-clorofila a/c (FCP)	B7FRW2/ <i>Lhcf4</i>	Cloroplasto, tk	Complejo antena periférico
	B7G955/ <i>Lhcf9</i>		
	B7GBK6/ <i>Lhcf11</i>		
	B7G871/ <i>Lhcf13</i>		
	B8BUU4/ <i>Lhca2</i>		
	B7FSP4/ <i>Lhcr3</i>		Complejo antena del FSI
	B7FQE0/ <i>Lhcr12</i>		
b. Fotosistema I			
P700 apoproteína A1 (^a , ^b)	A0T0L9/ <i>psaA</i>	Cloroplasto, tk	Heterodímero PsaA/B CR P700
P700 apoproteína A2(^b)	A0T0M7/ <i>psaB</i>	Cloroplasto, tk	Heterodímero PsaA/B CR P700
Proteína Ycf4	A0T0A2/ <i>ycf4</i>	Cloroplasto, tk	Ensamblado del FS I
Centro Hierro-Azufre(^a , ^b)	A0T0L2/ <i>psaC</i>	Cloroplasto, tk	Unión de PsaD y PsaE al FSI,
Subunidad II del CR(^b)	K0RTY0/ <i>psaD</i>	Cloroplasto, tk	CR del FSI
Subunidad XI del CR(^a , ^b)	A0T0M6/ <i>psaL</i>	Cloroplasto, tk	CR del FSI
Proteína de unión a Ferredoxina	A0T0B9/ <i>psaD</i>	Cloroplasto, tk	CR del FSI
	A0T0T5/ <i>psaD</i>		
Proteína F(^a)	A0T0M1/ <i>psaF</i>	Cloroplasto, tk	CR del FSI
Ferredoxina	A0T0N0/ <i>petF</i>	Cloroplasto, tk	FAce ⁻ , reducción de NADP
Ferredoxina-NADP reductasa	K0TEQ8/ <i>Thaoc_06509</i>	Cloroplasto, tk	ClusterFx NADPH reductasa.
c. Fotosistema II			
Proteína del complejo de producción de O ₂ (^b)	B7FZ96/ <i>psbO</i>	Cloroplasto, tk	Complejo de lisis del agua
ProteínaCP43	A0T096/ <i>psbC</i>	Cloroplasto, tk	CR FSII
ProteínaCP47	A0T0P5/ <i>psbB</i>	Cloroplasto, tk	CR FSII
ProteínaD1	A0T0G9/ <i>psbA</i>	Cloroplasto, tk	CR P680 FSII
Proteína D2	A0T097/ <i>psbD</i>	Cloroplasto, tk	CR P680 FSII
	A0T0T0/ <i>psbD</i>		
ProteínaY	A0T0G0/ <i>psbY-A</i>	Cloroplasto, tk	CR FSII
ProteínaH	A0T0A9/ <i>psbH</i>	Cloroplasto, tk	CR FSII
Subunidad α citocromo b559	A0T0A3/ <i>psbE</i>	Cloroplasto, tk	CRFSII
Subunidad β citocromo b559	A0T0A4/ <i>psbF</i>	Cloroplasto, tk	CRFSII

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
d. Citocromos			
Citocromo b6 ^(b)	A0T0B8/ <i>petB</i>	Cloroplasto, tk	Flujo e ⁻ entre FSII y FSI
Apocitocromo f ^(b)	A0T0T6/ <i>petB</i>	Cloroplasto, tk	Flujo e ⁻ entre FSII y FSI
	A0T0R9/ <i>petA</i>	Cloroplasto, tk	
e. Complejo ATP sintetasa			
Subunidad b del CF0	A0T0E9/ <i>atpF</i>	Nd	Síntesis de ATP
Subunidad α del CF1	A0T0E8/ <i>atpG</i>	Cloroplasto, tk	Síntesis de ATP
	E7BW19/ <i>atpA</i>	Cloroplasto, tk	
	B8LER1/ <i>atpA</i>	Cloroplasto, tk	
	A0T0F1/ <i>atpA</i>	Cloroplasto, tk	
Subunidad β del CF1	B7G531/ <i>Atp1</i>	Nd	Síntesis de ATP
	B7FS46/ <i>atpB</i>	Nd	
	B5YP88/	Nd	
	<i>Thaps_41256</i>		
	A0T0D2/ <i>atpB</i>	Nd	
	B8LET6/	Nd	
Subunidad δ del CF1	<i>Thapsdraft_bd1563</i>		
Subunidad ε del CF1	E7BW18/ <i>atpD</i>	Cloroplasto, tk	Síntesis de ATP
Subunidad γ del CF1 ^(c)	A0T0D1/ <i>atpE</i>	Cloroplasto, tk	Síntesis de ATP
	B7G0M9/ <i>atpC</i>	Nd	Síntesis de ATP
f. Fijación de carbono			
RUBISCO subunidad grande ^(c)	A8DP56/ <i>rbcL</i>	Cloroplasto, str	Fijación de C
	Q9TK52/ <i>rbcL</i>		
RUBISCO subunidad pequeña	E7BW10/ <i>rbcS</i>	Cloroplasto, str	Fijación de C
Proteína CBBX activasa de la RUBISCO	A0T0U6/ <i>cbbX</i>	Cloroplasto, str	Modulación de la Rubisco
GA3P deshidrogenasa Fosfoglicerato quinasa ^(d,e)	K0RTY6/ <i>cbbX</i>	Cloroplasto, str	G3P ↔ 1,3BP
	B7G5Q1/ <i>GapC1</i>	Cloroplasto	
	B5YN92/	Cloroplasto	
	<i>Thaps_270304</i>		
Precursor de piruvato carboxilasa ^(d)	B7GA98/ <i>Pyc2</i>	Cloroplasto	Pyr → OAA
g. Síntesis de pigmentos y degradación de proteínas			
Hidroximetilbilano sintasa	B7FWY2/ <i>hemC</i>	Nd	Síntesis de tetrapirroles
Mg-protoporfirina IX quelatasa	A0T0B5 / <i>chlI</i>	Cloroplasto	Síntesis de clorofila
	E7BWC5/ <i>chlI</i>		
Proteasa (ATP dependiente)	B8BQ15/ <i>chlH1</i>		Proteasa
	A0T0K8/ <i>clpC</i>	Cloroplasto	
Zn Proteasa (ATP dependiente)	A0T0S3/ <i>ftsH</i>	Cloroplasto	Reparación del FSII
	A0T0F2/ <i>ftsH</i>		

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
FOTORRESPIRACIÓN Y ESTRÉS			
Glicolato oxidasa (^{c,d,e})	B7FUG8/ <i>Phatrdraft_50804</i>	Mitocondria	Oxidación de glicolato a glioxilato
Serinahidroximetil transferasa(^e)	B7FQ66/ <i>Shmt2</i>	Mitocondria?	Decarboxilación y desaminación de glicina a serina. Fotorrespiración
Ascorbato peroxidasa (^e)	B5YLQ7/ <i>Thaps_269942</i> B7G384/ <i>APX1</i>	Nd	Oxidación del ascorbato en estrés oxidativo
Proteína Heat shock 70	B8C635/ <i>hsp70</i> B7FQ84/ <i>hsp70A</i> B8BWB9/ <i>hsp70_4</i>	Nd	Respuesta al estrés
Isocitrato liasa (^d)	B7G518/ <i>PhaTrdraft_51088</i>	Peroxisoma?	IsoCit→Glioxilato + Suc
METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO			

a. Glucólisis

Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, Clase II(^{d,e})	K0SPN2/ <i>Thaoc_1</i> 2069	Citoplasma?	FBP ↔ GAP
GAP deshidrogenasa(^{d,e,f})	B7FSI3/ <i>GapC3</i> B8C247/ <i>GapC3</i> K0SY05/ <i>Thaoc_07275</i>	Mitocondria? Citoplasma	GAP ↔BPG
Triosa fosfato isomerasa(^{d,e})	K0R9F3/ <i>Thaoc_35826</i>	Citoplasma?	GAP ↔ DHAP
Fosfoglicerato quinasa(^{d,e})	B7G5G4/ <i>PhaTrdraft_29157</i> B8LCF8/ <i>PGK5</i>	Nd Citoplasma	3PG ↔ BPG
Piruvato quinasa (^{d,e})	B8BZT7/ <i>Pyk2</i>	Citoplasma	PEP → Pyr
Fosfoglicerato mutasa	B7FU06/ <i>Pgam_6</i>	Nd	2PG↔3PG
α-enolasa (^f)	B8BZT5/ <i>Eno1</i> B8C355/ <i>Eno2</i>	Mitocondria Cloroplasto?	2PG ↔PEP

b. CAT

Piruvato deshidrogenasa componente E1 sub.α(^d)	B7GAB0/ <i>PDHA1</i>	Mitocondria	Pyr→AcCoA
Dihidrolipoamida succiniltransferasa	B7GBE7/ <i>PhaTrdraft_40430</i>	Mitocondria	2KG → sucCoA
NADH deshidrogenasa	K0SM96/ <i>Thaoc_20181</i>	Mitocondria	Cadena respiratoria
Succinato deshidrogenasa	B7GA40/ <i>SDH2</i>	Mitocondria	Succinato ↔ Fumarato

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
c. OPP (Vía oxidativa de la pentosa fosfato)			
Transaldolasa (^d)	B5Y3S6/ <i>Phatr_28222</i>	Citoplasma	SH7-P + GAP ↔ E4P + F6P
Transcetolasa(^d)	B7FUU0/ <i>Tkl</i>	Cloroplasto?	SH7-P + GAP ↔ RI5P + XU5P
	B8BTR4/ <i>Tkl2</i>	Citoplasma	
d. Síntesis de crisolaminarina y monosacáridos			
GDP-manosa-4,6- deshidrogenasa	B8C1P6/ <i>GMD1</i>	Citoplasma	Síntesis de <i>nov</i> o de fucosa
UDP-Glucosa-pirofosforilasa / fosfoglucomutasa	B7GE51/ <i>Ugp/Pgm</i>	Nd	G1P ↔ UDPglc
UDP-Glucosa-6- deshidrogenasa	B5Y5J6/ <i>UGDH1</i>	Nd	Síntesis de arabinosa, xilosa y glicosilaminoglicanos
METABOLISMO DE LÍPIDOS			
Proteína de biosíntesis de sulfolípidos	B8C7K5/ <i>SQDB1</i>	Nd	Síntesis de lípidos
Acetil-CoAcarboxilasa	B5YMF5/ <i>ACC</i>	Nd	ACoA→ MalonilCoA
	B7G7S4/ <i>ACC1</i>	Nd	
Metilmalonil-CoA mutasa	B8BZW3/ <i>Mcm1</i>	Nd	MetilmalonilCoA ↔sucCoA
Propionil-CoAcarboxilasa	B7GCL6/ <i>PhaTrdraft_51245</i>	Mitocondria?	PropionilCoA→ MetilmalonilCoA
METABOLISMO DEL N Y PROTEÍNAS			
a. Síntesis y degradación de aminoácidos			
Glutamino sintetasa	B7G6Q6/ <i>GLNA</i> B8CFZ9/ <i>GLNA</i>	Citoplasma?	Asimilación NH ₄ ⁺
Glutamato sintetasa dependiente de Ferredoxina	B7GAZ5/ <i>Gltx</i>	Cloroplasto?	Glutamato↔ Glutamina + oxoglutarato
Fosfo-2-dehidro-3- desoxiheptonato aldolasa	B7FRJ9/ <i>AroA</i>	Citoplasma?	Síntesis de aa. Aromáticos
Adenosil homocisteinasa	B7FT14/ <i>PhaTrdraft_18319</i>	Citoplasma?	Síntesis cisteína
Proteína P del sistema de clivaje de la glicina	K0QZL5/ <i>Thaoc_36273</i>	Mitocondria	Degradación de glicina
Aminometil transferasa	B7G5Z8/ <i>Gdcp</i> B8C809/ <i>GDCT</i>	Mitocondria	Catabolismo de glicina.
b. Ciclo de la urea			
Carbamoyl-fosfato sintetasa	B8BZG0/ <i>ThaPsdraft_40323</i>	Citoplasma	Síntesis de arginina

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
Carbamoyl-fosfato sintetasa, CPS III.	B7GEG8/ <i>PhaTrdraft_24195</i>	Mitocondria	Metabolismo de glutamina. Síntesis de novo de pirimidinas
c. Síntesis de proteínas, modificaciones post-traducción			
Factor de elongación Tu	A0T0K6/ <i>tufA</i>	Cloroplasto	Unión del aa-tARN al sitio A del ribosoma durante la síntesis de proteínas
Proteína chaperona 60 kDa (°)	A0T100/ <i>tufA</i> A0T0H6/ <i>groL</i>	Cloroplasto	Plegado de proteínas plastidiales
Proteína ribosomal L14, de la subunidad 50S (°)	A0T0I9/ <i>rpl14</i>	Cloroplasto	Parte de la subunidad 50s
Proteína ribosomal L12, de la subunidad 50S	A0T0C0/ <i>rpl12</i>	Cloroplasto	
Proteína ribosomal S5, de la subunidad 30S	A0T0J5/ <i>rps5</i>	Cloroplasto	Proteína de ensamblado de rARN, plastidial
Proteína ribosomal S7, de la subunidad 30S (°)	A0T0K5/ <i>rps7</i>	Cloroplasto	Proteína de ensamblado de rARN de la sub. 30S plastidial
Proteína ribosomal 40S(°)	B7FP80/ <i>PhaTrdraft_17414</i>	Nd	Integridad estructural del ribosoma
Proteína ribosomal RS20, de la subunidad 40S	B8C138/ <i>RS20</i>	Citoplasma	Subunidad pequeña del ribosoma
Proteína RS2, subunidad pequeña	B8C8V8/ <i>Rs2</i>	Citoplasma	
Factor de elongación G mitocondrial	K0RVU0/ <i>Thaoc_27681</i>	Mitocondria	
Chaperona dirigida a mitocondria	B7FQ72/ <i>Cpn60_1</i> B5YLQ5/ <i>hsp60</i>	Citoplasma	Plegado de proteínas
Peptidilprolil isomerasa	B8BR35/ <i>ThaPsdraft_31535</i>	Citoplasma?	Isomerización <i>cis-trans</i> del enlace peptídico a prolina en el extremo N-terminal; plegado de proteínas.
Proteína I, subunidad γ del complejo T	B7FZL3/ <i>PhaTrdraft_12411</i> K0RDU0/ <i>Thaoc_29426</i>	Citoplasma?	Plegado de proteínas.
Traducción: Factor de elongación α	B8C995/ <i>ThaPsdraft_41829</i>	Citoplasma?	Síntesis de proteínas.

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
Proteína del RE ^(g)	B7FUB7/ <i>BiP</i>	Citoplasma, RE, lumen	Degradación de proteínas defectuosas, acumulación de Ca^{2+} en el RE y percepción de estrés, muerte celular programada.

d. Plegado, señalización y degradación de proteínas

Proteína plastidial de codificación nuclear	B7FRS0/	Citoplasma	Plegado de proteínas
Calmodulina	<i>CPN60_2</i> B5YMJ6/ <i>CAM1</i>	Nd	Proteína de señalización
Proteína símil 14-3-3 (Fragmento) ^(c)	B7G5Y2/ <i>PhaTrdraft_5651</i>	Citoplasma	Proteína de señalización
Proteína chaperona dnaK	A0T0H7/ <i>dnaK</i>	Cloroplasto	Plegado de proteínas.
	A0T0X1/ <i>dnaK</i>	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria	FamiliaHSP70
Ubiquitina	B5YMV8/ <i>dnaK</i> B7FY02/ <i>Ubi3</i>	Nd Citoplasma	Señalización para degradación de proteínas
Ubiquitinilcarboxil hidrolasa terminal	B7FXE5/ <i>PhaTrdraft_41928</i>	Nd	Señalización para degradación de proteínas
Subunidad β del proteosoma (fragmento)	B8BZW7/ <i>PSB6</i>	Citoplasma	Clivaje inespecífico de péptidos

e. Regulación de la transcripción e histonas

Histona H2	B7G2A5/ <i>H2a-m1</i>	Núcleo	Unión a ADN
Histona H2B	K0SNH7/ <i>Thaoc_16881</i>	Núcleo	Unión a ADN
Histona H4 (Fragmento)	K0SEK7/ <i>Thaoc_15573</i>	Núcleo	Regulador transcripción
Complejo asociado al polipéptido naciente, sub. β	B7FTC4/ <i>PhaTrdraft_9697</i>	Núcleo	Regulador transcripción

TRANSPORTE CELULAR, TRÁFICO DE VESÍCULAS Y CITOESQUELETO

Proteína transportadora antiporte Triosa P/Pi	B7FPD9/ <i>Tpt1</i>	Cloroplasto (membrana)	Exporta triosa P a cambio de P inorgánico
Complejo AP asociado a clatrina, subunidad β	B8C7W7/ <i>APB1</i>	Citoplasma	Tráfico intracelular de proteínas en vesículas

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Compartimento	Función
Cadena pesada de la clatrina	B7G4Y3/ <i>CHC</i>	Citoplasma	Tráfico de vesículas
Proteína coatómera, sub. α	K0R8W5/ <i>Thaoc_32593</i>	Citoplasma	Transporte de vesículas sin clatrina
Proteína coatómera, sub. β	B7FZS9/ <i>COPbeta2</i>	Citoplasma	Transporte de vesículas sin clatrina
Subunidad V-ATPasa H ⁺ (^h)	B7G4Q4/ <i>PhaTrdraft_21882</i>	Membrana vacuola	Tráfico de vesículas, acidificación de compartimentos.
Subunidad C V-ATPasa H ⁺	B7FTS7/ <i>PhaTrdraft_55482</i>	Membrana vacuola	
Subunidad α V-ATPasa H ⁺ (^h)	B7G3I2/ <i>PhaTrdraft_28794</i>	Membrana vacuola	
Subunidad catalítica de la V-ATPasa H ⁺	B8CBV3/ <i>Vat2</i> K0SIX4/ <i>Thaoc_12933</i>	Membrana vacuola	
ABC proteína	B8C1A4/ <i>Thapsdraft_262083</i>	Membrana	Transporte mediado por ATP
Cadena α de la tubulina	B8C832/ <i>TUB1</i>	Citoplasma	Microtúbulos
Cadena β de la tubulina	B7G0C3/ <i>PhaTrdraft_54534</i> B5Y3W7/ <i>PhaTR_21122</i>	Citoplasma	Microtúbulos
Proteína Sec61 de membrana de RE, subunidad α	B7GD39/ <i>Sec61alpha</i>	Membrana RE	Transporte de vesículas
Proteína nuclear de unión al GTP	K0THM9/ <i>Thaoc_01718</i>	Núcleo	Transporte núcleo-citoplasma de proteínas y ARN
Proteína semejante a actina/actina	B7G5C0/ <i>Act2</i> B7G878/ <i>Act1</i>	Citoplasma?	Microfilamentos
NO ASIGNADAS			
Nucleósido difosfato quinasa	B7FPE8/ <i>NDK1</i>	Nd	ATP + nDP → ADP + nTP
	B8C642/ <i>NDK2</i>	Nd	
	K0RJE4/ <i>Thaoc_32138</i>	Nd	
Óxidoreductasa	B8BT70/ <i>ThaPsdraft_1049</i>	Nd	Proteína del cluster oxidoreductasa

Referencias bibliográficas: ^aGrouneva *et al.* 2011, ^bGrouneva *et al.* 2016, ^cLongworth *et al.* 2016, ^dKroth *et al.* 2008, ^eRosenwasser *et al.* 2014, ^fSmith *et al.* 2012, ^gCarvalho *et al.* 2014, ^hMarshansky & Futai 2008.

Abreviaturas: **2KG:** 2 oxoglutarato (α cetoglutarato), **2PG:** 2-fosfoglicerato, **3PG:** 3-fosfoglicerato, **AcCoA:** acetilCoA, **Chl *a*:** clorofila *a*, **CR:** centro de reacción, **e-:** electrones, **F6P:** Fructosa-6-fosfato, **Fac e-:** Flujo acíclico de electrones, **FBP:** fructosa-1,6-bisfosfato, **FsI:** Fotosistema I, **FsII:** Fotosistema II, **Fx:** Ferredoxina, **G1P:** Glucosa-1-fosfato, **G6P:** Glucosa-6-fosfato, **GAP:** Gliceraldehido-3-fosfato, **BPG:** 1,3 bifosfoglicerato, **DHAP:** di hidroxiacetona fosfato, **E4P:** eritrosa-4-fosfato, **Nd:** no designado, **PEP:** fosfoenolpiruvato, **Pyr:** piruvato, **OAA:** oxalacetato, **RE:** retículo endoplasmático, **RI5P:** ribosa-5-fosfato, **RUBISCO:** ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa, **SH7-P:** sedoheptulosa-7-fosfato, **Str:** estroma, **Suc:** Succinato, **SucCoa:** succinilCoA, **Tk:** Tilacoide, **Xu5P:** xilulosa-5-fosfato.

Al comparar las abundancias de las proteínas de los medios carenciados (**SDS_N** y **SDS_P**) con aquellas encontradas en el medio completo (**SDS_C**) se observan diferencias en la abundancia de algunas proteínas (**Tabla 4.14**).

Tabla 4.14: Proteínas de *H. luciae* obtenidas luego del tratamiento con SDS 2 % que presentaron mayor o menor abundancia en los medios carenciados sin fósforo (-P) y sin nitrógeno (-N) respecto del control. Todas las proteínas son reportadas con su nombre, identificador del programa UP (UP Id) y compartimento celular donde se ubica.

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	Comparación con el control *	
		-P	-N
FOTOSÍNTESIS Y FIJACIÓN DEL CARBONO			
a. Complejo antena			
Proteína –Fucoxantina-clorofila a/c (FCP)	B7FRW2/ <i>Lhcf4</i>	-2,8	-
	B7GBK6/ <i>Lhcf11</i>	1,1	-1,7
b. Fotosistema I			
P700 apoproteína A1	A0T0L9/ <i>psaA</i>	-1,2	-1,5
P700 apoproteína A2	A0T0M7/ <i>psaB</i>	-2,4	-1,9
Subunidad II del CR	K0RTY0/ <i>psaD</i>	-2,2	-
Subunidad XI del CR	A0T0M6/ <i>psaL</i>	-3,6	-1,1
Proteína de unión a Ferredoxina	A0T0B9/ <i>psaD</i>	-1,1	-1,8
	A0T0T5/ <i>psaD</i>	-1,4	1,1
Ferredoxina-NADP reductasa	K0TEQ8/ <i>Thaoc_06509</i>	2,1	1,4
c. Fotosistema II			
Proteína del complejo de producción de O ₂	B7FZ96/ <i>psbO</i>	-1,3	-3,2
ProteínaCP43	A0T096/ <i>psbC</i>	-1,5	-1,9
ProteínaCP47	A0T0P5/ <i>psbB</i>	-1,7	-4,4
ProteínaD1	A0T0G9/ <i>psbA</i>	-1,8	-2,4
Proteína D2	A0T0T0/ <i>psbD</i>	-4,1	-
d. Citocromos			
Citocromo b6	A0T0T6/ <i>petB</i>	1,1	-
Apocitocromo f	A0T0R9/ <i>peta</i>	-3,6	-
e. Complejo ATP sintetasa			
Subunidad b del CF0	A0T0E8/ <i>atpG</i>	1,4	1,2
Subunidad α del CF1	E7BWI9/ <i>atpA</i>	1,3	1,6
	A0T0F1/ <i>atpA</i>	1,1	-
	B7G531/ <i>Atp1</i>	1,3	3,7
Subunidad β del CF1	B7FS46/ <i>atpB</i>	1,1	4,2
	B5YP88/ <i>Thaps_41256</i>	1,8	1,9
	B8LET6/	-	1,8
	<i>Thapsdraft_bd1563</i>		

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	-P	-N
f. Fijación de carbono			
RUBISCO subunidad grande	A8DP56/ <i>rbcL</i>	1,5	-2,3
	Q9TK52/ <i>rbcL</i>	1,4	-2,2
RUBISCO subunidad pequeña	E7BW10/ <i>rbcS</i>	1,1	-
Proteína CBBX activasa de la RUBISCO	K0RTY6/ <i>cbxX</i>	1,5	-
GA3P deshidrogenasa	B7G5Q1/ <i>GapC1</i>	1,5	2,1
g. Degradación de proteínas plastidiales			
Proteasa (ATP dependiente)	A0T0K8/ <i>clpC</i>	-1,4	2,4
Zn Proteasa (ATP dependiente)	A0T0S3/ <i>ftsH</i>	-7,5	0,9
FOTORRESPIRACIÓN Y ESTRÉS			
Serinahidroximetil transferasa	B7FQ66/ <i>Shmt2</i>	-	1,7
Ascorbato peroxidasa	B7G384/ <i>APX1</i>	3,7	1,8
Proteína Heat shock 70	B8C635/ <i>hsp70</i>	1,4	1,9
	B7FQ84/ <i>hsp70A</i>	-	5,3
METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO			
a. Glucólisis			
Fructosa-1,6 difosfatoaldolasa, Clase II	K0SPN2/ <i>Thaoc_12069</i>	-	1,0
GA3P deshidrogenasa	B7FSI3/ <i>GapC3</i>	2,0	-2,1
	K0SY05/ <i>Thaoc_07275</i>	1,2	-
Fosfoglicerato quinasa	B7G5G4/ <i>PhaTrdraft_29157</i>	1,3	-
	B8LCF8/ <i>PGK5</i>	1,3	-
Precursor de la piruvato carboxilasa	B7GA98/ <i>Pyc2</i>	-3,1	6,2
Piruvato quinasa	B8BZT7/ <i>Pyk2</i>	-	1,0
α -enolasa	B8BZT5/ <i>Eno1</i>	1,7	1,9
b. CAT			
NADH deshidrogenasa	K0SM96/ <i>Thaoc_20181</i>	-	-1,3
Dihidrolipoamida succiniltransferasa	B7GBE7/ <i>PhaTrdraft_40430</i>	-	1,8
c. OPP (Vía oxidativa de la pentosa fosfato)			
Transcetolasa	B7FUU0/ <i>Tkl</i>	4,9	1,7
d. Síntesis de crisolaminarina y monosacáridos			
UDP-Glucosa-pirofosforilasa / fosfoglucomutasa	B7GE51/ <i>Ugp/Pgm</i>	2,8	0,3
GDP-manosa-4,6-deshidrogenasa	B8C1P6/ <i>GMD1</i>	-	1,0
UDP-Glucosa-6-deshidrogenasa	B5Y5J6/ <i>UGDH1</i>	2,1	-

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	-P	-N
METABOLISMO DE LÍPIDOS			
Acetil-CoA carboxilasa	B7G7S4/ <i>ACC1</i>	1,5	2,9
METABOLISMO DEL N Y PROTEÍNAS			
a. Síntesis de aminoácidos			
Glutamino sintetasa	B7G6Q6/ <i>GLNA</i>	-	4,6
Adenosilhomocisteinasa	B7FT14/ <i>PhaTrdraft_18319</i>	1,1	5,1
b. Ciclo de la urea			
Carbamoyl-fosfato sintetasa, CPS III.	B7GEG8/ <i>PhaTrdraft_24195</i>	-3,6	-
c. Síntesis de proteínas, modificaciones post-traducción			
Factor de elongaciónTu	A0T0K6/ <i>tufA</i>	1,1	1,7
Proteína chaperona 60 kDa	A0T0H6/ <i>groL</i>	-	1,4
Proteína ribosomal L12, de la subunidad 50S	A0T0C0/ <i>rpl12</i>	-	-1,1
Proteína ribosomal S7, de la subunidad 30S	A0T0K5/ <i>rps7</i>	-3,6	-
Proteína ribosomal 40S	B7FP80/ <i>PhaTrdraft_17414</i>	-2,5	-
Proteína ribosomal RS20, de la subunidad 40S	B8C138/ <i>RS20</i>	-3,6	-
Chaperona dirigida a mitocondria	B7FQ72/ <i>Cpn60_1</i>	-1,5	-4,3
Traducción: Factor de elongación α	B8C995/ <i>ThaPsdraft_41829</i>	3,1	-
Proteína del RE	B7FUB7/ <i>BiP</i>	1,9	-
d. Plegado, señalización y degradación de proteínas			
Proteína chaperona dnaK	A0T0H7/ <i>dnaK</i>	-	-1,1
	B5YMV8/ <i>dnaK</i>	-1,1	1,7
Proteína plastidial de codificación nuclear	B7FRS0/ <i>CPN60_2</i>	-1,2	-3,1
Calmodulina	B5YMJ6/ <i>CAM1</i>	8,6	17,8
Proteína símil 14-3-3 (Fragmento)	B7G5Y2/ <i>PhaTrdraft_5651</i>	2,7	7,5
Ubiquitina	B7FY02/ <i>Ubi3</i>	3,1	8,4
Subunidad β del proteosoma (fragmento)	B8BZW7/ <i>PSB6</i>	-	-4,2
e. Regulación de la transcripción e histonas			
Histona H2	B7G2A5/ <i>H2a-m1</i>	9,8	7,4
Histona H2B	K0SNH7/ <i>Thaoc_16881</i>	1,1	-
Histona H4 (Fragmento)	K0SEK7/ <i>Thaoc_15573</i>	2,5	2,9

Nombre de la proteína	UP Id/ gen	-P	-N
TRANSPORTE CELULAR, TRÁFICO DE VESÍCULAS Y CITOESQUELETO			
Proteína transportadora antiporte Triosa P/Pi	B7FPD9/ <i>Tpt1</i>	-1,4	-
Complejo AP asociado a clatrina, subunidad β	B8C7W7/ <i>APB1</i>	-1,2	4,9
Cadena pesada de la clatrina	B7G4Y3/ <i>CHC</i>	1,7	-
	K0R8W5/ <i>Thaoc_32593</i>	-	1,4
Proteína coatómera, sub. α	B7G4Z7/ <i>PhaTrdraft_21929</i>	-1,2	2,8
Proteína coatómera, sub. B	B7FZS9/ <i>COPbeta2</i>	-1,1	-
Subunidad α V-ATPasa H^+	B7G3I2/	1,9	11,5
	<i>PhaTrdraft_28794</i>		
Subunidad catalítica de la V-ATPasa H^+	K0SIX4/ <i>Thaoc_12933</i>	1,1	12,8
Cadena β de la tubulina	B5Y3W7/	1,6	4,3
	<i>PhaTR_21122</i>		
Proteína Sec61 de membrana de RE, subunidad α	B7GD39/ <i>Sec61alpha</i>	-2,1	-
Proteína nuclear de unión al GTP	K0THM9/ <i>Thaoc_01718</i>	1,8	-

* Los valores negativos o positivos indican una menor o mayor abundancia relativa, respectivamente, de las proteínas de los medios carenciados respecto del control. El signo (-) indica que no se encontró la proteína en los medios carenciados y sí en el control.

En las células de los cultivos control, al igual que las de los medios carenciados, se observó una preponderancia marcada de las proteínas plastidiales, siendo 78 % en las células provenientes del medio completo y, respectivamente, 63 y 49 % en los medios *f*/2-P y *f*/2-N (**Figura 4.17**). Siguió en abundancia las proteínas relacionadas con el metabolismo del N, incluyendo asimilación de N, síntesis de aminoácidos y proteínas y catabolismo de proteínas. En menor proporción, se observaron proteínas relacionadas con el metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos. En todas las condiciones, varias de las proteínas identificadas indicaron un activo transporte intracelular de vesículas.

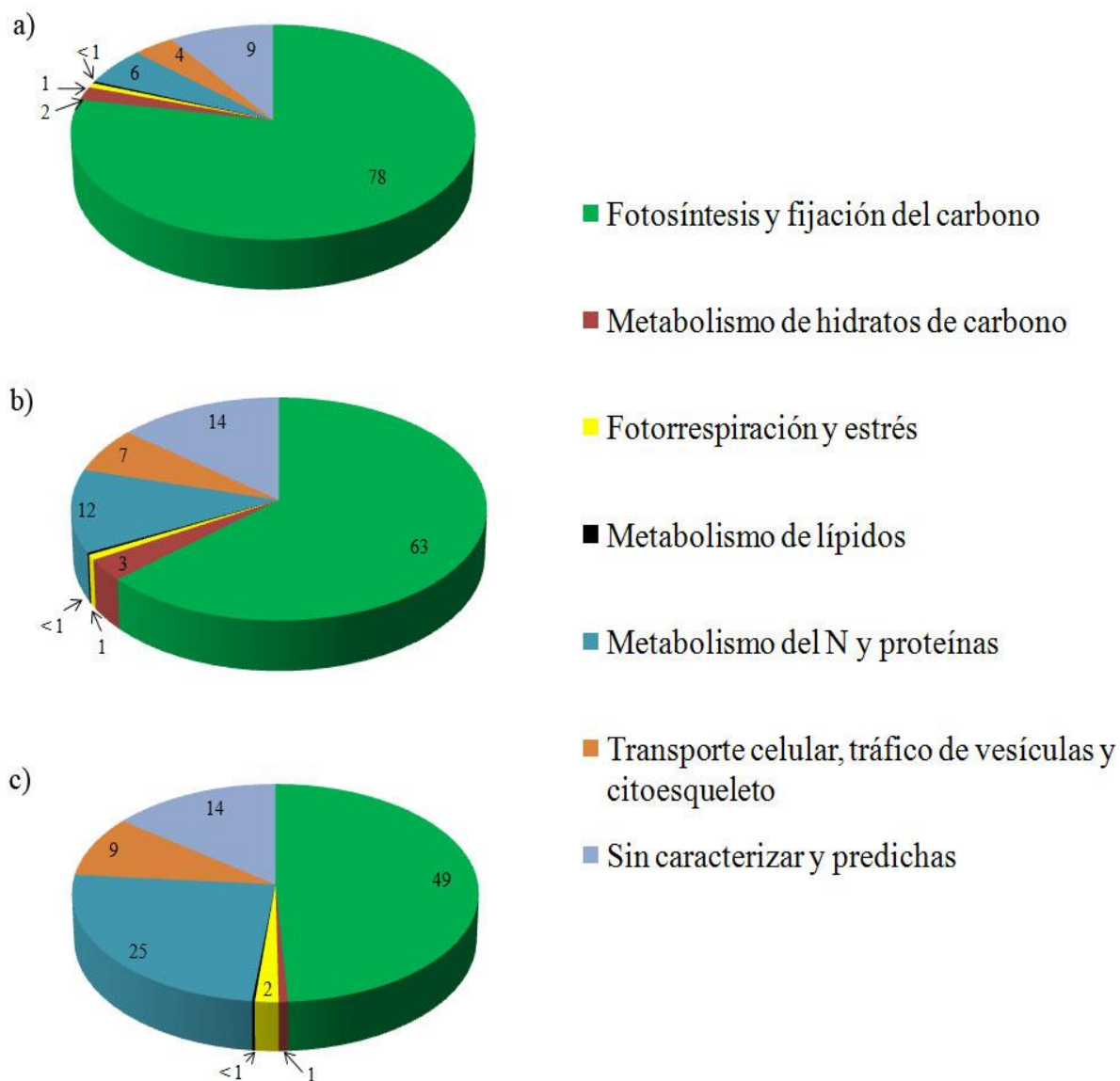


Figura 4.17: Porcentajes relativos de las proteínas de los extractos de SDS 2 % de *H. luciae* asignadas a las distintas vías metabólicas obtenidos de los medios **a)** *f/2*, **b)** *f/2-P* y **c)** *f/2-N*. Para la cuantificación relativa se realizó la normalización de las áreas para las inyecciones ($n=3$) de cada condición analizada. Los valores se expresan en porcentajes.

La comparación de los medios carenciados con el control reveló varias diferencias (**Figura 4.18**). Existe disminución en las proteínas de los complejos antena y los fotosistemas; más aún, en el medio *f/2-N* esta reducción de los fotosistemas estuvo acompañada con una mayor abundancia de proteasas

plastidiales. Pese a ello, los niveles de subunidades del complejo ATP sintetasa plastidial fueron más elevados. Sin embargo, se registró una diferencia importante en los medios carenciados; mientras que en *f*/2-P, las proteínas relacionadas con la fijación de carbono mostraron niveles incluso más elevados que en el control, en *f*/2-N disminuyeron.

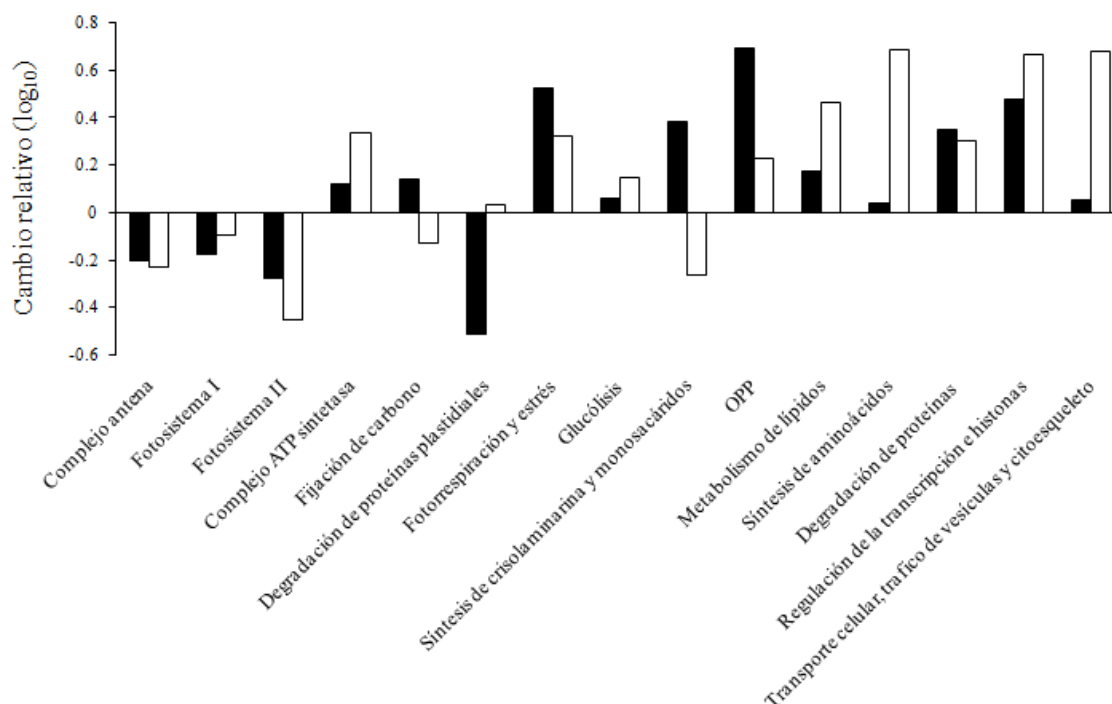


Figura 4.18: Comparación de la abundancia relativa de las proteínas de *H. luciae* cultivada en *f*/2-P (barras negras) y *f*/2-N (barras blancas). Los cambios de abundancia relativa de proteínas respecto del control (eje horizontal) se expresan como $\log_{10}$. Los valores positivos y negativos indican mayor y menor abundancia relativa respectivamente respecto del control.

Las proteínas de las vías catabólicas como glucólisis, vía oxidativa pentosas fosfato e incluso, degradación de proteínas mostraron un incremento en los medios carenciados. En contraposición, en *f*/2-P aumentó la abundancia de las proteínas relacionadas con la biosíntesis de crisolaminarina, y en ambos medios carenciados, las correspondientes a la biosíntesis de lípidos.

El estrés impuesto por carencia de nutrientes se vio reflejado por el incremento

de los niveles de proteínas relacionadas con estrés oxidativo y fotorrespiración y por cambios en las proteínas indicadoras de un activo transporte intracelular y en los niveles de histonas y de péptidos de regulación de la transcripción.

DISCUSIÓN

4.5. Sustancias poliméricas extracelulares

Las s-EPS de *H. luciae* aisladas a partir del medio *f*/2 rindieron glucosa como azúcar mayoritario. Puede descartarse que dicho monosacárido provenga del glucano de reserva crisolaminarina (Chiovitti *et al.* 2004), ya que las s-EPS se aislaron a partir de sobrenadantes de cultivos libres de células.

La composición de monosacáridos de las s-EPS puede diferir entre las especies de diatomeas, pero generalmente se han citado como monosacáridos componentes glucosa, galactosa, fucosa y manosa (Bahulikar & Kroth 2008, Gügi *et al.* 2015, Xiao & Zheng 2016). En este caso, también se identificó 3-*O*-metilxilosa, coincidentemente a lo informado por Chiovitti *et al.* (2003b) para *Pinnularia viridis*.

Luego del cultivo de *H. luciae* en medios carenciados se registró un incremento del porcentaje molar de galactosa en s-EPS-N y s-EPS-P conjuntamente con un aumento de los de ramnosa y fucosa en el primero, y de arabinosa en el segundo. La disminución del contenido de glucosa en las s-EPS de los medios carenciados fue informada en varias especies de diatomeas, como *Synedropsis* sp. (Aslam *et al.* 2012), *Cylindrotheca closterium* y *C. fusiformis* (Magaletti *et al.* 2004, Urbani *et al.* 2005). Por otro lado, estos resultados difieren de los presentados por Magaletti *et al.* (2004), quienes no detectaron diferencias en la composición de monosacáridos de las s-EPS-N respecto al control.

El espectro de MALDI de las s-EPS_c exhibió intervalos de *m/z* de 162 unidades, consistente con residuos de hexosas. Por otra parte, el espectro de s-EPS-N mostró intervalos de *m/z* de 162 unidades, y algunos intervalos de *m/z* 132 y *m/z* 146, consistentes con residuos de pentosas y de desoxihexosas. Estos

resultados muestran una relación directa con los cambios en la composición de monosacáridos.

Los cambios en la composición de monosacáridos y/o en el grado de polimerización de los polisacáridos en situaciones de estrés nutricional son característicos de cada especie (Urbani *et al.* 2005, Abdullahi *et al.* 2006, Ai *et al.* 2015). En los últimos años se ha aplicado la espectrometría de MALDI-TOF para la adquisición de “huellas dactilares”, o patrones para diferentes especies (Liang *et al.* 2013, Nicolau *et al.* 2014, Ai *et al.* 2015). La relación entre estos cambios en la composición y/o grado de polimerización con el entorno ambiental aún está en el terreno de las hipótesis. Sin embargo, esta variabilidad podría estar relacionada con el papel asignado a las sustancias poliméricas extracelulares en la defensa contra predadores, el desplazamiento en el sustrato, la retención de agua, la adhesión celular y la señalización aleloquímica (Abdullahi *et al.* 2006, Xiao & Zheng 2016).

Es necesario tener en cuenta que, en las planicies de marea como las del estuario de Bahía Blanca, las diatomeas son integrantes mayoritarios de los biofilms bentónicos, junto con cianobacterias y bacterias no fotosintéticas (Parodi & Barría de Cao 2003, Popovich & Marcovecchio 2008, Pan *et al.* 2013). En ambientes naturales, los productos de las s-EPS con bajo peso molecular son utilizados en los sedimentos por bacterias heterótrofas (Underwood & Paterson 2003, Girollo *et al.* 2003, Bohórquez *et al.* 2017) que intervienen en la transferencia de carbono dentro de la red alimentaria del biofilm.

Algunas experiencias *in situ* o en co-cultivo para evaluar la actividad de enzimas glicolíticas de bacterias (Goto *et al.* 2001) revelaron que hay una variación en la tasa de descomposición de fracciones de EPS aisladas a partir de

distintas especies de diatomeas. Se comprobó que, cuanto más abundante es el contenido de glucosa en las s-EPS, más eficientemente procede la degradación bacteriana (Girollo *et al.* 2003). Los polímeros y oligómeros de glucosa, manosa y xilosa presentan una tasa más elevada de degradación que aquellos que contienen fucosa, ramnosa y galactosa (Janse *et al.* 1999; Girollo *et al.* 2003). En el caso de la diatomea *Chaetoceros affinis*, las EPS producidas en carencia de P son degradadas con menos eficiencia que aquellas generadas en deficiencia de N (Obernosterer & Herndl 1995). Más recientemente, Puddu *et al.* (2003) demostraron que las s-EPS liberadas bajo carencia de P son más resistentes a la degradación bacteriana. A pesar de contener algún porcentaje de galactosa y manosa, las s-EPS del medio completo liberadas por *H. luciae* están compuestas mayormente por glucosa, sugiriendo que podrían ser mucho más fácilmente biodegradables que aquellas liberadas bajo carencia de N y de P, más ricas en galactosa, ramnosa y fucosa.

Por otro lado, la menor tasa de degradación podría generar fragmentos resistentes que actuarían como señales extracelulares para inducir ciertas actividades enzimáticas, como la actividad fosfatasa alcalina, a fin de paliar la situación de estrés nutricional.

4.6. Detección de (1→3)-β-D-glucanos

La extracción acuosa de las células, especialmente la realizada a temperatura ambiente, rindió un producto con glucosa como componente mayoritario. Luego del análisis estructural por metilación, se comprobó la presencia de un (1→3)-β-D-glucano indicando, como también señalaron Chiovitti *et al.* (2004), que este glucano corresponde al polisacárido de reserva crisolaminarina. La

crisolaminarina se extrajo como producto soluble en agua, especialmente a temperatura ambiente. A diferencia de lo reportado por Caballero *et al.* (2016), el aumento de la temperatura no mejoró el rendimiento del glucano en el extracto. Esto puede atribuirse a que la extracción a temperatura ambiente procedió sobre células liofilizadas, donde puede esperarse un escape de componentes intracelulares debido a la ruptura de la membrana plasmática. Además de glucosa, en el producto RTW aparecieron cantidades menores de galactosa, manosa y fucosa, coincidiendo con lo informado por Xia *et al.* (2014). Caballero *et al.* (2016) atribuyen estos monosacáridos a polisacáridos complejos extracelulares que se extraerían conjuntamente con la crisolaminarina. Debe destacarse que ninguno de estos azúcares fue detectado en el producto permetilado.

De acuerdo al análisis estructural, la crisolaminarina en *H. luciae* presenta ramificaciones en C-2 y C-6, como fue informado para el mismo biopolímero de *Stauroneis amphioxys* (McConville *et al.* 1986), *Skeletonema costatum* (Paulsen & Myklestad 1978), *Craspedostauros australis* y *Thalassiosira pseudonana* (Chiovitti *et al.* 2004). La sustitución en el C-2 no siempre está presente, a diferencia de la ramificación en C-6, que fue informada en todas las crisolaminarinas estudiadas como la de *Phaeodactylon tricornutum* (Beattie *et al.* 1961, Chiovitti *et al.* 2004, Caballero *et al.* 2016), *Aulacoseira baicalensis* (Paulsen & Myklestad 1978), *Cylindrotheca fusiformis* (Chiovitti *et al.* 2004), *Stephanodiscus meyerii* (Alekseeva *et al.* 2005), *Chaetoceros debilis* (Størseth *et al.* 2006), *Odontella aurita* (Xia *et al.* 2014) y *Halamphora luciae* (Daglio *et al.* 2018). Las uniones β -1,6 en la crisolaminarina se asocian con la actividad inmunoestimulante de este polisacárido (Kim *et al.* 2011).

El *DB* (grado de ramificación) también varía en un amplio rango que va desde 0.015-0.39 (Beattie *et al.* 1961, Paulsen & Myklestad 1978, Chiovitti *et al.* 2004, Alekseeva *et al.* 2005, Xia *et al.* 2014, Caballero *et al.* 2016). En la bibliografía no se encontraron datos para asignar esta variabilidad del *DB* a diferentes especies y/o a condiciones de cultivo pero, teniendo en cuenta los resultados expuestos en este capítulo, que indican que el peso molecular se modifica tanto con el estado nutricional como con la edad de cultivo, no sería de extrañar que el *DB* también dependiese de los factores citados.

La calosa, otro glucano de estructura similar a la crisolaminarina, se detectó histoquímicamente en los cingulos de los frústulos mediante el fluorocromo azul de anilina. Waterkeyn & Bienfait (1987) informaron por primera vez la presencia de calosa en la cubierta de diatomeas. Recientemente Tesson & Hildebrand (2013), utilizando inhibidores de la enzima β -1,3 glucano sintetasa, adjudicaron a este polisacárido un papel clave en la integridad de los frústulos y en la deposición de la sílice. Sin embargo, a diferencia de la crisolaminarina, la calosa no posee ramificaciones y es insoluble en agua (Stone 2006).

Es notable destacar que la composición de monosacáridos de los extractos RTW y W 100.1 es similar a la de los hidrolizados de las células en el medio completo *f*/2, sobre todo luego de ser cosechadas a los 20 y 30 días, donde se observó una disminución significativa del contenido galactosa y un aumento del de glucosa.

El análisis de las células por MALDI-TOF MS mostró un perfil similar en los tres medios de cultivo (completo y carenciados), aunque con un desplazamiento hacia *m/z* de mayor peso molecular en los medios carenciados. Nicolau *et al.* (2014) reportaron un efecto similar para *Coscinodiscus* sp. Si bien MALDI-TOF-

MS no provee información sobre la identidad de las hexosas que generan las diferencias de m/z 162 entre las diferentes señales, cuando se compara el análisis de monosacáridos, tanto en los medios carenciados como en aquellos cultivos en la etapa estacionaria (20 y 30 días), se observa un incremento en el contenido de glucosa, indicando que el análisis de MALDI-TOF MS realizado sobre las células reflejaría preponderantemente cambios en el contenido y/o grado de polimerización de la crisolaminarina.

La acumulación del glucano de reserva trae como consecuencia el desplazamiento del polímero hacia mayores pesos moleculares y el incremento del valor del DP . Esto ocurre con el aumento de la edad de los cultivos y con el estrés nutricional, sobre todo cuando las células están sometidas a carencia de P. Mykkestad (1989) observó la acumulación de crisolaminarina en cultivos en fase estacionaria de *Chaetoceros affinis*, *S. costatum* y *Thalassiosira fluviatilis*. Más recientemente, Xia *et al.* (2014) midieron un máximo de polisacárido de reserva en la diatomea *Odontella aurita* en cultivos carentes de N. En *P. tricornutum*, Caballero *et al.* (2016) indicaron que no había oscilación diurna-nocturna del acervo de crisolaminarina bajo carencia de N. A partir de estos resultados concluyeron que no había un mayor consumo del polisacárido de reserva durante el metabolismo heterotrófico nocturno (Jallet *et al.* 2016). Por otro lado, las señales con un menor DP en la fase exponencial y estacionaria temprana de cultivo de *H. luciae* apuntan a la biosíntesis activa del glucano de reserva en las fases temprana de cultivo. Tal como lo señalan Hildebrand *et al.* (2017), las diatomeas no dependen totalmente del carbohidrato de reserva como fuente de energía durante las etapas de activa división celular, sugiriendo que los

fragmentos de bajo peso molecular observados en *H. luciae* no serían producto de la actividad catabólica.

La utilización de diferentes matrices permitió encontrar la línea de base de los espectros, aspecto crucial en la distinción de aquellos fragmentos que aparecen con baja intensidad. La “huella dactilar” de *H. luciae* mostró un perfil bimodal en células cosechadas entre los días 5 y 10, que no fue evidente en los espectros de la diatomea céntrica *Thalassiosira pseudonana* y *Coscinodiscus* sp. que exhibieron fragmentos en el rango de m/z de 2000-6300 con intervalos de m/z 162 (Nicolau *et al.* 2014, Ai *et al.* 2015). Es notable destacar que el espectro de la diatomea pennada *Seminavis robusta* mostró una variabilidad que esos autores atribuyeron a la contribución de las diferentes cepas y/o *mating types* de la muestra analizada (Nicolau *et al.* 2014).

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede aceptar la **Hipótesis 8**, dado que la edad del cultivo alteró el grado de polimerización del polímero de reserva.

En cuanto a la **Hipótesis 9**, se verifica parcialmente debido a que en el medio con carencia de P se observó una diferencia marcada en el grado de polimerización del polímero de reserva mientras que esta diferencia no fue tan evidente en el medio carente de N.

En consecuencia, la crisolaminarina podría utilizarse como un indicador del estado nutricional de las células y la calibración de las señales del espectro de MALDI con diferentes especies puede utilizarse para seleccionar el tiempo de cosecha en cultivos masivos para el aprovechamiento de diferentes metabolitos, en forma rápida y con un mínimo requerimiento de muestra.

Debe destacarse que a pesar de existir algunos trabajos de MALDI realizados sobre células de clorofitas (Andrade *et al.* 2015), cianobacterias (Aráoz *et al.*

2008) y diatomeas (Paz *et al.* 2011, Nicolau *et al.* 2014), este es el primer estudio donde se relaciona un perfil de polisacáridos obtenido por MALDI con el contenido y composición de hidratos de carbono y el análisis estructural por metilación del polisacárido de reserva.

4.7. Análisis del proteoma

Las diatomeas poseen tres genomas diferentes: uno nuclear, uno plastidial y uno mitocondrial, que han sido secuenciados en los últimos años para algunas especies: *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust *et al.* 2004) y *T. oceanica* (Lommer *et al.* 2012), *Fragilariopsis cylindrus* (Mock *et al.* 2017), *Fistulifera solaris* (Tanaka *et al.* 2015), *Synedra acus* (Galachyants *et al.* 2015) y *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler *et al.* 2008). Mediante transcriptómica se pudieron detectar cambios a nivel de la transcripción en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Wan *et al.* 2012, Bender *et al.* 2014, Alexander *et al.* 2015, Cruz de Carvalho *et al.* 2016). Sin embargo, la correlación entre los transcriptos y la abundancia de las proteínas suele ser pobre, ya que no tiene en cuenta los mecanismos de regulación post-transcripcional. De allí que el análisis de los perfiles de abundancia proteica a través de los proteomas provea información más confiable respecto de la influencia de factores bióticos y abióticos sobre las respuestas fisiológicas de las diatomeas (Lyon *et al.* 2011, Dyhrman *et al.* 2012, Hockin *et al.* 2012, Rosenwasser *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014a, Muhseen *et al.* 2015, Longworth *et al.* 2016, Büchel *et al.* 2017, Clement *et al.* 2017, Jian *et al.* 2017, Chen *et al.* 2018).

La distribución (*allocation*) del carbono se define como la partición del carbono asimilado por fotosíntesis en los diferentes grupos (*pools*) de

macromoléculas, por ejemplo proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (Wagner *et al.* 2017). Bajo condiciones óptimas de luz, nutrientes y temperatura, el flujo de carbono hacia la biosíntesis de macromoléculas estará en equilibrio con el flujo energético provisto por la fotosíntesis. Ante un cambio de las condiciones ambientales (por ejemplo, deficiencia de nutrientes) el equilibrio entre el flujo de carbono y de energía se altera, y deberán ponerse en funcionamiento respuestas regulatorias para hacer los ajustes necesarios y cubrir las necesidades mínimas de crecimiento (Jakob *et al.* 2007).

En un cultivo de diatomeas en medio completo, a la temperatura óptima y recibiendo una intensidad lumínica media (como en el caso de los cultivos en medio $f/2$ de *H. luciae*), el flujo de carbono asimilado será mayormente dirigido hacia la síntesis de proteínas necesarias para sostener una alta tasa de crecimiento y el activo metabolismo celular, y en menor proporción hacia la acumulación de reservas carbonadas, ya sea polisacáridos o lípidos. En efecto, durante la etapa de activo crecimiento de los cultivos en medio completo, la relación hidratos de carbono/proteínas fue menor que en los medios carenciados (**Figura 4.8**).

Una característica llamativa del proteoma de diatomeas es la redundancia y diversidad de isozimas (Smith *et al.* 2012, Gruber & Kroth 2017) como consecuencia de la adquisición de su cloroplasto por endosimbiosis secundaria a partir de un ancestro Archaeplastida rojo (Archibald 2015). En organismos unicelulares, la existencia de isozimas favorece la plasticidad de la respuesta en condiciones ambientales cambiantes en diferentes compartimentos celulares (Smith *et al.* 2012).

Como endosimbiontes secundarios, los genomas nucleares de las diatomeas son una combinación de genes de organismos evolutivamente muy diferentes y su

análisis ha revelado la presencia de genes tanto vegetales como animales (Smith *et al.* 2012). Durante la incorporación del plástido endosimbionte, los procesos de pérdida y/o de transferencia horizontal de genes habrían generado la aparición de vías metabólicas inusuales para organismos fotosintéticos, como el ciclo de la urea en la mitocondria (**Tabla 4.13**) o la fragmentación de caminos metabólicos en distintas organelas, como por ejemplo una glucólisis citoplasmática y otra parcial en la mitocondria (Kroth *et al.* 2008). En efecto, en *H. luciae* apareció una gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa (Uniprot B7FSI3) presumiblemente mitocondrial y relacionada con la vía Entner–Doudoroff de glucólisis en dicha organela (Fabris *et al.* 2012).

Cabe destacar que la presente información sobre los proteomas de *H. luciae* es totalmente novedosa, no habiéndose encontrado en la bibliografía antecedentes para esta especie.

4.7.1. Análisis del metabolismo energético y central del carbono de células de *H. luciae* cultivadas en medio completo f/2

Proteínas plastidiales

Las proteínas de los complejos antena son sumamente abundantes en las membranas tilacoidales y suelen aparecer en los proteomas de los lisados celulares (**Figura 4.17**) (Nunn *et al.* 2009, Grouneva *et al.* 2011, Hockin *et al.* 2012, Longworth *et al.* 2016). Fueron denominados originalmente como complejos FCP (*Fucoxanthin chlorophyll a/c binding proteins*) en base a la identificación de los genes codificantes (Armbrust *et al.* 2004). Actualmente, estas proteínas se clasifican como: proteínas mayoritarias Lhcf (complejo antena

periférico), proteínas Lhcr (asociadas al FSI) y un set minoritario de proteínas Lhcx que intervienen en la fotoprotección mediante el *quenching* no fotoquímico de la excitación de la clorofila (Dittami *et al.* 2010, Büchel *et al.* 2017, Herbstová *et al.* 2017). La estructura supramolecular de estos complejos antena y su composición pueden variar interespecíficamente y/o en respuesta a las condiciones ambientales, confiriendo a estas microalgas una enorme capacidad de aclimatación cromática para vivir a distintas profundidades en la columna de agua (Depauw *et al.* 2012, Valle *et al.* 2014, Fortunato *et al.* 2016, Grouneva *et al.* 2016).

En los proteomas de *H. luciae* aparecieron varias de las proteínas correspondientes a dos de los tres grupos de FCP: Lhcf y Lhcr (**Tabla 4.13**); sin embargo, no se observaron proteínas Lhcx.

Además se detectaron casi todas las proteínas del P680 del FSII, junto con el péptido O relacionado con la producción de oxígeno (**Figura 4.19, Tabla 4.13**), varias proteínas atribuidas al centro de reacción del FSI (psaA, psaB, psaC, psaD, psaF, psaL), junto con ferredoxina y ferredoxina-NADPH reductasa, proteínas del complejo de citocromos *b₆/f* entre ambos fotosistemas y varias de las subunidades del complejo ATP sintetasa (**Tabla 4.13**).

Las diatomeas poseen un *turnover* rápido de las múltiples subunidades del FSII, incluyendo la proteína D1, especialmente en condiciones de alta irradiancia (Wu *et al.* 2011, Domínguez *et al.* 2012) junto con la activación del ciclo de las xantofilas (Obata *et al.* 2013). Estos mecanismos de reparación y disipación no serían inducidos por las condiciones de incubación de los cultivos en irradiancia media-baja (100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sin embargo, el proteoma arrojó secuencias de al menos una proteasa relacionada con la reparación del FSII (**Tabla 4.13**).

Tampoco se registraron enzimas relacionadas con el ciclo fotoprotector de las xantofilas, que se activa bajo irradiancias muy elevadas (más de $1000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Lohr & Wilhelm 1999).

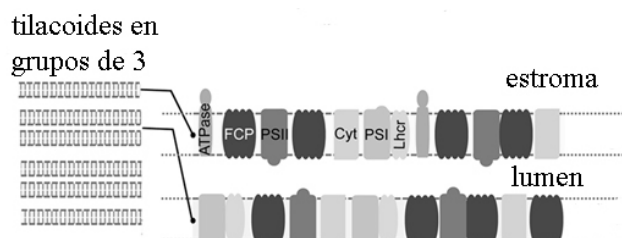


Figura 4.19: Diagrama de la organización de la membrana del tilacoide de la diatomea modelo *Phaeodactylum tricornutum* mostrando los dos fotosistemas (FSI y FSII), el complejo citocromos b_6/f , los complejos antena asociados al FSII (FCP-Lhcf) y PSI (Lhcr) y la ATP sintetasa. Modificado a partir de Herbstová *et al.* (2017).

De la vía de asimilación de dióxido de carbono (Ciclo de Calvin-Benson) se registraron dos proteínas de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO), una de la subunidad pequeña y dos isozimas de la activasa Cbbx de dicha enzima. Las diatomeas poseen RUBISCO del tipo ID (Whitney *et al.* 2011) con una alta especificidad (K_m bajo y τ elevado) para discriminar entre CO_2 y O_2 en el sitio activo (Tortell 2000). Esta elevada especificidad es uno de los argumentos que se utiliza para explicar la dominancia temprana de las diatomeas en las sucesiones fitoplanctónicas (Reynolds 1993, Tortell 2000).

Las únicas enzimas intermediarias del ciclo de Calvin detectadas en el proteoma fueron una gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, una fosfoglicerato quinasa y una de las isoformas de la transcetolasa (Uniprot B7FUU0)

probablemente relacionada con la regeneración de la ribulosa-1,5-difosfato en el cloroplasto.

Si bien existe una prolífica documentación sobre la vía C-4 de asimilación de C en las diatomeas, solo se registró un precursor de la isozima plastidial piruvato carboxilasa (*Pyc2*) que convierte el piruvato a oxalacetato (Kroth *et al.* 2008). No se encontró la enzima carboxilante fosfoenolpiruvato carboxilasa (Obata *et al.* 2013, Wagner *et al.* 2017). La vía C-4 funciona como un mecanismo concentrador de CO₂ (Reinfelder *et al.* 2004). Varios autores señalaron que los factores ambientales tales como la intensidad lumínica o la concentración de dióxido de carbono no tendrían incidencia sobre la vía de asimilación de carbono utilizada (C-3 o C-4), pero sí podrían diferir interespecíficamente (Granum *et al.* 2005, Roberts *et al.* 2007, Matsuda & Kroth 2014).

Pese a la elevada especificidad de la RUBISCO de diatomeas, se ha detectado actividad fotorrespiratoria (Kroth *et al.* 2008). Winkler & Stabenau (1995) propusieron para algas la existencia de dos enzimas de oxidación del glicolato: una mitocondrial, la glicolato deshidrogenasa en Chlorophyceae, Prasinophyceae, Cryptophyceae y Bacillariophyceae, y una glicolato oxidasa en el peroxisoma en Chrysophyceae, Eustigmatophyceae, Raphidophyceae, Xantophyceae y Rhodophyceae. Tanto en *P. tricornutum* como en *T. pseudonana* se reportaron proteínas con actividad glicolato oxidasa, aunque la localización celular asignada difiere entre los distintos autores entre peroxisomal o mitocondrial. En ambas diatomeas, las enzimas de síntesis de serina están en la mitocondria (Rosenwasser *et al.* 2014). En este trabajo se observó la presencia de una glicolato oxidasa y una serinahidroximetil transferasa en la mitocondria (**Figura 4.20**).

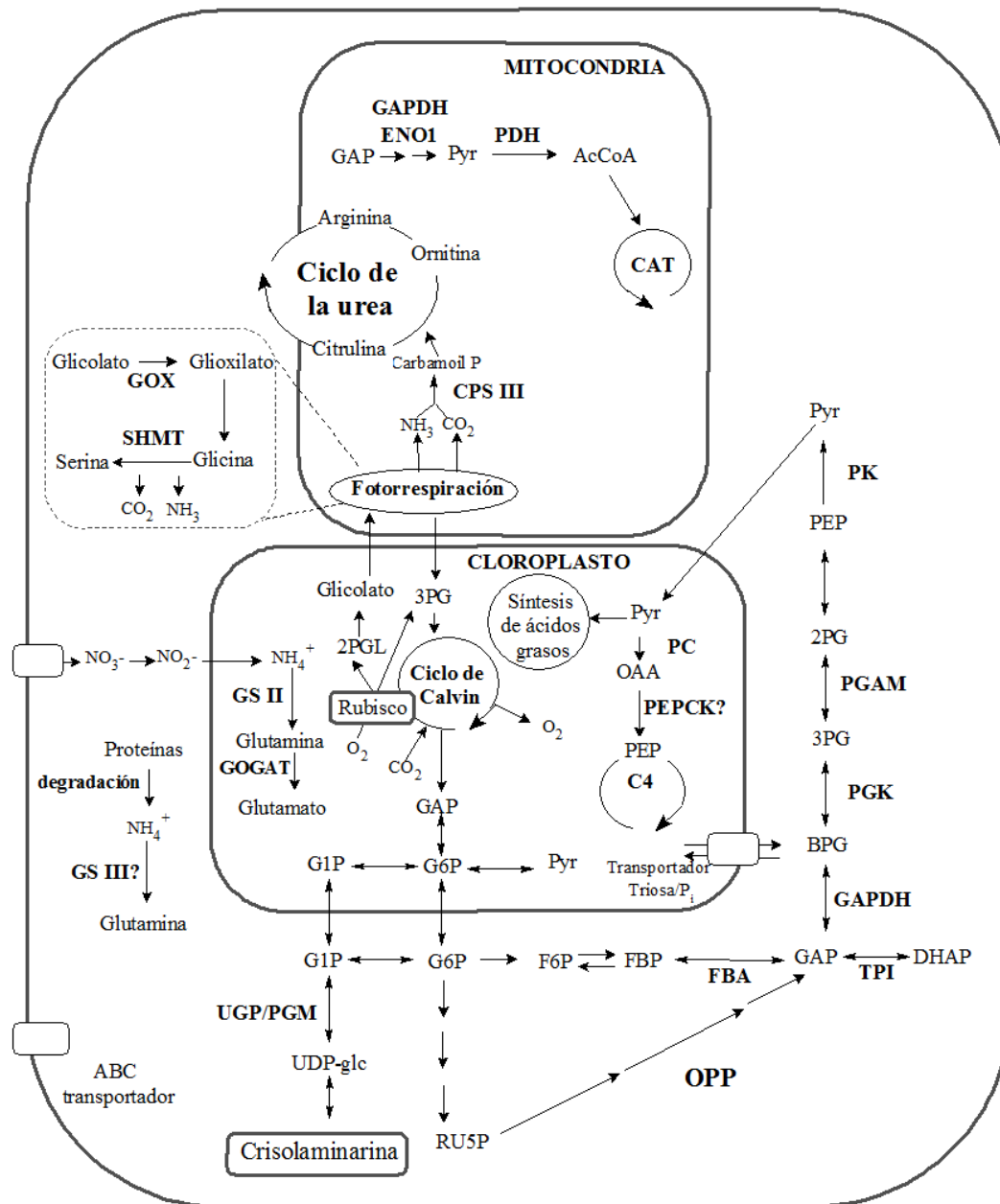


Figura 4.20: Esquema del metabolismo de los hidratos de carbono y la fotorrespiración propuesto para *H. luciae*. 2PG: 2-fosfoglicerato, 2PGL: 2-fosfoglicolato, 3PG: 3-fosfoglicerato, AcCoA: acetil-CoA, BPG: 1,3 difosfoglicerato, CPS III: carbamoil-fosfato sintetasa 3, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, ENO1: α -enolasa 1, F6P: fructosa-6- fosfato, FBA: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, FBP: fructosa-1,6-bisfosfato, G1P: glucosa-1-fosfato, G6P: glucosa-6-fosfato, GAP: gliceraldehído-3-fosfato, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GOGAT: glutamato sintetasa, GOX: glicolato oxidasa, GS: glutamino sintetasa, P_i: fósforo inorgánico, PC: piruvato carboxilasa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PEP: fosfoenolpiruvato, PGAM: fosfoglicerato mutasa, PGK: fosfoglicerato quinasa, PK: piruvato quinasa, OAA: oxalacetato, OPP: vía oxidativa de las pentosas fosfato, Pyr: piruvato, RU5P: ribulosa-5-fosfato, Rubisco: ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, SHMT: serina hidroximetil transferasa, TPI: triosa fosfato isomerasa, UGP/PGM: UDP-Glucosa-pirofosforilasa / fosfoglucomutasa, UDPglc: UDP-Glucosa.

En un trabajo reciente, Schmitz *et al.* (2017) propusieron que el glicolato originado por fotorrespiración sería metabolizado en la mitocondria vía una glicolato oxidasa. De acuerdo con ello, una diatomea ancestral, en lugar de usar las dos enzimas de oxidación pre-existentes (glicolato deshidrogenasa y glicolato oxidasa), habría desarrollado una tercer alternativa: una glicolato oxidasa mitocondrial, con una función análoga a la glicolato oxidasa peroxisomal pero capaz de utilizar aceptores de electrones diferentes del O₂. Téngase en cuenta que la glicolato oxidasa peroxisomal genera peróxido de hidrógeno utilizando el O₂ como aceptor de electrones en la oxidación del glicolato a glioxilato.

Distribución del carbono en diatomeas

La glucólisis en diatomeas presenta una organización compleja, y puede ocurrir en forma parcial en tres compartimentos celulares: el citoplasma, el cloroplasto y la mitocondria (Kroth *et al.* 2008, Fabris *et al.* 2012, Smith *et al.* 2012). Más aun, los genomas de diatomeas secuenciados a la fecha difieren en los pasos de la vía glicolítica asignada a cada compartimento (Smith *et al.* 2012).

La glucólisis se divide en una etapa inicial con gasto de ATP de activación y una final que rinde un neto de ganancia energética y de NADH. La mayoría de las reacciones de esta vía son reversibles, salvo por algunas enzimas con un papel regulatorio clave como la fosfofructo quinasa o la piruvato quinasa (**Figura 4.20**).

La gluconeogénesis funciona en sentido inverso. La producción de metabolitos intermediarios (por ejemplo, el piruvato para la síntesis de ácidos grasos) no solo implica un flujo de carbono, sino también está íntimamente ligado al flujo de energía celular. Para evitar el desperdicio de ATP debe existir un balance entre la

provisión de precursores biosintéticos y la energía disponible a través de la fina regulación de las vías antagónicas glucólisis y gluconeogénesis.

Los resultados del proteoma de *H. luciae* parecen apuntar a la glucólisis como vía preferencial al momento de la cosecha de los cultivos, ya que no se pudo detectar la presencia de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa ni de la piruvatofosfato diquinasa, que llevan a cabo la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato (**Tabla 4.13, Figura 4.20**). Sin embargo, se observó la presencia de un precursor de la piruvato carboxilasa que junto con la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa inicia la gluconeogénesis en células animales, aunque estos resultados preliminares no permiten asignarle una función cierta.

Se identificaron tres isozimas fosfoglicerato quinasa. Según Smith *et al.* (2012), en las diatomeas existe una sorprendente diversidad de este gen, que habría surgido de diversos orígenes y habría sido duplicado y re-dirigido a distintos compartimentos celulares. En efecto, una de las isozimas detectadas (Uniprot B5YN92) es plastidial, mientras que la PGK5 (Uniprot B8LCF8) es citoplasmática.

Es interesante notar que el proteoma reveló dos enolasas (*Eno1* y *Eno2*). La isozima *Eno1* mitocondrial aparece en *P. tricornutum*, *F. cylindrus* y *T. pseudonana* (Smith *et al.* 2012). Su gen es semejante al de otros heterocontos y al del cromalveolado *Emiliana huxleyi*. La isozima *Eno2* sería citosólica en diatomeas céntricas y plastidial en pennadas (Smith *et al.* 2012) como es el caso de *H. luciae*.

Un hallazgo importante mostró que los genes de la etapa final de la glucólisis estaban duplicados (desde gliceraldehído-3-fosfato a piruvato) y que sus respectivas isozimas habrían sido importadas a la mitocondria (Kroth *et al.* 2008),

lo que esencialmente posibilita la generación de piruvato en la mitocondria sin la necesidad de importarlo del citoplasma. Se pudieron relacionar dos isozimas con esta vía: una gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Uniprot B7FSI3) y la enolasa *Eno1* (Uniprot B8BZT5) de la vía Entner–Doudoroff mitocondrial (Fabris *et al.* 2012) (**Figura 4.20**).

De la vía oxidativa de la pentosa fosfato (OPP) solo se detectaron una transcetolasa y una transaldolasa citoplasmáticas. La remoción de la vía OPP del cloroplasto es característica de las diatomeas (Wilhelm *et al.* 2006, Matsuda & Kroth 2014).

Existe escasa información sobre la biosíntesis del polisacárido de reserva, la crisolaminarina. La UDP-glucosa sería el sustrato para la síntesis. En el proteoma de *H. luciae* se identificó una UDP-glucosa pirofosforilasa/fosfoglucomutasa (Uniprot B7GE51/*Ugp/Pgm*) que fue asignada a la síntesis de este glucano (Roessler 1987) (**Figura 4.20**). Recientemente, se localizó una glucano sintasa presuntamente involucrada en el transporte de la cadena del glucano hacia dentro de las vacuolas citosólicas (Gruber & Kroth 2017, Hildebrand *et al.* 2017).

La ausencia de una reserva intermedia de hidratos de carbono en el cloroplasto, junto con la presencia de las cuatro membranas circundantes, requiere de una gran capacidad de transporte desde el plasto al citosol y las vacuolas. De manera relacionada, se observó una proteína transportadora antiporte triosa P/Pi en la membrana del cloroplasto (Uniprot B7FPD9/*Tpt1*). Recientemente, se han descrito varios transportadores que permiten el pasaje de triosas fosfato a través de las cuatro membranas plastidiales (Facchinelli & Weber 2011, Moog *et al.* 2015).

Del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) se registraron tres proteínas en los proteomas de *H. luciae*, incluyendo la piruvato deshidrogenasa (**Figura 4.20**). Este ciclo se interconecta con el ciclo de la urea en la mitocondria (Nunn *et al.* 2009, Obata *et al.* 2013, Rosenwasser *et al.* 2014), del cual el proteoma de *H. luciae* exhibió dos isozimas de la carbamoil-fosfato sintetasa (**Tabla 4.13, Figura 4.20**). En la mayoría de los organismos, el ciclo de la urea interviene en la excreción de los residuos nitrogenados producto del catabolismo de proteínas. Sin embargo, las diatomeas pueden utilizar la urea como fuente primaria de nitrógeno (Peers *et al.* 2000) y este ciclo provee de metabolitos intermediarios para otras vías (como la ornitina para la síntesis de poliaminas de cadena larga que intervendrán en la silificación del frústulo) (Kröger *et al.* 2000). Rosenwasser *et al.* (2014) identificaron cisteínas sensibles al potencial redox celular en la carbamoil-fosfato sintetasa y en enzimas plastidiales de la vía de asimilación de nitrógeno como la glutamino sintetasa. Según estos autores, ante una situación de estrés oxidativo se activaría la vía mitocondrial de asimilación de nitrógeno a través del ciclo de la urea, mientras que en condiciones normales funcionaría la vía plastidial glutamina sintetasa/ glutamato sintasa.

Como se mencionara anteriormente, el carbono fijado en las diatomeas se reparte entre las reservas de polisacáridos, como la crisolaminarina (Kroth *et al.* 2008), y las de lípidos, especialmente triacilglicéridos (TAGs), en vacuolas citoplasmáticas (Zulu *et al.* 2018 y bibliografía allí citada). Dado que el contenido de TAGs oscila entre 25 y 30 % de la biomasa pudiendo alcanzar hasta 60 %, la selección de especies de diatomeas oleaginosas o la transformación de cepas y la puesta a punto de las condiciones de cultivo han tenido creciente interés en los últimos años con la finalidad de obtener materia prima para biodiesel (Yu *et al.*

2009, Popovich *et al.* 2012, Smith *et al.* 2012, Valenzuela *et al.* 2012, 2013, Daboussi *et al.* 2014, Barnech Bielsa *et al.* 2016, Martín *et al.* 2016, Sayanova *et al.* 2017, Zulu *et al.* 2018). Como se observó en la **Sección 1**, la acumulación de lípidos ocurre una vez concluida la fase de activo crecimiento del cultivo, o bien en condiciones de deficiencia de nutrientes.

La biosíntesis de ácidos grasos en diatomeas es semejante a la de plantas superiores (Ke *et al.* 2000). El precursor es la acetil-coenzima A (AcCoA) que se encuentra en diferentes compartimentos celulares: cloroplasto, mitocondria, citoplasma y peroxisomas (Leonardi *et al.* 2005). En el cloroplasto, una de las vías de generación de AcCoA es a través de la decarboxilación del piruvato por la piruvato deshidrogenasa seguida de la síntesis de malonilCoA por la acetilCoA carboxilasa (**Figura 4.21**).

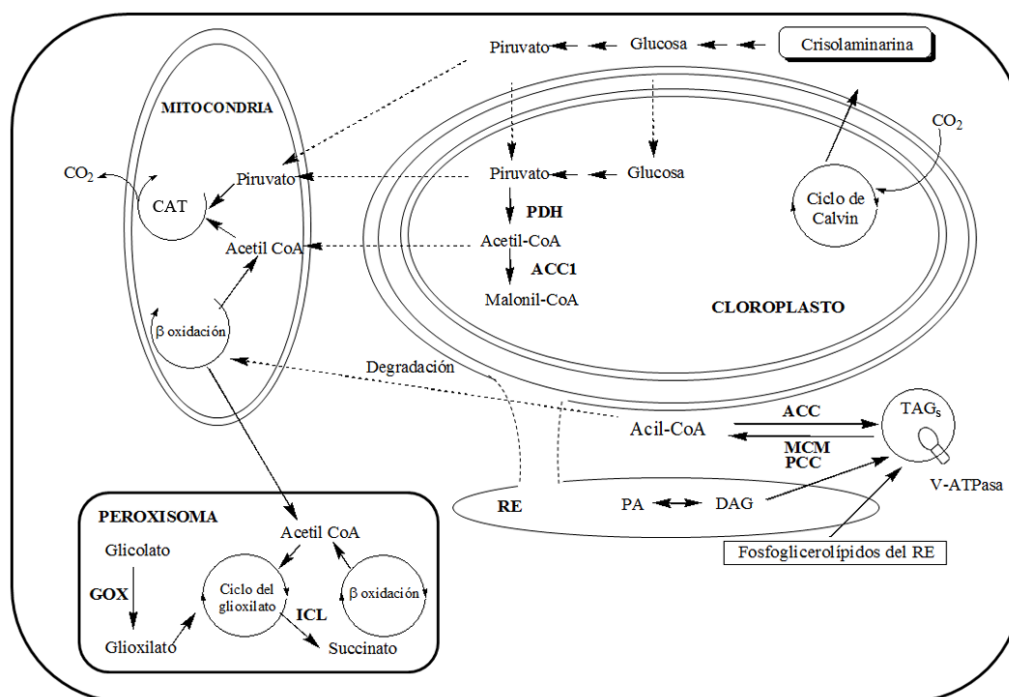


Figura 4.21: Esquema del metabolismo de la acumulación de lípidos. ACC1: acetil CoA carboxilasa, DAG: diacilglicérido, GOX: glicolato oxidasa, ICL: isocitrato liasa, PA: ácido fosfatídico, RE: retículo endoplasmático, TAGs: triacylglicérido, PCC: propionilCoA carboxilasa, MCM: metilmalonilCoA mutasa.

Se describió una ruta semejante en la mitocondria para *P. tricornutum* (Ma *et al.* 2014) a través de experiencias de *knockdown* génico demostrando la contribución de la AcCoA mitocondrial en el metabolismo de los lípidos. Adicionalmente, se describió una isozima AcCoA carboxilasa citoplasmática en diatomeas (Tanaka *et al.* 2015). En el proteoma de *H. luciae* se detectaron dos isozimas de la AcCoA carboxilasa, una de las cuales fue caracterizada como la isozima *ACC1*, de localización plastidial (**Figura 4.21**).

Lamentablemente en el proteoma no aparecieron otras enzimas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos ni de TAGs, excepto por una proteína de la síntesis de sulfolípidos. Por otro lado, en los cultivos en medio completo, se detectaron enzimas de la vía catabólica (propionilCoA carboxilasa y metilmalonilCoA mutasa) (**Figura 4.21**).

El ciclo del ácido glioxílico en el peroxisoma (Buchanan *et al.* 2000) es una variación del CAT para el reciclado y reasimilación de moléculas orgánicas (Beier *et al.* 2015). La enzima que abre la entrada al ciclo del glioxilato es la isocitrato liasa, detectada en las células provenientes de medio completo de *H. luciae* (**Tabla 4.13**). La función del ciclo del glioxilato sería por un lado recuperar los dos átomos de carbono del glioxilato producto de la fotorrespiración y por el otro, asimilar la AcCoA de la β -oxidación de ácidos grasos (Kroth *et al.* 2008) (véase más adelante).

Las diatomeas, al igual que todos los organismos fotoautótrofos, sintetizan todos los aminoácidos esenciales utilizando los esqueletos carbonados derivados del metabolismo central del carbono (ciclo de carbono, OPP, glucólisis, CAT, fotorrespiración) y particularmente, el ciclo de la urea (Bromke *et al.* 2013).

En el proteoma distinguimos dos enzimas de la vía de asimilación de nitrógeno inorgánico: la glutamino sintetasa y la glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina (**Figura 4.20**). La glutamino sintetasa también actúa asimilando el NH_4^+ producto del catabolismo de aminoácidos, como por ejemplo la glicina (Takabayashi *et al.* 2005). Hay reportadas 3 isoformas de esta enzima localizadas en diferentes organelas (Takabayashi *et al.* 2005). Para diatomeas fueron descritas las isoformas GSII en el cloroplasto y la GSIII en el citoplasma. Una tercera isoforma, la GSI fue detectada para hongos y plantas vasculares encontrándose transcritos para *T. pseudonana*, sin evidencia de que la enzima sea funcional (Takabayashi *et al.* 2005).

Nótese que en el proteoma aparecen dos enzimas relacionadas con el catabolismo de glicina en la mitocondria (Proteína P y una aminometil transferasa) (**Tabla 4.13**) al igual que una carbamoilfosfato sintetasa relacionada con la síntesis de arginina (Rosenwasser *et al.* 2014).

En cuanto a la síntesis de proteínas, se detectaron principalmente proteínas relacionadas con las subunidades ribosomales citoplasmáticas, mitocondriales y plastidiales y algunas proteínas de plegado y transporte a través de membrana. También se vieron enzimas del catabolismo proteico.

Se observaron varias proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas (**Tabla 4.13**), como cadenas de clatrina y proteínas coatómeras. Las proteínas que recubren las vesículas del transporte intracelular actúan en la comunicación e intercambio de moléculas entre los distintos compartimentos en las vías endocítica y secretora. Esta cubierta proteica define el tipo de vesícula. Por ejemplo, la clatrina recubre vesículas endocíticas (Fan *et al.* 2015). Nunn *et al.* (2009) señalan que la clatrina suele aparecer en forma abundante en los proteomas de diatomeas.

Las proteínas coatómeras (complejo COPI) está involucrado en los movimientos intra-Golgi y el transporte retrógrado entre el Golgi y el retículo endoplasmático y el complejo COPII en el transporte anterógrado desde el retículo al aparato de Golgi.

Relacionadas con el tráfico intracelular y transporte, también se detectaron subunidades de V-ATPasas (**Figura 4.21**). Las H^+ -ATPasas vacuolares (V-ATPasas) actúan como bombas protónicas permitiendo el transporte contra gradiente y acumulación de iones en compartimentos celulares (Nelson *et al.* 2000). La acidificación de vesículas es esencial en el tráfico tanto endocítico como exocítico, en el funcionamiento del aparato de Golgi y en la homeostasis de pH intracelular (Marshansky & Futai 2008, Taylor *et al.* 2012).

En los cultivos en medio completo también apareció una proteína de la familia de los transportadores ABC. Estas proteínas intervienen en la exportación de moléculas orgánicas en diatomeas (Scherer *et al.* 2008, Carvalho *et al.* 2011). En una experiencia reciente de co-cultivo de la diatomea *P. tricornutum* y el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* se concluyó que estos transportadores actuarían en la exocitosis de las toxinas del dinoflagelado, protegiendo a la diatomea del daño celular (Zheng *et al.* 2016).

4.7.2. Proteoma de *H. luciae* bajo carencia de P y N

Como nutrientes esenciales, el N y el P junto con la sílice y el Fe, cumplen un papel crucial en la productividad y distribución de las diatomeas en su ambiente natural (Dyhrman *et al.* 2012, Rosenwasser *et al.* 2014, Muhseen *et al.* 2015). La mayor parte de las capas superficiales oceánicas presenta niveles muy reducidos de estos nutrientes minerales (Bristow *et al.* 2017). Dado que las diatomeas son

responsables de aproximadamente 40 % de la productividad primaria en los océanos (Field *et al.* 1998, Armbrust 2009, Tréguer *et al.* 2017), el éxito de estas microalgas en los ecosistemas acuáticos depende de su resistencia y de su capacidad notable para sobrevivir y proliferar aún bajo condiciones desfavorables. Ello se debe a una serie de estrategias metabólicas que les permiten superar con éxito las fluctuaciones ambientales (Muhseen *et al.* 2015). Como se mencionara más arriba, parte de la adaptabilidad y diversidad de vías metabólicas yace en el origen por endosimbiosis secundaria de su plasto y la adquisición de genes de diversos orígenes (Bowler *et al.* 2010, Cruz de Carvalho *et al.* 2016).

El estrés por deficiencia de nutrientes puede dar lugar a respuestas específicas y a respuestas generales secundarias (Brembu *et al.* 2017). Por ejemplo, una respuesta específica sería la estrategia de aumentar el número de transportadores de membrana (Hildebrand 2005, Maheswari *et al.* 2010, Bender *et al.* 2014) o la inducción de enzimas de rescate del elemento carente a partir de compuestos orgánicos intra o extracelulares. Un estudio de transcriptómica reveló que la deficiencia temprana de P en *T. tricornutum* promueve la transcripción de genes relacionados con presuntos transportadores de P (Cruz de Carvalho *et al.* 2016). Ya se ha señalado en la **Sección 1** cómo la carencia de P y de N en los cultivos estudiados indujo la actividad de fosfatasas alcalinas y proteasas, respectivamente, permitiendo el cambio a un tipo de nutrición mixotrófico. A pesar de ello, en los proteomas de las células provenientes de medios carenciados no se pudo detectar una mayor abundancia de ninguna de estas enzimas.

Por otro lado, el efecto de la carencia de P o N sobre la mayoría de los caminos metabólicos puede considerarse como una respuesta secundaria (Brembu *et al.* 2017).

La comparación de la abundancia de proteínas en los proteomas de medios carenciados respecto del control (Véase **Figura 4.18**) se ha convertido en una herramienta muy valiosa para entender la regulación global de las vías metabólicas en respuesta a las deficiencias de nutrientes esenciales (Dyhrman *et al.* 2012, Hockin *et al.* 2012, Rosenwasser *et al.* 2014, Wang *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014a,b, Muhseen *et al.* 2015, Longworth *et al.* 2016). Sin embargo, ante las carencias nutricionales, las vías metabólicas exhiben variaciones atribuidos, entre otros factores, a las diferencias interespecíficas (Hockin *et al.* 2012, Bender *et al.* 2014, Bromke *et al.* 2015) y a los diseños experimentales empleados (densidad celular inicial, la duración del período de hambreado, etc.) (véase comparación en Brembu *et al.* 2017). Esa diversidad de situaciones dificulta la interpretación de los resultados y la generalización de las conclusiones.

4.7.3. Proteoma de células cultivadas en medio carente de P

Proteínas plastidiales

En carencia de P, los proteomas de *H. luciae* mostraron una menor abundancia de las proteínas relacionadas con los complejos antena y el transporte electrónico en los dos fotosistemas, tal como también fuera informado en trabajos previos (Yang *et al.* 2013, Feng *et al.* 2015, Cruz de Carvalho *et al.* 2016, Chen *et al.* 2018). La disminución en las proteínas vinculadas con los fotosistemas y los complejos antena en una situación de estrés nutricional es favorable ya que reduce la probabilidad de generación de especies reactivas de oxígeno. Pese a ello, se detectó mayor cantidad de la enzima detoxificante ascorbato peroxidasa, que frente a la reducción de la capacidad de absorción de fotones, purga el exceso de especies reactivas de oxígeno. Estos resultados coinciden con aquellos

mencionados para otras especies de diatomeas sometidas a la carencia de P (Dyhrman *et al.* 2012, Feng *et al.* 2015).

La cuantificación colorimétrica de los pigmentos en los cultivos carenciados de P no demostró esta reducción de la maquinaria fotosintética, probablemente debido a una menor sensibilidad en el método extractivo-colorimétrico. En concordancia con ello, se observó una disminución en las proteínas relacionadas con la degradación de pigmentos (proteasas A0T0K8 y A0T0S3). Por otro lado, la cuantificación colorimétrica reveló que no hubo cambios en la relación clorofila *a* /fucoxantina, tal como lo reportaran Alipanah *et al.* (2018) en *P. tricornutum*.

Se debe recordar que bajo carencia de P disminuyeron la tasa de crecimiento y la capacidad de carga (Véase **Sección 1**). Feng *et al.* (2015) sostienen que *P. tricornutum* produce al menos dos generaciones bajo carencia total de P, utilizando reservas de P intracelular. Varios autores reportaron el reciclado (*turnover*) de fosfolípidos de membranas para utilizarlos como fuente de P (Van Mooy *et al.* 2009, Martin *et al.* 2011). Esto necesariamente traería aparejado un cambio en la organización de las membranas plastidiales, el mayor reservorio de fosfolípidos intracelular, que de acuerdo a la magnitud devendría en una menor eficiencia de captación de fotones.

En estudios de transcriptómica, se describió una promoción de la transcripción de genes relacionados con la fotosíntesis durante el estrés por deficiencia de P (Yang *et al.* 2014b) como mecanismo reparador de los fotosistemas dañados. Sin embargo, dada la diferencia de tiempo entre transcripción y traducción, puede que al momento de procesar las células no se pueda observar un incremento en la abundancia de proteínas transcriptas. Más aun, Feng *et al.* (2015) midieron un aumento del parámetro Fv/Fm, indicando que, durante el lapso de su incubación

en ausencia de P, el daño en los fotosistemas de *P. tricornutum* no había sido lo suficientemente severo como para afectar la captación de fotones.

La alteración de los fotosistemas no incidió sobre la abundancia de la RUBISCO ni sobre la producción de ATP. Nótese que aumentó la abundancia de ferredoxina-NADP reductasa (**Tabla 4.13**), lo que sugiere el funcionamiento del flujo acíclico de electrones creando el gradiente de H^+ necesario para la síntesis de ATP.

El proteoma de los cultivos de *H. luciae* sin P reveló una mayor abundancia de diversas subunidades de la RUBISCO, como fuera reportado para *P. tricornutum* y *T. pseudonana* (Dyhrman *et al.* 2012, Feng *et al.* 2015). En cambio, Chen *et al.* (2018) no observaron cambios respecto del control en *T. pseudonana*. Sin embargo, otros autores informan de la disminución de la abundancia de esta enzima en la Ochrophyta *Aureococcus anophagefferens* (Wurch *et al.* 2011). Estas diferencias pueden atribuirse a características específicas y a la variación en la extensión del período de hambreado (desde 48 h a 8 días). Por ejemplo, mientras que bajo carencia de P en *P. tricornutum* se redujo la transcripción de enzimas relacionadas con el ciclo de Calvin concomitantemente con el cese de la división celular luego de 48 h (Dyhrman *et al.* 2012, Cruz de Carvalho *et al.* 2016), en *T. pseudonana* la transcripción de los mismos genes fue promovida y la división celular se detuvo a las 124 h (Cruz de Carvalho *et al.* 2016). En los cultivos en cristalizadores, el crecimiento neto de la población de *H. luciae* en medio sin P continuó hasta los 9 días (**Sección 1**), indicando que, al igual que *T. pseudonana*, la especie aquí estudiada sería más resistente al hambreado de P.

En suma, dada la coordinación entre las etapas fotoquímica y bioquímica de la fotosíntesis, la detección de niveles mayores de RUBISCO en *H. luciae* bajo

carencia de P indicó que, al momento del procesamiento de las células, la fijación de carbono era suficiente como para sostener la biomasa del cultivo.

Metabolismo central del carbono

La deficiencia de P provocó una activación del catabolismo de hidratos de carbono, lo que se evidenció por el aumento de los niveles de varias de las enzimas de la glucólisis, como la fructosa-1,6-difosfatoaldolasa, la glicerato-3-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglicerato quinasa y la piruvato quinasa en coincidencia con los proteomas y transcriptomas previamente reportados (Dyhrman *et al.* 2012, Yang *et al.* 2014b, Wang *et al.* 2014, Cruz de Carvalho *et al.* 2016, Feng *et al.* 2015, Shih *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016a, Brembu *et al.* 2017). Cuando se comparan las vías glicolíticas de los diferentes compartimentos celulares (citoplasma, mitocondria y plastidial), los resultados son más variables (Dyhrman *et al.* 2012, Cruz de Carvalho *et al.* 2016). En *H. luciae*, tanto las proteínas de la vía citoplasmática como la mitocondrial muestran mayor abundancia, mientras que no se detectaron proteínas de la vía plastidial.

Pese al aumento de enzimas relacionadas con la glucólisis, no se acrecentaron las enzimas relacionadas con el CAT. Alipanah *et al.* (2018) reportaron que después de 72 h de hambreado de P en *P. tricornutum* no observan mayores cambios en los intermediarios metabólicos del CAT, excepto en los niveles de citrato.

Como contraposición a la vía catalítica de glucosa, se observó el aumento de una enzima de la vía biosintética de la crisolaminarina, la UDP-Glucosa-pirofosforilasa/ fosfoglucomutasa, concordando con los resultados de los espectros de MALDI de las células de medios carenciados, donde se observó un

mayor grado de polimerización del polisacárido de reserva, en especial en ausencia de P. Esta promoción de la acumulación de crisolaminarina contradice lo informado en *T. pseudonana* (Dyhrman *et al.* 2012) y *P. tricornutum* (Yang *et al.* 2014b), donde bajo condiciones análogas habría una degradación del polisacárido de reserva.

Aunque la carencia de P pueda traer aparejada una limitación de la fijación de carbono en el ciclo de Calvin, cuando la división celular cesa en la etapa estacionaria, la producción de esqueletos carbonados puede exceder los requerimientos celulares. Este exceso de carbono será almacenado en forma de crisolaminarina, como se indica más arriba, o de lípidos (véase más adelante), o bien es secretado como EPS (Hessen & Anderson 2008, Brembu *et al.* 2017). En la **Sección 1** se relacionó el aumento de la movilidad en medio carente de P con la secreción de mucílago extracelular. Una de las proteínas, la UDP-glucosa-6-deshidrogenasa, que aparece con mayor abundancia en los cultivos carenciados de P, participa en la vía de síntesis de glicosilaminoglicanos que componen las EPS (Fühning *et al.* 2015, Aslam *et al.* 2018).

La acumulación de lípidos neutros es una respuesta frecuente de las microalgas ante el estrés nutricional (Fields *et al.* 2014). De acuerdo con ello, se detectó una mayor abundancia de la AcCoA carboxilasa. Pese a que el reciclado de fosfolípidos de membranas y su sustitución por sulfolípidos y lípidos de betaína han sido frecuentemente reportados en carencia de P (Van Mooy *et al.* 2009, Martin *et al.* 2011, Dyhrman *et al.* 2012, Abida *et al.* 2015, Cruz de Carvalho *et al.* 2016, Brembu *et al.* 2017), el proteoma de *H. luciae* no presentó las proteínas relacionadas con dichas rutas biosintéticas.

La menor abundancia de proteínas ribosomales en el medio carente de P coincide con resultados anteriores (Wang *et al.* 2014, Alipanah *et al.* 2018, Chen *et al.* 2018) como consecuencia de la falta de este elemento para la síntesis del ARN ribosomal y de ATP para la síntesis de proteínas (Chen *et al.* 2018).

Otro grupo de proteínas nucleares, las histonas, aumentó su abundancia en los dos medios carenciados, si bien Chen *et al.* (2018) solo registraron aumento bajo carencia de N. Ello sugiere una activación de procesos intranucleares.

La incorporación de nutrientes y otras macromoléculas en las células eucarióticas ocurre vía endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina (Conner & Schmid 2003). Considerando que por este mecanismo las células pueden internalizar nutrientes, la mayor abundancia de la cadena pesada de la clatrina en *f/2-P* podría apuntar a una adaptación al estrés por falta de P.

4.7.4. Proteoma de células cultivadas en medio carente de N

Los estudios del efecto de la carencia de N en microalgas emplearon predominantemente transcriptómica (Wan *et al.* 2012, Bender *et al.* 2014, Alexander *et al.* 2015, Remmers *et al.* 2018) que, como se mencionara anteriormente, no necesariamente refleja los cambios a nivel de las proteínas o de los metabolitos (Nie *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2010). Los estudios de proteómica bajo carencia de N han cobrado importancia (Hockin *et al.* 2012, Rosenwasser *et al.* 2014, Muhseen *et al.* 2015, Longworth *et al.* 2016, Jian *et al.* 2017, Chen *et al.* 2018) o integrados entre transcriptómica-proteómica-metabolómica (Alipanah *et al.* 2015, Bromke *et al.* 2015, Remmers *et al.* 2018).

En *H. luciae*, al igual que en otras diatomeas, el crecimiento en deficiencia de nitrógeno produjo una reducción en la tasa de crecimiento (véase **ítem 2.2**),

conjuntamente con la acumulación de lípidos (véase **ítem 2.3.1**), la clorosis (véase **ítem 2.3.2**) y la reducción del nivel de proteínas celulares provocando un aumento de la relación hidratos de carbono/proteínas (véase **ítem 4.3.1**) (Bender *et al.* 2014 y bibliografía allí citada).

Proteínas plastidiales

Bajo carencia N los proteomas de *H. luciae* mostraron en general una menor abundancia de las proteínas relacionadas con los complejos antena y el transporte electrónico en los dos fotosistemas, tal como informaran Yang *et al.* (2013), Feng *et al.* (2015), Levitan *et al.* (2015), Jian *et al.* (2017), Chen *et al.* (2018), y Remmers *et al.* (2018). Por otra parte, la abundancia de proteínas de la degradación de pigmentos aumentó respecto del control. Estos resultados son consistentes con la reducción del contenido de clorofila y xantofilas (**Sección 1**).

La clorofila es una molécula rica en N y por lo tanto la reducción de los fotosistemas disminuye la demanda de este nutriente. Como contrapartida, se reduce la capacidad de captura fotónica y el exceso de energía lumínica puede desencadenar fenómenos de estrés oxidativo, como observaron Domingues *et al.* (2012) y Remmers *et al.* (2017, 2018). Nótese el aumento de enzimas relacionadas con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, como la ascorbato peroxidasa o de fotorrespiración como la serinahidroximetil transferasa, coincidiendo con resultados anteriores en otras especies de diatomeas (Hockin *et al.* 2012, Longworth *et al.* 2016).

La reducción en forma paralela de las proteínas de los fotosistemas junto con la RUBISCO señala una mayor desorganización plastidial que la provocada por la carencia de P, de acuerdo con la observación de la reducción de los cloroplastos

presentada en la **Sección 1** en las imágenes al microscopio y la disminución significativa del contenido de clorofila y xantofilas (Longworth *et al.* 2016, Jian *et al.* 2017, Chen *et al.* 2018). En varias especies de diatomeas, en respuesta al estrés por carencia de N se redujeron los niveles de transcripción de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de Chl_a y de los carotenoides junto con una disminución en la concentración de estos pigmentos (Bender *et al.* 2014, Alipanah *et al.* 2015).

Por otro lado, y pese al posible daño de los fotosistemas, el aumento de la ferredoxina-NADP reductasa mantendría el flujo de electrones permitiendo por un lado la síntesis de poder reductor y por otro la de ATP de acuerdo con la mayor abundancia de la ATP sintetasa, en forma semejante a lo informado para *T. pseudonana* (Jian *et al.* 2017). La coenzima reducida y el ATP son necesarios para la síntesis de lípidos y para la asimilación de NH_4^+ (véase más adelante) y en la protección del estrés oxidativo vía la ascorbato peroxidasa.

Metabolismo central del carbono

El número de esqueletos carbonados aumentará por un lado por la disminución de la demanda para la asimilación de N y por el otro por su generación a partir de distintos procesos catabólicos (Wagner *et al.* 2017). Por ello, la activación de la vía glicolítica ha sido frecuentemente reportada (Hockin *et al.* 2012, Yang *et al.* 2013, Bender *et al.* 2014, Bromke *et al.* 2015, Chen *et al.* 2018). En los proteomas de las células de *H. luciae* provenientes de cultivos en *f/2-N*, se detectaron menos enzimas de la vía glucolítica, en comparación con las células de cultivos carenciados en P. Sin embargo, las enzimas de la etapa final (enolasa, piruvato quinasa) aparecieron con mayor abundancia que en los controles y sugieren una

activación de esta vía (Bender *et al.* 2014, Alipanah *et al.* 2015, Lin *et al.* 2017, Chen *et al.* 2018). En condiciones de carencia de N, la glucólisis es la vía preferencial de degradación de glucosa por sobre la vía OPP para obtención de energía y poder reductor. Sin embargo, la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria disminuyó su abundancia, coincidiendo con lo observado por Jian *et al.* (2017).

El CAT juega un papel muy importante en la redistribución de C bajo carencia de N, ya que los esqueletos carbonados de estos cetoácidos se emplean en la reasimilación del amoníaco generado a partir de la degradación de proteínas (Bender *et al.* 2014, Remmers *et al.* 2018). En los proteomas sólo se registró un aumento de la enzima dihidrolipoamida succiniltransferasa, componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa, que lleva a cabo la descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato a SuccinilCoA. El 2-oxoglutarato se conecta con el reciclado de aminoácidos como el ácido glutámico (Hockin *et al.* 2012, Ge *et al.* 2014, Levitan *et al.* 2015), redirigiendo el nitrógeno intracelular producto del catabolismo. El reciclado de componentes celulares bajo carencia de N vía el CAT ha sido repetidamente propuesto por varios autores (Hockin *et al.* 2012, Levitan *et al.* 2015, Kim *et al.* 2017, Jian *et al.* 2017, Lin *et al.* 2017, Matthijs *et al.* 2017, Remmers *et al.* 2018).

En $f/2$ -N aumentó la abundancia de una isozima de la glutamino sintetasa, tal como fuera reportado en varios trabajos (Hockin *et al.* 2012, Bender *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014a, Longworth *et al.* 2016, Lin *et al.* 2017, Remmers *et al.* 2018). Esta isozima no estaría relacionada con la vía de asimilación de nitrato, que consume mucha energía y equivalentes de reducción difíciles de afrontar con los

fotosistemas parcialmente degradados, sino con el reciclado de amonio proveniente de las vías catabólicas.

Adicionalmente, la decarboxilación-desaminación de glicina a serina (mayor abundancia de SHMT) actuaría también como fuente de amonio y sustrato para la glutamino sintetasa.

Fue llamativo el aumento en la abundancia de un precursor de la piruvato carboxilasa. Esta enzima lleva a cabo la conversión de piruvato a oxalacetato en el primer paso de la gluconeogénesis. La operación de esta vía no puede aseverarse, al no haberse detectado la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que lleva a cabo la conversión del PEP a partir de OAA. La decarboxilación del OAA dentro del cloroplasto podría brindar el CO₂ que reaccionaría con la ribulosa-1,5-difosfato gracias a la actividad carboxilasa de la RUBISCO en el ciclo C-4 (Kroth *et al.* 2008). Por otro lado, el OAA puede ser traslocado a otros compartimentos como la mitocondria e ingresar en el ciclo CAT (Remmers *et al.* 2018).

No se debe descartar que parte del carbono sea direccionado a la acumulación de crisolaminarina (Caballero *et al.* 2016, Longworth *et al.* 2016), como lo indica el aumento de la UDP-glucosapirofosforilasa-fosfoglucomutasa. Los espectros de MALDI-TOF de *H. luciae* mostraron un rango de grado de polimerización más extendido para la crisolaminarina de los cultivos en *f*/2-N, incluyendo especies de bajo PM (Daglio *et al.* 2018). Esto coincide con la observación de un incremento de maltosa y glucosa en *P. tricornutum* bajo deficiencia de N (Remmers *et al.* 2018). En modo contrario, en *T. pseudonana* no funcionaría la biosíntesis de crisolaminarina bajo carencia de N (Jian *et al.* 2017).

La mayor abundancia de Ac-CoA carboxilasa en los medios carenciados parece apuntar a la acumulación de lípidos, como se observara en la **Sección 1**. En

concordancia con ello, se registró un aumento en dos isozimas V-ATPasa. Ante la aplicación del inhibidor específico del transporte mediado por V-ATPasas, la Bafilomicina A, Zhang *et al.* (2016b) reportaron de la disminución del número y tamaño de los cuerpos lipídicos en *P. tricornutum* juntamente con la menor expresión de genes relacionados con la biosíntesis de lípidos. Esto indica que la carencia de nutrientes en *H. luciae*, en especial de N, llevó a la etapa lipogénica del cultivo, como lo demuestran la mayor abundancia de V-ATPasas, de AcCoA carboxilasa, la cuantificación colorimétrica de lípidos y el tamaño de las gotas lipídicas.

A diferencia de las células de *f/2-P*, no se detectaron prácticamente proteínas ribosomales, excepto por una disminución de las correspondientes a la subunidad 50S de los ribosomas plastidiales. Sin embargo, se debe recordar que se registró una disminución de casi 50 % de proteínas en los dos medios carenciados (véase **ítem 4.4.1**). La degradación de proteínas ribosomales bajo deficiencia de N ha sido repetidamente informada (Longworth *et al.* 2016, Remmers *et al.* 2018), ya que pueden actuar como un reservorio de N (Acquisti *et al.* 2009). Al mismo tiempo, se observó un aumento de proteínas involucradas en la señalización y degradación de proteica, como la ubiquitina o la proteína 14-3-3, de manera similar a *P. tricornutum* bajo diversas situaciones de estrés (Clement *et al.* 2017).

El aumento de la adenosilhomo-cisteinasa, enzima de la biosíntesis de la cisteína, también registrado aunque en menor grado en las células cultivadas en *f/2-P*, es consistente con la existencia de estrés oxidativo impuesta por la deficiencia nutricional (Lin *et al.* 2017). La cisteína forma parte de proteínas ricas en cisteína (CRP, en sus siglas en inglés) y de tioles de bajo peso molecular como el glutatión (Sen & Packer 2000) que intervienen en la determinación del

potencial redox celular, el cual coordina, entre otros, la red de defensa al estrés oxidativo o la mediación en procesos de señalización y transcripción (Dalle-Donne *et al.* 2008, Rosenwasser *et al.* 2014).

En suma, estos resultados sugieren que la modificación del metabolismo de carbono bajo carencia de N en *H. luciae* ocurre como consecuencia de dos procesos. El primero se relaciona a la transferencia de nitrógeno proteico plastidial por disminución marcada del aparato fotosintético. El segundo consiste en redirigir el C fijado fotosintéticamente vía el nudo del CAT a los lípidos como destino final. Levitan *et al.* (2015) comparan esta remodelación metabólica en las células de las diatomeas con el llenado de granos en gramíneas. Durante este proceso, el nitrógeno almacenado en la hoja bandera es catabolizado y redirigido a las semillas (Bahrani & Joo 2010). En forma análoga, la movilización de N desde el cloroplasto de las diatomeas inicia la clorosis. Los esqueletos carbonados de las proteínas son redirigidos a la síntesis de lípidos. Este cambio metabólico implica la modificación del patrón de transcripción ante la señal ambiental de estrés nutricional. Rosenwasser *et al.* (2014) informaron que varias proteínas centrales del metabolismo del nitrógeno son sensibles a cambios en el potencial redox celular otorgando a las diatomeas una gran plasticidad metabólica y adaptabilidad ante cambios en el ecosistema (Wagner *et al.* 2017).

Por lo antedicho en el ítem 4.7, el estudio del proteoma de *H. luciae* en distintas condiciones de cultivo permiten afirmar la **Hipótesis 10**, a partir del extenso conjunto de evidencias aquí presentadas.



MÉTODOS

EXPERIMENTALES

Consideraciones generales

Para las evaporaciones a presión reducida se utilizó un evaporador rotatorio Büchi R-205 con temperaturas de baño de 40 °C.

Las centrifugaciones se realizaron en una Centrífuga SIGMA 4K15 refrigerada y en una microcentrífuga Eppendorf, modelo 5418.

Las lecturas de absorbancia de las determinaciones colorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jenway 6505, empleando celdas de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico.

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa acoplado a un cromatógrafo gaseoso Shimadzu QP 5050A (Shimadzu Corporation). Los espectros de masa se realizaron a un potencial de ionización de 70 eV.

Para las hidrólisis y el almacenamiento de las muestras se utilizaron viales de rosca con cierre de teflón con capacidad para 4 ml.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad en liofilizador Virtis 10-324, a presiones inferiores a 100 mTorr y a temperaturas cercanas a -45 °C.

Las extracciones se hicieron utilizando un agitador magnético Thermolyne Nuova (modelo SP 18420).

Las agitaciones se realizaron con un vortex Thermolyne Mixer II (modelo M37610-26)

Para la recolección de subfracciones de las columnas de cromatografía de permeación en gel se empleó un colector automático Bio-Rad, modelo 2110.

Las observaciones al microscopio óptico se realizaron en:

- a)** un microscopio invertido (Olympus CK40),
- b)** un microscopio con contraste interferencial (Reichert-Jung) equipado con una cámara fotográfica CANON 600D EOS,

c) un microscopio óptico Olympus BX50 (Cámara Olympus c7070) equipado con filtro para DIC (Contraste por Interferencia Diferencial),

d) un microscopio Zeiss Axioscope (Jena, Alemania) con una cámara digital (Olympus C5000, Tokyo, Japón).

Las observaciones al MEB se hicieron en un microscopio Gemini (Zeiss DSM 982) equipado con un cañón de emisión de campo y un lente detector de electrones secundarios (SE). El voltaje de aceleración de electrones (EHT) fue de 15 kV, la distancia de trabajo (WD) fue de 4 mm y el rango de aumento fue de 7000 x y 90,000 x. El material fue previamente metalizado en una metalizadora (Cressington Scientific Instruments, Reino Unido) (Centro de Microscopía Avanzada, FCEN, UBA).

La microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) se realizó en un microscopio ESEM (XL30 Philips) operando con un voltaje de aceleración de 20 kV y una presión de la cámara de 0.9 Torr.

Para sonicar se utilizó en algunos casos un baño ultrasónico (Elma LC 30 H) con frecuencia de 35 kHz y en otros un sonicador de vástago (Sonics & Material VC 50) con frecuencia de 20 kHz.

Las corridas de cromatografía gaseosa con detector FID se realizaron en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador Hewlett-Packard 3395A.

Para la espectrometría de masa UV-MALDI-TOF fue utilizado un espectrómetro de masa Ultraflex II TOF/TOF con software Flexcontrol 3.0 (Bruker Daltonics Gmbs H, Bremen, Alemania).

Para la electroforesis se utilizó una cuba (Mini-PROTEAN 3) y una fuente de poder Bio-Rad (Power 3000).

Para la separación y detección de las proteínas celulares se empleó un nano HPLC (modelo EASY-nLC 1000) equipado con una pre-columna (C18, 3 μm , 75 μm x 20 mm, modelo Acclaim Pep Map) y una columna (C18, 2 μm , 75 μm x 150 mm, modelo EASY-Spray Accucore), acoplado a un ionizador Electro Spray (modelo EASY-SPRAY) de la marca Thermo Scientific. Se utilizó un espectrómetro marca Thermo Scientific (modelo Q-Exactive), con una celda de HCD y un analizador Orbitrap.

SECCIÓN 1

MUESTREO Y CULTIVO DE ESPECIES DE DIATOMEAS

5.1. Recolección del material

El material algal se recolectó el 8 de abril de 2013 en el estuario de Bahía Blanca en la estación de muestreo de Puerto Cuatros ($38^{\circ} 44' 56''\text{S}$; $62^{\circ} 22' 51''\text{O}$), Gral. Cerri (**Figura 5.1**).

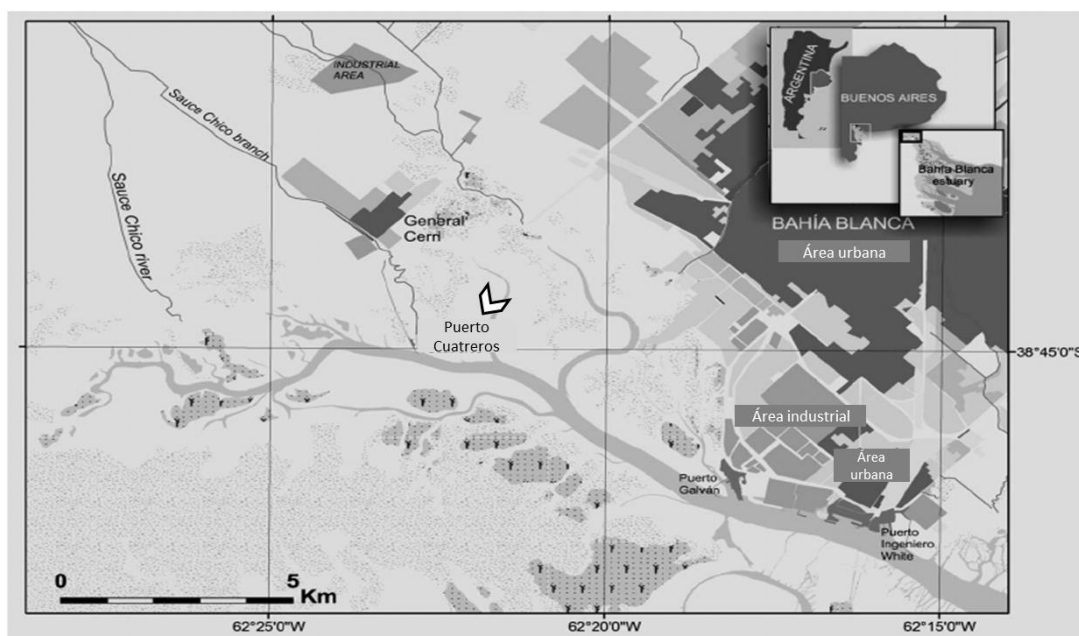


Figura 5.1: Mapa de la zona interna del estuario de Bahía Blanca, localizado al sur de la provincia de Buenos Aires. La flecha indica el sitio de muestreo, Puerto Cuatros (Mapa modificado de Spetter *et al.* 2015).

Para la medición de la temperatura superficial y la salinidad se utilizó un multisensor portable (Horiba U-10 multi-probe). En el momento de recolección de las muestras se registró una temperatura de 12°C y una salinidad de 33 psu.

5.2. Aislamiento de diatomeas a partir de muestras de los sedimentos

Se recolectaron sedimentos de la zona superficial en cajas de Petri, sobre todo a partir de sectores con una pigmentación marrón-dorada, evidencia macroscópica del crecimiento de las diatomeas bentónicas (**Figura 5.2 a-b**).

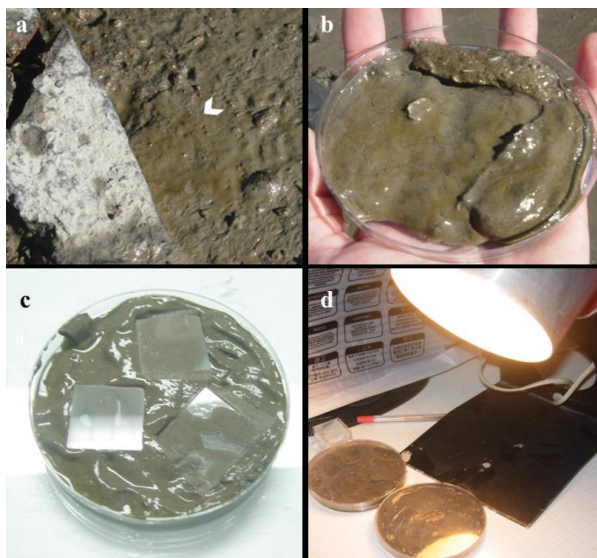


Figura 5.2: Aspecto de los sedimentos en el sitio de muestreo. (a) La flecha indica un área pigmentada donde se encontraban las diatomeas, (b) fraccionamiento de las muestras de los sedimentos en una caja de Petri, (c) colocación de los cubreobjetos sobre el papel de filtro y (d) aislamiento de las diatomeas bentónicas por fototactismo en el laboratorio.

En el laboratorio, las muestras de los sedimentos fraccionadas en cajas de Petri se homogeneizaron suavemente con una varilla de vidrio eliminando la mayor cantidad de agua posible. Luego, en cada caja de Petri, se depositaron sobre la superficie del barro tres trozos de papel Whatman®105 y sobre cada uno de ellos un cubreobjeto, presionando con suavidad (**Figura 5.2.c**). Las cajas de Petri se incubaron bajo una lámpara de 60 watts (**Figura 5.2d**) durante 1 h para favorecer el desplazamiento de las diatomeas hacia las capas superiores del sedimento siguiendo una respuesta fototáctica positiva. Al hacerlo atravesaron la malla gruesa del papel y se adhirieron a los cubreobjetos.

5.3. Obtención de cultivos unialgales

Los cubreobjetos se recogieron con una pinza y se colocaron en placas de 6 pocillos (volumen del pocillo: 5 ml) conteniendo el medio *f/2* (Guillard 1975). Para la preparación del medio se utilizó agua de mar artificial comercial (Instant Ocean[®]) al 30 ‰ esterilizada en autoclave. Luego, en cámara de flujo laminar, se adicionaron los volúmenes correspondientes de las soluciones de macro y micronutrientes (**Tabla 5.1.**)

Tabla 5.1: Composición del medio *f/2* con salinidad modificada al 30 ‰. Los valores se expresan como concentraciones finales por litro de medio de cultivo.

Macronutrientes	Concentración (μM)
NaNO ₃	882
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	36,2
Na ₂ SiO ₃	106
Micronutrientes	Concentración (μM)
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	11,7
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	11,7
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,91
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,0765
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,042
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,0394
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	0,026
Vitaminas	Concentración (μM)
Biotina	2,05
Tiamina	296
Cianocobalamina	0,369

El pH final fue de 8,00. Las placas se colocaron bajo una fuente lumínica ($100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con un régimen de fotoperíodo 12:12 h luz:oscuridad dentro de una cámara termostatzada en el rango 13-16 °C.

El crecimiento de las diferentes especies obtenidas a partir de los sedimentos se siguió al microscopio invertido. Periódicamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio se tomaron alícuotas de los pocillos para iniciar el aislamiento unialgal por el método de dilución en gota (González *et al.* 1995). Las diferentes alícuotas se transfirieron a placas de 24 pocillos de 1 ml de capacidad conteniendo el medio *f*/2.

Aproximadamente al mes, las células se transfirieron a tubos de ensayo con tapa a rosca repitiendo el método de dilución en gota.

El crecimiento de las diatomeas fue más abundante que en las placas de pocillo, observándose en las paredes de los tubos sectores pigmentados de diatomeas adheridas al vidrio entre los 10 y 12 días.

Periódicamente se tomaron alícuotas de los tubos a fin de iniciar la identificación de las especies aisladas mediante observación al microscopio.

5.4. Identificación de las especies de diatomeas

La identificación del material se realizó sobre preparados permanentes para microscopía óptica o MEB y referencia a las claves y descripciones de distintas fuentes bibliográficas (Krammer & Lange-Bertalot 1988, Round *et al.* 1990, Lange-Bertalot 2001, Levkov 2009).

5.4.1. Preparados permanentes para microscopia óptica

Para la obtención de los preparados permanentes de diatomeas se aplicó el método de Battarbee (1986) de oxidación de la materia orgánica. Se colocó 1 ml de los cultivos algales en medio *f/2* en tubos Falcon de plástico de 15 ml y se separaron las células por centrifugación suave durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 5 ml de agua oxigenada (30 vol.). La oxidación prosiguió con calentamiento en baño maría en el microondas (potencia 80 %) durante 5 min. Inmediatamente se centrifugó y los precipitados celulares se lavaron al menos tres veces con agua destilada. Para garantizar la oxidación completa de los frústulos, la oxidación se repitió al menos cinco veces o hasta verificar la ausencia de materia orgánica en las muestras al microscopio.

A fin de separar las valvas para realizar vistas internas, parte del material oxidado se sometió a un pulso de 20 seg en un baño ultrasónico.

Los preparados permanentes se montaron en un medio con alto índice de refracción (Naphrax). Para ello, se secó sobre una placa térmica una gota de la suspensión de material oxidado colocado sobre un cubreobjetos totalmente desengrasado. El medio de montaje (1 o 2 gotas) se agregó a un portaobjetos que se invirtió inmediatamente sobre el cubreobjetos con la muestra seca. Las burbujas de aire se eliminaron flameando suavemente el preparado, hasta el punto de fusión de la resina. Se presionó levemente con un objeto de punta roma y se eliminó el exceso de resina de los bordes limpiando con tolueno.

Las imágenes se obtuvieron en microscopio con contraste interferencial.

5.4.2 Preparación del material para microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se colocó una gota del material oxidado (véase ítem 5.4.1) sobre una cinta de cobre. Luego se lo secó al aire, protegiendo el material para evitar la contaminación con polvo ambiental. Finalmente, se procedió a la metalización de la muestra con una capa de platino de 20 nm de espesor para su posterior observación al MEB.

5.5. Obtención de cultivos axénicos de *Halamphora luciae*

5.5.1 Tratamiento por ultrasonido

A fin de disgregar los cúmulos de células de *Halamphora luciae* inmersas en mucílago, las suspensiones se sometieron a sonicación en el baño ultrasónico durante 1 min. La aparición de daño celular debida al tratamiento se controló al microscopio en muestras tomadas a diferentes tiempos. El material sonificado se centrifugó y posteriormente se inoculó en placas de Petri con medio *f*/2 agarizado. A la semana, se picaron las colonias aisladas en tubos con medio *f*/2 para obtener cultivos en suspensión que se emplearon en el tratamiento posterior con antibióticos.

5.5.2. Tratamiento con antibióticos

La solución de antibióticos conteniendo 100 mg de penicilina G (1200000 U) y 50 mg de sulfato de estreptomicina se esterilizó por ultrafiltración (González *et al.* 1995). Se colocó 1 ml de los cultivos en suspensión obtenidos (véase ítem 5.5.1)

en erlenmeyers de 50 ml con 40 ml de medio de cultivo *f/2* conteniendo entre 0,05-0,8 % (v/v) de la solución de antibióticos. Transcurridas las 48 horas, se cosecharon las células por centrifugación (5 min, 220 x *g*). Las diatomeas se repicaron en tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo *f/2*. Los cultivos libres de bacterias se obtuvieron empleando concentraciones de la solución de antibióticos entre 0,2-0,8 % (v/v).

BIOENSAYOS

5.6. Cultivo de *H. luciae* con diferentes relaciones de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo

Para iniciar las experiencias utilizando diferentes relaciones de P y N, las células de cultivos en crecimiento exponencial se lavaron repetidamente con agua de mar artificial (30 ‰) para finalmente pre-incubarlas durante 2 días en el medio de lavado a fin de agotar las reservas intracelulares de P y N. Al cabo de este período de hambreado, las experiencias se iniciaron en placas de pocillos (5 ml de medio de cultivo) o en cristalizadores de 100 ml (40 ml de medio de cultivo) de acuerdo al diseño experimental a aplicar.

El medio *f/2* para cada tratamiento se preparó empleando las relaciones iniciales de P:N indicadas en la **Tabla 5.2**. En todos los casos, se realizaron triplicados de las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 5.2: Concentración inicial de P y N en el medio control (*f/2*) y los tratamientos A1-5.

Medio de cultivo	N (μmoles^{-1})	P (μmoles^{-1})
<i>f/2</i>	883	36
A1	883	9
A2	221	36
A3	0	0
A4	0	36
A5	883	0

El crecimiento algal se estimó por relevamiento del número de células en al menos diez campos ópticos de 1 mm^2 de superficie seleccionados al azar al microscopio invertido equipado con una cámara de video. Los recuentos celulares se realizaron sobre microfotografías a 1000 aumentos utilizando el programa TS View.

La tasa de crecimiento exponencial (*r*) se estimó por ajuste mediante cuadrados mínimos a la recta obtenida por transformación logarítmica de los datos (Wood *et al*, 2005).

Las distintas fases de crecimiento que se tuvieron en cuenta a lo largo del trabajo son las siguientes: fase exponencial temprana (5 días), exponencial tardía (10 días), estacionaria temprana (15 días) y estacionaria tardía (25 y 35 días).

5.7. Determinación de lípidos totales

5.7.1. Preparación de la curva estándar

Para las curvas estándar utilizamos aceite de oliva extra virgen ($0,92 \text{ g ml}^{-1}$ de lípidos totales), aceite de coco ($0,94 \text{ g ml}^{-1}$ de lípidos totales) y una mezcla 1:1 de

ambos aceites. Estos aceites fueron seleccionados debido a su composición lipídica, con una mayor proporción de ácidos grasos saturados en el caso del aceite de coco (> 90 %, principalmente ácido láurico) y de ácidos grasos mono y poliinsaturados en el caso de oliva (> 60 % de ácidos grasos monoinsaturados, en su mayoría ácido oleico). A partir de una solución de 1 mg ml⁻¹ de lípidos se cuantificó un rango de lípidos entre 20-70 µg.

5.7.2. Extracción de los lípidos totales

La extracción de lípidos totales se realizó a partir de 10-20 mg de células de *H. luciae* cultivadas durante 10 y 20 días en medio *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P*. Las células se centrifugaron en microcentrífuga durante 10 min (500 x *g*), descartando luego el sobrenadante y obteniendo el peso fresco.

A cada tubo Eppendorf se le agregó una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, 500 µl), posteriormente se los sonicó bajo hielo con un sonicador de vástago (4 pulsos de 15 seg) y finalmente cada muestra fue filtrada en un vial.

Se agregaron 300 µl de agua destilada a cada vial, agitando con vortex y descartando la fase superior (acuosa) con pipeta Pasteur. Este último paso se realizó 2 veces más. Por último se llevaron a sequedad todos los viales y se le agregó a cada uno 500 µl de cloroformo:metanol (2:1).

5.7.3. Reacción colorimétrica de la sulfo-fosfo-vainillina

Se utilizó la reacción colorimétrica de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV de sus siglas en inglés) modificada de Mishra *et al.* (2014), ya que es una técnica rápida y que requiere escasa cantidad de material algal.

El reactivo de fosfo-vainillina (0,016 M) se preparó disolviendo 2,43 g de vainillina en una solución acuosa 0,44 M de fosfato de potasio monobásico con agua destilada con agitación constante durante 1 hora (300 rpm).

A 100 µl del extracto lipídico obtenido en el ítem anterior se le agregó 1 ml de H₂SO₄ concentrado, mezclando con vortex y luego colocando durante 10 min en baño de agua a 100 °C. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se agregaron 2,5 ml del reactivo de vainillina, mezclando con vortex y dejando enfriar hasta temperatura ambiente.

En aquellos tubos donde se observó turbidez, se tomó un 1 ml de la solución para centrifugar en microcentrífuga (5 min, 4000 x g). La absorbancia fue leída a 530 nm.

5.8. Determinación de la composición de pigmentos fotosintéticos

Las células cosechadas por centrifugación en tubos Eppendorf se resuspendieron en 1 ml de acetona al 80 %. Se agitaron vigorosamente hasta observar un color verde homogéneo. Se recogió el extracto acetónico en un tubo de ensayo, repitiendo la extracción sobre el pellet celular hasta lograr su total decoloración (Strickland & Parsons 1972).

Los sobrenadantes se reunieron y se normalizó el volumen a 5 ml, leyendo la absorbancia a 470, 581, 630, 631, 647, 664 y 691 nm a fin de cuantificar los pigmentos fotosintéticos mediante las siguientes fórmulas (Ritchie 2008):

$$\text{Clorofila } a = -0,39 A_{630} - 1,7485 A_{647} + 11,9442 A_{664} - 1,4306 A_{691}$$

$$\text{Clorofila } c1 + c2 = 23,5902 A_{630} - 7,8516 A_{647} - 1,5214 A_{664} + 1,7443 A_{691}$$

$$\text{Fucoxantina} = [A_{470} - 1,239 (A_{631} + A_{581} - 0,3 A_{664}) - 0,0257 (A_{664})] / 141$$

Los valores se expresaron como μg de pigmento mg^{-1} peso fresco.

5.9. Morfometría

Las mediciones morfométricas se hicieron sobre las imágenes de MEB y de microscopio óptico (con filtro para la técnica de DIC) empleando el programa **SigmaScan® Pro 5.0**. Se consideraron los siguientes caracteres diagnósticos para la especie: el ancho y el largo de las valvas, el número de estrías en $10\ \mu\text{m}$, el número de areolas en $1\ \mu\text{m}$ de estrías dorsales, el largo de 10-20 areolas en la cuarta y quinta estría contando desde la fisura del rafe proximal hacia los polos (Levkov 2009). Las mediciones se realizaron en al menos 100 valvas.

5.9.1. Biovolumen y área total de las células de *H. luciae*

Se calculó el biovolumen y el área de la célula según Sun & Liu (2003) en al menos 100 valvas, aplicando las fórmulas correspondientes a la forma cimbeloide. Luego del tratamiento de oxidación y dada su asimetría, los frústulos se depositaron casi siempre con el cingulo ventral más angosto y ambos rafe hacia arriba.

Para el cálculo morfométrico de la forma cimbeloide se midieron los ejes apical y pervalvar. Consideramos el ancho de valva como equivalente al eje transapical (**Figura 5.3**).

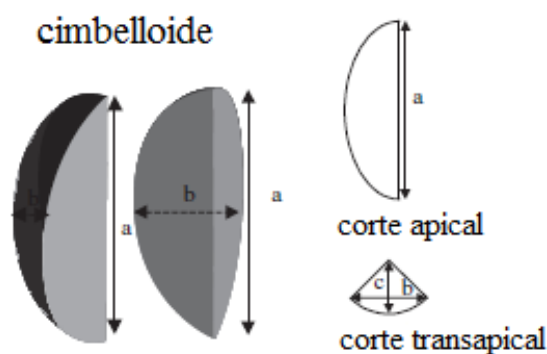


Figura 5.3: Valores morfométricos analizados en el trabajo, **a:** eje apical, **b:** eje pervalvar, **c:** eje transapical. Imagen modificada de Sun & Liu (2003).

5.10. Velocidad de desplazamiento y porcentaje de células en movimiento

La velocidad promedio de las células seleccionadas al azar se determinó en imágenes capturadas en filmaciones de 20-30 seg de duración grabadas con el programa AMCap (versión 2004). Se calculó la velocidad de desplazamiento con el programa de dominio público Image J (versión 1.50i), fijando la distancia entre la posición inicial y final en el correspondiente intervalo de tiempo. La velocidad se expresó como $\mu\text{m s}^{-1}$. Además se calculó el porcentaje de células en movimiento en un área de $0,2 \text{ mm}^2$. Todos los valores se expresaron como la media $\pm$ desvío estándar ($n= 20$).

5.11. Cinética de producción de s-EPS

La cinética de liberación de s-EPS de *H. luciae* cultivada en cristalizadores conteniendo medio $f/2$, $f/2\text{-N}$ y $f/2\text{-P}$ se determinó mediante la cuantificación de hidratos de carbonos totales (Dubois *et al.* 1956, véase ítem 5.20) en alícuotas de $200 \mu\text{l}$ de medio de cultivo libre de células tomadas a los 2, 15 y 25 días.

5.12. Tinción con azul de toluidina del mucilago extracelular

Se colocaron cubreobjetos en el fondo de los cristalizadores conteniendo medio *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N* durante 10 días. Luego se retiraron cuidadosamente con una pinza de punta fina y se tiñeron con una solución acuosa de azul de toluidina al 0,05 % en buffer acético:piridina (pH 4,50) durante 30 min para permitir la observación del mucílago extracelular adherido sobre la superficie del vidrio.

5.13. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)

Las células se recogieron sobre cuatro cubreobjetos (10 mm de diámetro) previamente colocados en el fondo de los cristalizadores con los cultivos de la diatomea por un período de 15 días. En el momento de la observación al ESEM, los cubreobjetos fueron retirados con una pinza y escurridos sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de líquido. Las observaciones se hicieron por triplicado.

5.14. Medición de actividad enzimática por colorimetría

5.14.1. Actividad fosfatasa alcalina

Fundamento del método

En medio alcalino, la fosfatasa hidroliza el sustrato orgánico fosfato de *p*-nitrofenilo (*p*NPP) dando como productos fosfato de sodio libre y el *p*-nitrofenol, compuesto coloreado amarillo con un máximo de absorción a 410 nm (**Figura 5.4**). Si la concentración de sustrato empleada es tal que garantice la velocidad

máxima de la reacción enzimática la aparición de color será directamente proporcional a la actividad fosfatasa.

Fosfato de *p*-nitrofenilo

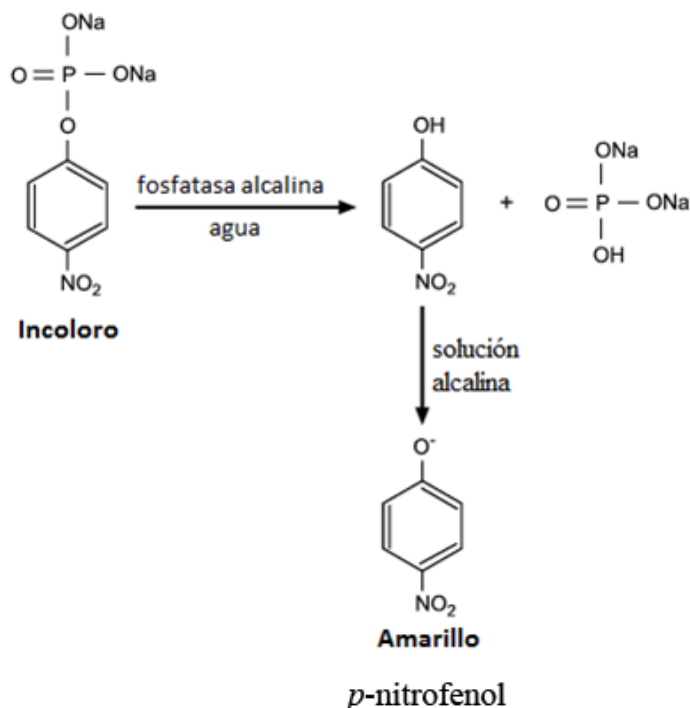


Figura 5.4: Fosfato de *p*-nitrofenilo como sustrato para la medición de la actividad fosfatasa alcalina.

Ensayo enzimático

Para la medición de la actividad enzimática, las células de *H. luciae* de cultivos en fase exponencial fueron lavadas con agua de mar artificial (véase ítem 5.6) y se pre-incubaron durante 5, 10 y 20 días en medio *f*/2 (control) y medio *f*/2-P (tratamiento) (Tabla 5.2).

Las diatomeas se cosecharon por centrifugación (15 °C, 5 min a 700 x *g*) y se resuspendieron en buffer Tris-HCl 13 mM pH 8,50 en agua de mar artificial 30 % (Hernández & Whitton 1996).

La reacción enzimática se inició con el agregado de 50 µl de sustrato (4,2 mg *p*NPP/ml) por cada mililitro de suspensión celular, incubando esta mezcla en un

agitador orbital a 37 °C. Se extrajo una alícuota de la mezcla cada 10 min durante los primeros 90 min, y posteriormente, cada 30 min hasta los 180 min. La reacción se interrumpió con el agregado de 100 µl de NaOH 4M. La mezcla de reacción se clarificó por centrifugación y se leyó la absorbancia a 410 nm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

La actividad fosfatasa se midió en 1 ml de mezcla de reacción conteniendo un volumen conocido de suspensión celular, 0,107 mM de pNPP (Hernández & Whitton 1996) y 13 mM Tris-HCl.

Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de sustrato por min de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Unidades enzimáticas (UE/LC)} = \frac{\Delta \text{Abs} \cdot V_{\text{ensayo}} \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_{\text{muestra}}}$$

Dónde: ΔAbs =absorbancia promedio; V_{ensayo} =volumen final del ensayo (ml); ϵ = coeficiente de extinción molar del pNPP ($18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); l = recorrido óptico de la cubeta del espectrofotómetro (cm); V_{muestra} =volumen de muestra (ml).

La actividad enzimática se expresó en función de las proteínas totales (Lowry *et al.* 1951) como UE $\mu\text{g proteína}^{-1} \mu\text{l}^{-1}$.

5.14.2. Actividad proteasa

Fundamento del método

La actividad proteasa se midió utilizando el sustrato artificial azocaseína, sintetizado según Charney & Tomarelli (1947).

La reacción de copulación de aminas aromáticas diazotadas con proteínas genera azoproteínas que, en medio alcalino, son coloreadas (máximo de absorción a 430 nm). La digestión de las azoproteínas por proteasas genera péptidos de menor peso molecular acoplados al cromógeno y solubles en TCA (**Figura 5.5**). Si la concentración de sustrato es tal que garantice la velocidad máxima de la reacción enzimática, la aparición de color será directamente proporcional a la actividad proteasa y puede medirse en el espectrofotómetro.

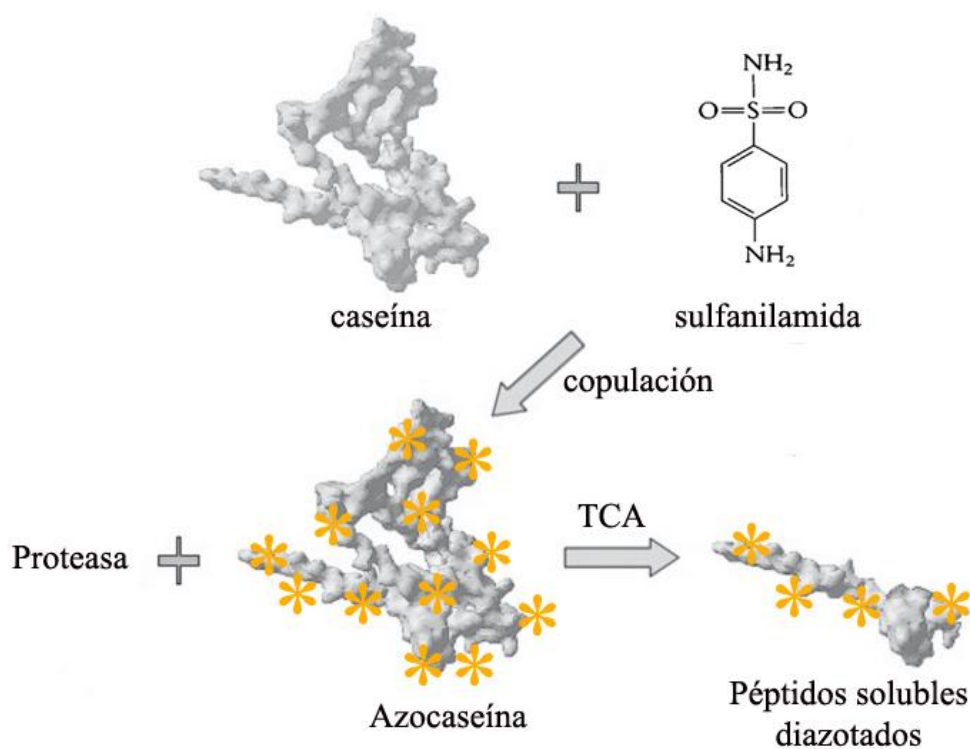


Figura 5.5: Medición de la actividad proteasa utilizando una azoproteína (azocaseína) obtenida mediante la reacción de copulación con sulfanilamida. La actividad enzimática puede cuantificarse espectrofotométricamente midiendo la aparición de péptidos coloreados solubles en TCA.

Síntesis de la azocaseína

El sustrato artificial se sintetizó en el laboratorio mediante la técnica de la sulfanilamida.

Solución A: se disolvieron agitando constantemente 25 g de caseína en 500 ml de agua conteniendo 5 g de NaHCO_3 .

Solución B: a 100 ml de agua conteniendo 3 ml de NaOH en baño de hielo y con agitación constante, se agregaron 2,5 g de sulfanilamida. Luego se añadieron 1,1 g de NaNO_2 disueltos en 10 ml de agua. Finalmente se hicieron dos agregados sucesivos de 9 ml de HCl 5 M y de 9 ml de NaOH 5 M siempre bajo agitación constante.

Luego la Solución B se agregó a la Solución A.

La azocaseína obtenida presentó un color anaranjado y precipitó por acidificación (pH 4,50). El precipitado se lavó dos veces con agua destilada y dos veces con etanol, centrifugando entre cada lavado y descartando el sobrenadante. Por último, se secó en desecador. La azocaseína sintetizada tuvo un máximo de absorbancia de 430 nm.

Ensayo enzimático

Se cosecharon las células de *H. luciae* de cultivos en fase exponencial, se lavaron con agua de mar artificial (véase ítem 5.6) y se pre-incubaron durante 5, 10 y 20 días en medio *f/2* (control) y medio *f/2-N* (tratamiento) (Tabla 5.2).

Las diatomeas se cosecharon por centrifugación (15 °C, 5 min a 700 x *g*) y se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM. La hidrólisis enzimática de la azocaseína se llevó a cabo en un tubo Eppendorf conteniendo 400 µl de mezcla de reacción, 250 µl azocaseína (2 g 100 ml⁻¹ de buffer Tris 50 mM) y 150 µl de suspensión celular. Los tubos se incubaron a 37 °C en oscuridad, tomando muestras en distintos intervalos de tiempo (0,5; 3; 6; 9; 24; 29; 45 y 50 h). En las diferentes muestras, las proteínas se precipitaron agregando 500 µl de TCA frío (5

% p/v). Luego de la clarificación por centrifugación durante 2 min ($4980 \times g$), se separó el sobrenadante al que se le agregaron 300 μ l de NaOH 2M (Pérez-Lloréns *et al.* 2003).

La formación enzimática del producto (liberación del grupo azo) se cuantificó midiendo la absorbancia a 440 nm, en tres réplicas. La actividad enzimática se expresó en función de las proteínas totales (Lowry *et al.* 1951) (UE μ g proteína⁻¹ μ l⁻¹), siendo el coeficiente de extinción molar de la azocaseína ($90,6 \times 10^6$ mM⁻¹ cm⁻¹).

5.15. Zimografía

5.15.1. Fosfatasa alcalina

Para la detección de la actividad enzimática en los geles, las células de *H. luciae* de cultivos en fase exponencial fueron lavadas con agua de mar artificial (véase ítem 5.6) y pre-incubadas durante 10 días en medio *f*/2 (control) y medio *f*/2-P (tratamiento).

Las células se resuspendieron en un tubo Eppendorf que contenía 500 μ l de buffer Tris-HCl 50mM pH 8,50 con 0,5 mM de PMSF. Posteriormente, cada tubo fue sonificado en baño de hielo con un sonicador de vástago (6 pulsos de 15 seg cada uno) y finalmente cada muestra fue filtrada en un vial. Antes de proceder con los zimogramas se cuantificaron las proteínas totales (Lowry *et al.* 1951, véase ítem 5.19).

Las condiciones de la corrida y del gel de electroforesis SDS-PAGE se detallan más adelante (véase ítem 5.25.1). Las muestras fueron disueltas en el buffer de siembra (sin β -mercaptoetanol) 5 min antes de la siembra.

Para revelar los geles se utilizó la tinción con el sustrato NBT/BCIP descrita en Lin *et al.* (2013). La solución de tinción estaba conformada por 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* en sus siglas en inglés, BCIP) (0,15 mg ml⁻¹), azul de nitrotetrazolio (*nitro blue tetrazolium* en sus siglas en inglés, NBT) (0,30 mg ml⁻¹), Tris-HCl (100mM, pH 9,20) y MgCl₂ (5mM).

Cada gel fue sumergido en la solución de tinción hasta la aparición de manchas de color violáceas (24 h). Luego de la aparición de las bandas, el gel fue lavado dos veces con agua destilada y fijado en una solución de ácido acético al 3 %.

Para visualizar con mayor intensidad las bandas el gel, previamente sumergido en la solución de NBT/BCIP, fue teñido con nitrato de plata (véase **ítem 5.26.2**).

La estimación del peso molecular se realizó a partir de la aproximación logarítmica aplicada a la función obtenida con los patrones de peso molecular y la distancia recorrida por ellos.

5.15.2. Proteasa

Para la obtención de la actividad enzimática, las células de *H. luciae* de cultivos en fase exponencial fueron lavadas con agua de mar artificial (véase **ítem 5.6**) y pre-incubadas durante 10 días en medio *f*/2 (control) y medio *f*/2-N (tratamiento). Las células se resuspendieron en un tubo Eppendorf que contenía 500 µl de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,50. Posteriormente, cada tubo fue sonificado en baño de hielo con un sonicador de vástago (6 pulsos de 15 seg cada uno) y finalmente cada muestra fue filtrada en un vial. Las proteínas totales fueron cuantificadas (Lowry *et al.* 1951).

Las condiciones de la corrida y del gel de electroforesis SDS-PAGE (véase **ítem 5.25.1**) se modificaron según Nagao *et al.* (2012). El gel SDS-PAGE al 10 % fue copolimerizado con gelatina, agregando al gel de corrida 1 ml de una solución de gelatina (1 mg ml^{-1}).

Las muestras fueron disueltas a temperatura ambiente en el buffer de siembra (sin β -mercaptoetanol) 5 min antes de la siembra. Se sembró 10 μg de proteína total en cada calle. Una vez que finalizó la corrida el gel fue lavado con Triton X-100 2,5 % (v/v) durante 1 h a 4 °C y luego la gelatina fue digerida con la incubación del gel en buffer Tris-HCl 50 mM durante 48 h a temperatura ambiente.

Luego de este período de incubación el gel fue sumergido en la solución reveladora azul de Coomasie (12 h). Las bandas blancas indicaron la actividad proteasa sobre la gelatina (**Véase ítem 5.26.1**). Para que las bandas tuvieran mejor resolución la imagen del gel fue invertida en el programa Image J, transformando las bandas negativas en oscuras.

La estimación del peso molecular se realizó a partir de la aproximación logarítmica aplicada a la función obtenida con los patrones de peso molecular y la distancia recorrida por ellos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa liberado InfoStat 2014 (Di Rienzo *et al.* 2014, www.infostat.com.ar). El ANOVA de un factor y el análisis de medidas repetidas (AMR) fueron utilizados para determinar la significancia estadística en los ensayos enzimáticos de actividad proteasa y fosfatasa. La prueba de Tukey HSD se utilizó para comparaciones a posteriori. El

nivel de significación fue fijado en $P < 0,05$. Para la prueba de Mauchly se utilizó el paquete estadístico IBM-SPSS®.

SECCIÓN 2

5.16. Fraccionamiento de los hidratos de carbono de *H. luciae*

5.16.1. Sustancias poliméricas extracelulares solubles (s-EPS)

Las células crecidas en cristalizadores de 100 ml con medio completo $f/2$, $f/2$ -N y $f/2$ -P fueron cosechadas a los 10 días de iniciado el cultivo. Para ello, se separaron las células adheridas al fondo de los cristalizadores raspando suavemente y luego se centrifugó (5 min, 700 x g) obteniendo por un lado las células (C1) y por otro el sobrenadante (S1) (**Figura 5.6**). Se concentraron 2 litros de S1 en un evaporador rotatorio, hasta un volumen de 200 ml.

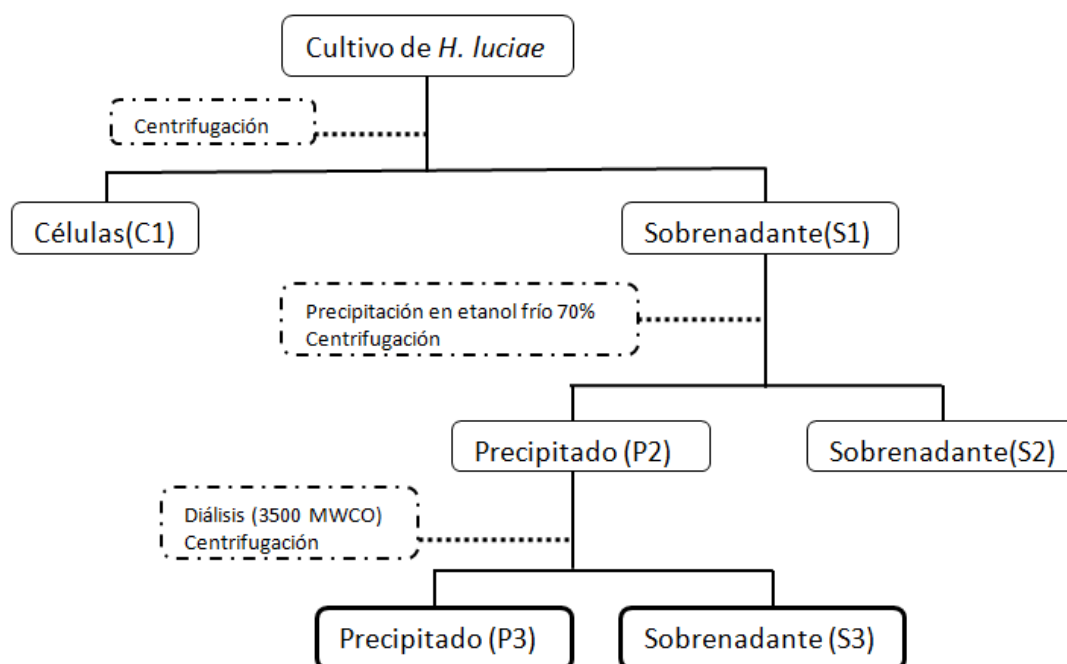


Figura 5.6: Esquema general de la obtención de las fracciones de la cosecha.

Las s-EPS se separaron por precipitación con el agregado de etanol frío (4:1) durante toda la noche. Se centrifugó y se obtuvo un precipitado (P2) y sobrenadante (S2). El precipitado P2 se resuspendió en 100 ml de agua destilada y dializó en bolsa de diálisis de poro 3500 MWCO durante 2 días en agua corriente y 2 días en agua destilada. Finalmente, se centrifugó P2 durante 10 min obteniéndose un pellet (P3) y un sobrenadante (S3) que se liofilizaron.

El análisis de contenido de hidratos de carbono se realizó utilizando la técnica de Dubois *et al.* (1956). La fracción **S3** fue la única que dio reacción positiva con la técnica del fenol-sulfúrico, por lo tanto los subsiguientes análisis de las s-EPS fueron realizados sobre esta fracción.

5.16.2. Polisacáridos de reserva

La marcha de extracción para la obtención de los polisacáridos de reserva (**Figura 5.7**) fue realizada a partir de células de *H. luciae* (C1, **Figura 5.7**) crecidas en el medio completo (*f/2*) durante 10-12 días y posteriormente liofilizadas con un rendimiento de 4 g l⁻¹ de cultivo.

La marcha de extracción se realizó con agua a temperatura ambiente (RTW) seguida por dos extracciones con agua a 100 °C (W 100.1 y W 100.2). Sus rendimientos fueron los siguientes: **RTW**: 0,636 g (0,15 g g⁻¹ muestra), **W 100.1**: 1.88 g (0,45 g g⁻¹ muestra), **W 100.2**: 0,29 g (0,07 g g⁻¹ muestra).

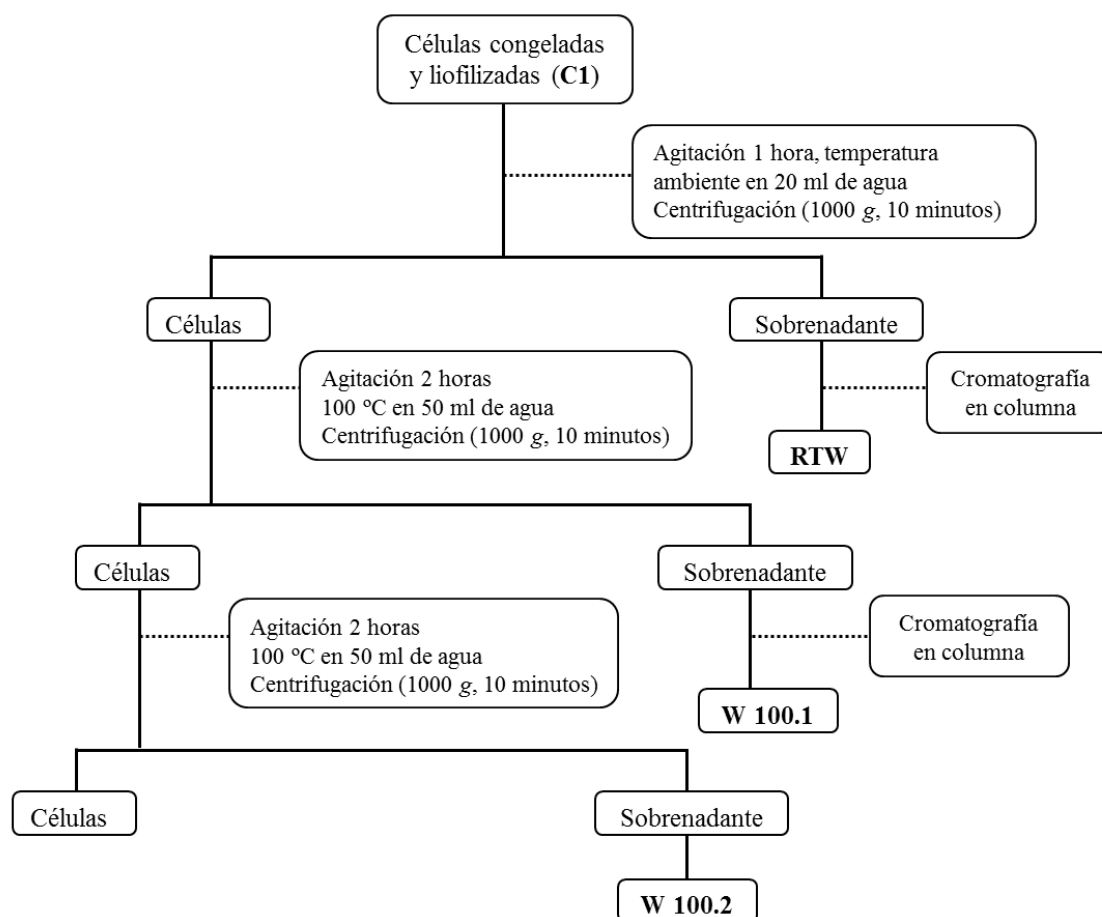


Figura 5.7: Esquema de la marcha de extracción de las células de *Halamphora luciae* (C1).

5.17. Cromatografía de permeación en gel

Para desalar las fracciones liofilizadas de las **s-EPS** (S3) y de los extractos acuosos (**RTW** y **W 100.1**) se utilizó la cromatografía de permeación en gel con dos geles diferentes de empaque.

Una de las columnas utilizada contaba con 50 cm de largo, 1,5 cm de diámetro y estaba empacada con Bio-Gel P-2 (Bio-Rad). La otra columna empleada tenía 20 cm de largo, 1 cm de diámetro y estaba empacada en este caso con Sephadex[®] G-10 (GE Healthcare Life Sciences). El volumen muerto (V_0) se determinó con Blue Dextran (2 mg ml^{-1}), y fue de 20 ml para la primera columna y de 5 ml para la segunda. Como eluyente se utilizó agua bidestilada y las fracciones se

recogieron en un colector automático. Aquellas fracciones que dieron reacción positiva para hidratos de carbono se reunieron y liofilizaron para su posterior análisis. Para la estimación del contenido de sales residuales se aplicó la precipitación de cloruros con AgNO_3 (1 % p/v) en placa de toque.

5.18. Detección de (1→3)- β -D- glucanos con azul de anilina

Para poder detectar (1→3)- β -D-glucanos de células de la fase exponencial tardía (10 días) y una estacionaria tardía (20 días) de *H. luciae*, se colocaron cubreobjetos en el fondo de cristalizadores conteniendo medio *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N*. Una vez transcurrido este tiempo, cada cubreobjeto fue levantado con una pinza y colocado en una solución de 0,05 % azul de anilina en buffer fosfato 0,01 M, pH 8,50 (Krishnamurthy 1999), durante 1 h.

Las observación se hicieron en un microscopio equipado con una combinación de filtros de UV (Ex 330-380 nm, FT 400 nm, Em 420 nm) y azul (Ex 450-490 nm, FT 510 nm, Em 520 nm) acoplado a una cámara digital.

MÉTODOS GENERALES

5.19. Determinación del contenido de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951) para las muestras solubles en agua. Se utilizaron como reactivos:

- **Solución A:** Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0,1 M.
- **Solución B:** sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % en tartrato de sodio y potasio al 1 %.

- **Solución C:** 50 ml A + 1 ml B, preparados en el momento.
- **Solución D:** reactivo de Folin-Ciocalteau (Merck) diluido al medio en agua.

Procedimiento: A 400 μ l de muestra conteniendo entre 100 y 500 μ g ml⁻¹ de proteína, se agregaron 2,0 ml de solución C. Se mezcló y dejó 10 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 200 μ l de solución D. Se mezcló con vortex y se midió la absorbancia a 500 nm a los 30 min. Los valores de absorbancia se refirieron a una curva patrón con soluciones de albúmina de suero bovino conteniendo hasta 500 μ g ml⁻¹ de proteína.

En el caso de la cuantificación de proteínas totales a partir de células se pesaron 20 mg de células frescas de *H. luciae* cultivadas en medio f/2, f/2-N y f/2-P, y cosechadas en las distintas fases de crecimiento.

Previo al análisis las células fueron resuspendidas en 1 ml de agua destilada y sonicadas con sonicador de vástago (3 pulsos de 10 seg cada uno). Luego se centrifugó durante 10 min (5500 x g) y realizó el análisis sobre el sobrenadante obtenido.

5.20. Determinación cuantitativa de hidratos de carbono totales

Se realizó según la técnica de Dubois *et al.* (1956), que utiliza ácido sulfúrico 98 % (grado analítico) y solución acuosa de fenol 5 %.

A 0.5 ml de una solución de hidratos de carbono conteniendo entre 10 y 70 μ g ml⁻¹ se le agregaron 0,5 ml de la solución de fenol al 5 % (p/v) y se agitó. Luego se adicionaron 2,5 ml de sulfúrico concentrado con dispensador automático. Los tubos se agitaron con vortex. Transcurridos 20 min a temperatura ambiente se

midió la absorbancia a 490 nm tomando como referencia curvas estándar de glucosa. Los resultados se expresaron como porcentaje de azúcar anhidro.

En el caso de la cuantificación de hidratos de carbono totales a partir de células se procedió como se indicó en el **ítem 5.19**.

5.21. Determinación de los azúcares componentes

Se determinaron por cromatografía gaseosa (CG), previa hidrólisis del polisacárido y derivatización de los monosacáridos componentes a alditoles peracetilados.

5.21.1. Hidrólisis ácida total

La hidrólisis total se realizó a partir de 1-2 mg de muestra, en el caso de los s-EPS y de los extractos acuosos.

En el caso de la hidrólisis de células enteras se pesaron 4 mg de células (frescas o congeladas según el ensayo) de *H. luciae* cultivadas en medio *f*/2, *f*/2-N y *f*/2-P, previamente sonicadas en baño ultrasónico (3 pulsos de 10 seg cada uno), cultivadas en medio completo o en medio carenciado y cosechadas en los días 10, 20 y 30 en el caso de las células control y en el día 10 en el caso de la células de los medios carenciados.

La muestra se hidrolizó en 0,5 ml de TFA 2 M a una temperatura de 121 °C durante 2 h. Una vez finalizada, se procedió a eliminar el ácido con corriente de aire.

5.21.2. Preparación de los alditoles acetilados

La obtención de alditoles acetilados se realizó según el procedimiento de Albersheim *et al.* (1967).

La mezcla de monosacáridos obtenida por hidrólisis se disolvió en 1 ml de amoníaco 1 M agregando 100 mg de NaBH_4 y se dejó reduciendo toda la noche.

Al cabo de ese tiempo se destruyó el exceso de agente reductor agregando ácido acético, controlando que el pH bajara a 4,00. Se evaporó el agua hasta sequedad y se lavó la muestra 5 veces con metanol para eliminar el ácido bórico como borato de metilo.

A continuación se procedió a la acetilación de la muestra con anhídrido acético durante 3 h a 120 °C. Una vez enfriada la muestra, se agregó 1 ml de agua y se extrajo con 1 ml de Cl_3CH ; se volvió a extraer la fase acuosa dos veces más con 1 ml de Cl_3CH . La fase clorofórmica se lavó sucesivamente con 1 ml de solución saturada de NaHCO_3 ($\times 2$) y con agua ($\times 2$). La fase clorofórmica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se filtró al vacío. El cloroformo se evaporó hasta sequedad y se conservó la muestra en freezer (-15 °C) hasta su análisis por CG (véase ítem 5.23).

ANALISIS ESTRUCTURAL DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS

5.22. Metilación

La fracción RTW (42,5 mg) se metiló por el método de Ciucanu & Kerek (1984). Para ello, la muestra (20 mg) se disolvió por agitación durante una noche en 0,8 ml de DMSO. Posteriormente se agregaron 50 mg de hidróxido de sodio molido en mortero y 20 mg de BH_4Na manteniendo bajo agitación magnética durante 2 h. Al cabo de este tiempo, la muestra se colocó en baño de hielo para proceder al agregado gota a gota de 0,5 ml de yoduro de metilo. Se continuó con la agitación durante 1 hora. Se repitió el agregado de hidróxido de sodio a los 30 min, seguido por un nuevo agregado de yoduro de metilo. Luego de 30 min de

agitación la reacción se detuvo con 2 ml de agua destilada. Los polisacáridos permetilados se obtuvieron por extracción de la mezcla de reacción con cloroformo (x 3). Se reunieron los extractos clorofórmicos y se llevaron a sequedad. Rendimientos: RTW-m1 (primer paso de metilación) 17,1 mg; RTW-m2 (segundo paso de metilación) 10,5 mg. Los productos permetilados se hidrolizaron y se derivatizaron para GC (Véase los ítems 5.21.1 y 5.21.2).

5.23. Cromatografía gas-líquido

5.23.1. Análisis de acetatos de alditos y acetatos de alditos parcialmente metilados

Los acetatos de alditos se analizaron en una columna capilar (0,25 mm d.i. x 30 m) SP-2330 (Supelco) WCOT y recubierta con una película de 0,20 μm de espesor. Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 1 ml min^{-1} y una presión de cabeza de columna de 15 psi. La relación de split fue de 80:1. La temperatura del inyector y detector fue de 240 °C.

Se emplearon los siguientes programas de temperatura:

Programa A: 220 °C isotérmicamente para los acetatos de alditos.

Programa B: desde 160 °C a 210 °C a 2 °C min^{-1} y de 210 °C a 240 °C a 5 °C min^{-1} , seguida de una espera de 30 min para los acetatos de alditos parcialmente metilados (Shea & Carpita 1988).

Adicionalmente, a fin de detectar aminoazúcares, los monosacáridos (como acetatos de alditos) se analizaron en una columna capilar (0,32 mm d.i x 30 m). ULTRA 2 (Hewlett-Packard) WCOT recubierta con una película de 0,20 μm de espesor. Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 0,65 ml min^{-1} y

una presión de cabeza de 20 psi y una relación de split 80:1. La temperatura del inyector y detector fueron de 250 °C.

Programa C: desde 160 °C (espera 5 min) a 220 °C a 1 °C min⁻¹ y de 220 °C a 250 °C a 2 °C min⁻¹.

Los tiempos de retención de cada pico se compararon con los de mezclas patrones de los acetatos de alditoles y acetatos de alditoles parcialmente metilados.

5.23.2. Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa

Se realizó CG-EM de los acetatos de alditoles parcialmente metilados en un equipo GCMS-QP 5050A Gas Chromatograph/Mass Spectrometer (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón). Las cromatografías se realizaron en una columna SP-2330 usando el programa de temperatura de Shea & Carpita (1988) (Véase el **ítem 5.23.1, Programa B**).

Se utilizó He como gas portador con un caudal de 4,4 ml min⁻¹, una presión de cabeza de 12 psi y una relación de split de 10:1. La temperatura del inyector fue de 250 °C. Los espectros de masa se registraron en un rango de masa de 30-600 Da, empleando un potencial de ionización de 70 eV. El análisis de los picos se efectuó en el programa CLASS-5K contando con espectros modelo.

5.24. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF

Los análisis se realizaron utilizando un espectrómetro de masa equipado con un láser de estado sólido de alto rendimiento ($\lambda=355$ nm) y un reflector. El sistema fue operado a través del software Flexcontrol 3.0.

Las muestras fueron irradiadas con una potencia de laser del 80 % los espectros fueron adquiridos tanto en modo lineal como en reflectrón. Los espectros obtenidos fueron la suma de 100 a 500 disparos simples del láser, dependiendo de las condiciones de las muestras.

Como calibrante se utilizó β -ciclodextrina con una matriz de *nor*-harmano. Todas las matrices utilizadas fueron compradas a Sigma-Aldrich.

Como matrices se utilizaron ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHBA), *nor*-harmano (nHo), ácido sinapínico (SA) y ácido- α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). Mezclas de DHBA:CHCA (1:1; mol/mol) y DHBA:SA (1:1; mol/mol) en 1 ml de metanol:agua bidestilada (75:25, v/v) fueron ensayadas.

Las soluciones stock de las matrices se prepararon en el momento, disolviendo 10 mg de la matriz correspondiente (o de la mezcla de matrices) en 1 ml de metanol (calidad HPLC)-agua bidestilada (75:25, v/v). En los casos necesarios se realizaron espectros de las diferentes matrices utilizadas para asignar las señales de las mismas.

Se calcularon los parámetros $\overline{M}_n$ (peso molecular promedio numérico) y el $\overline{M}_w$ (peso molecular promedio pesado) (Young & Lovell 1991). El $\overline{M}_n$ es el promedio estadístico del peso molecular de todas las cadenas poliméricas de la muestra y es definido por la siguiente ecuación:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

Donde: N_i es el número de cadenas de peso molecular M_i .

El $\overline{M}_w$, es sensible a la contribución de las cadenas poliméricas más pesadas y es definida según la siguiente ecuación:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

Siempre el $\bar{M}_w$ es superior o igual al $\bar{M}_n$; en caso de que la distribución de los polímeros sea monodispersa, la relación ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) es cercana a uno.

El grado de polimerización (DP) de los polímeros fue calculado a partir del número de unidades de masa de la unidad repetitiva (Ai *et al.* 2015).

5.24.1. MALDI TOF de los polisacáridos solubles y sustancias de reserva

Para el análisis de MALDI-TOF MS de las s-EPS (s-EPSc, s-EPS-N y s-EPS-P) y de los extractos acuosos (RTW y W 100.1) se utilizaron dos métodos de preparación:

Método sandwich (Nonami *et al.* 1997): se colocaron 0,5 μ l de la solución de la matriz en la placa de MALDI y se dejaron secar a temperatura ambiente. Cuando el solvente se evaporó se colocaron sobre la capa de matriz 0,5 μ l de la solución de las s-EPS (2-5 mg ml^{-1}) o de los extractos acuosos (10-20 mg ml^{-1}) y se secó. Finalmente se agregó 0,5 μ l ($\times 2$) de la solución de matriz (matriz-analito, 3:1 v/v).

Método mezcla: se preparó la mezcla del analito-matriz en relación 1:1 (v/v), transfiriendo 0,5 μ l sobre la placa de MALDI y secando al aire como se describió previamente.

Tanto el análisis de los MALDI de las s-EPS como de los extractos acuosos se ensayaron con las matrices y mezclas previamente.

5.24.2. MALDI TOF de las células

Se realizó el análisis de polisacáridos por MALDI-TOF de:

- a) Células crecidas en medio *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P*.
- b) Células crecidas en medio *f/2* y cosechadas a distintos tiempos.
- c) Células crecidas en medio *f/2* y posteriormente congeladas.

En el caso de **(a)** las células crecieron en medio de cultivo *f/2*, *f/2-N* y *f/2-P*, siendo cosechadas durante los días 10-12. En el caso **(b)** las células crecieron en medio *f/2* y fueron cosechadas a los 5, 10, 15, 25 y 35 días. Por último en el caso **(c)** las células crecieron en medio *f/2* y fueron cosechadas a los 15 días, luego se las congeló a -4 °C durante 15 días.

En todos los casos las células fueron centrifugadas en una micro centrífuga (60 x *g*, 5 min). Se colocó 1 µl del pellet celular en la placa del MALDI y se lo dejó secar a temperatura ambiente. Sobre las células se depositó 1 µl de matriz y se dejó secar de la misma forma. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y repetidos en tres días diferentes.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS y MS

5.25. Extracción de proteínas totales

Para la cuantificación de las proteínas celulares y extracelulares, las células de *H. luciae* fueron pre-incubadas durante 10 días en medio *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N*. Las células fueron resuspendidas en tubos Eppendorf conteniendo 1 ml de SDS 2 % con el agregado de PMSF (0,5 mM solución final). Los tubos fueron sonicados con un sonicador de vástago (6 pulsos de 15 seg cada uno) a 4 °C. Luego se

centrifugó en una microcentrífuga durante 10 min (5500 x *g*) para separar las células del extracto proteico, que fue conservado a 4 °C.

Se obtuvieron los extractos proteicos denominados **SDSc**, **SDS-P** y **SDS-N**, de los respectivos medios *f/2*, *f/2-P* y *f/2-N*.

El análisis de contenido de proteínas se realizó siguiendo el ensayo de Lowry *et al.* (1951) y el de hidratos de carbono utilizando la técnica de Dubois *et al.* (1956).

5.25.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos **SDSc**, **SDS-P** y **SDS-N** se fraccionaron por electroforesis en gel de poliacrilamida de 10 % en condiciones desnaturalizantes (Laemmli 1970). Las muestras se disolvieron en buffer de siembra (0,54 M Tris HCl (pH 6,80) conteniendo 10 % (v/v) de β-mercaptoetanol, 20 % (v/v) de glicerol, 4 % (m/v) de SDS y 0,005 % (m/m) de azul de bromofenol) y se calentaron durante 1 min a 100 °C. Las corridas se iniciaron a un voltaje de 45 V durante 10 min que luego se aumentó a 110 V durante 55 min. Paralelamente se corrieron patrones de peso molecular (Rainbow marker-Full range, Amersham).

5.26. Revelado de los geles de electroforesis

5.26.1. Revelado con azul de Coomasie

El colorante se preparó disolviendo azul Coomasie R250 0,1 % en una mezcla de metanol: ácido acético: agua destilada (50:10:40 v/v/v).

Las bandas en los geles se revelaron luego de la decoloración con una solución metanol: ácido acético: agua destilada (40:12:48, v/v/v).

5.26.2. Revelado con nitrato de plata

Al finalizar la corrida, el gel se fijó en una solución metanol:ácido acético:agua (50:10:40, v/v/v) durante 10 min. Luego, se deshidrató con 3 lavados sucesivos de 20 min con una solución de etanol 50 %.

Posteriormente el gel fue re-hidratado en agua Milli Q agitando en forma continua hasta que adquiriese nuevamente una consistencia blanda. Luego se realizó un pre-tratamiento en tiosulfato de sodio al 0,02 % (1 min), seguido de 3 lavados sucesivos de agua Milli Q (20 seg cada uno). Se sumergió el gel en una solución de reactivo de nitrato de plata (0,2 % AgNO_3) durante 20 min, y nuevamente se lavó con agua Milli Q (2 veces, 20 seg cada lavado). Por último el gel se incubó con la solución reveladora (6 g de Na_2CO_3 , 50 μl de formol 37 % y 2 ml de solución de tiosulfato de sodio y 98 ml de agua MilliQ), monitoreando constantemente hasta la aparición de las bandas de proteínas. El revelado se detuvo agregando una solución de 50 % metanol:12 % ácido acético (10 min).

5.27. Detección de proteínas por espectrometría de masa ESI

5.27.1. Tratamiento de muestras

Se tomó una alícuota de 100 μl de **SDSc**, **SDS_P** y **SDS_N** (Véase ítem 5.25). Cada alícuota fue reducida con ditioneitol 20 mM durante 45 min a 56 °C y alquilada con iodoacetamida 20 mM durante 45 min en oscuridad. Luego fue precipitada con 3 volúmenes de acetona, centrifugada y posteriormente su pellet fue lavado con acetona fría.

Los pellets fueron resuspendidos en buffer de bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8,00) y digeridos con tripsina (péptidos trípticos) durante toda la noche. Las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas con 10 µl de ácido fórmico 0,1 %.

5.27.2. Configuración del equipo y la corrida

Los péptidos obtenidos luego del tratamiento con tripsina (**Véase ítem 5.27.1**) fueron analizados por un nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con un analizador con tecnología Orbitrap. De esta manera se logró la separación de los péptidos obtenidos por digestión tríptica de la muestra para su posterior identificación.

Las muestras fueron eluidas previamente por una pre-columna y luego por una columna de fase reversa con una temperatura de 35 °C.

El volumen de inyección utilizado fue de 2 µl. Se empleó un gradiente con dos soluciones (**A**, agua con 0,1 % de ácido fórmico y **B**, acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico) (**Tabla 5.3.**), con un flujo de 300 nl min⁻¹.

Tabla 5.3: programa de gradiente de soluciones A (0,1 % ácido fórmico) y B (acetonitrilo) utilizado en HPLC.

Tiempo (min)	Duración (min)	%A	%B
0	No aplica	95	5
110	110	65	35
111	1,00	5	95
120	9,00	5	95

La ionización de las muestras se realizó por electrospray con un voltaje del spray de 3,5 kV. El espectrómetro cuenta con un cuadrupolo que se puede utilizar

para la selección de iones, una celda de fragmentación HCD y un analizador Orbitrap.

La configuración del equipo permitió que la identificación de los péptidos se realice a medida que se separaron por cromatografía, obteniendo Full MS y MS₂. El método empleado ejecutó la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo.

En cada ciclo el equipo realizó un Full MS y luego MS₂ a los 12 picos de mejor relación señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido se fragmenta a lo largo de su elución del cromatograma.

5.27.3. Análisis de Datos

Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa Proteome Discoverer (versión 1.4), utilizando la base de datos correspondientes a tres especies de diatomeas: *Thalassiosira oceanica*, *T. pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum*. Mediante la comparación entre las fragmentaciones obtenidas en el espectro de masa con las existentes en la base de datos, el programa emitió un informe de los péptidos utilizados (**Tabla 5.4.**) para la identificación de las proteínas (**Tabla 5.5.**).

Tabla 5.4: Parámetros del Proteome Discover para cada péptido analizado en las muestras de **SDSc**, **SDS_p** y **SDS_N**.

Secuencia	Secuencia de aminoácidos que componen el péptido.
Nº de proteínas	Número de proteínas donde se encuentra ese péptido.
Modificación	Modificaciones identificadas en el péptido como la de oxidación de metioninas y la carbamidometilación de las cisteínas.
MH⁺ teórico (Da)	Peso molecular monoisotópico protonado de los péptidos en Dalton

Tabla 5.5: Parámetros del Proteome Discover para cada proteína analizada en las muestras de **SDSc**, **SDS_p** y **SDS_N**.

Código de acceso	Código de acceso de las proteínas utilizando el programa UP.
Descripción	Nombre de la proteína brindada por el programa UP.
Cobertura	Porcentaje de la secuencia proteica cubierta por los péptidos identificados.
Nº de péptidos	Es el número de péptidos encontrados en el grupo proteico.
Nº de péptidos únicos	Describe el número de secuencias peptídicas que se encuentran únicamente en el grupo proteico.
Nº de PSM	Expone el número de veces que se generó el mismo espectro de fragmentación a lo largo de toda la corrida.
Nº de AA	Número de aminoácidos teórico de la proteína.
MW (kDa)	Peso molecular teórico calculado para la proteína.
pI	Punto isoelectrico teórico calculado de la proteína.
Score Sequest HT	Puntuación asignada con el programa SEQUEST del péptido empírico respecto a los candidatos de péptidos teóricos.

El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (alto/medio/bajo), seleccionando en nuestro caso el máximo nivel (alto) con un FDR (de sus siglas en inglés, *false discovery rate*) menor al 1 %. Fue necesario obtener al menos 1 péptido único para la asignación confiable de cada proteína.

Con los códigos de acceso (ID) proporcionados se utilizaron los programas UniProt (**UP**) (<http://www.uniprot.org/>) y las anotaciones de las bases de datos Gene Ontology (**GO**) y Protein family (**Pfam**) (<https://www.pfam.xfam.org/>) para identificar la función, ubicación y el proceso biológico en el que participan las proteínas encontradas.

En algunos casos el Proteome Discoverer categorizó a algunas proteínas como “Sin caracterizar” (Uncharacterized) o “Predichas” (Predicted). En el caso de las proteínas “Sin caracterizar”, con los programas UP y las bases de datos GO y Pfam, se compararon los dominios de estas proteínas con los de proteínas que sí están caracterizadas y así se obtuvo información sobre su función biológica y/o su ubicación celular. Según el programa UP, las proteínas categorizadas como “predichas” son aquellas cuyas secuencias no tienen evidencia a nivel de la proteína o del transcrito, sin embargo en algunos casos al cargar su ID en UniProt es posible obtener algún indicio de ubicación y función aportado por las bases GO y Pfam.

Para obtener información sobre la abundancia de las proteínas se realizaron inyecciones de cada condición por triplicado (SDSc, SDS_{-P} y SDS_{-N}). El Proteome Discoverer realizó la identificación de las proteínas, y calculó para cada una, el área bajo la curva de los tres picos de MS más intensos.

Estas áreas están relacionadas a la abundancia de la proteína en la mezcla, y se pueden usar para realizar una cuantificación relativa (Michalski *et al.* 2011). Para

esto se realizó la normalización de las áreas para todas las inyecciones (usando la sumatoria de las áreas de todas las proteínas para cada condición). La comparación de estos valores de área normalizada permite realizar una comparación semi cuantitativa de la abundancia de las proteínas en las diferentes condiciones (Zhu *et al.* 2010, Bubis *et al.* 2017).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo de tesis constituyen un aporte dentro del marco del moderno enfoque de biorrefinería aplicado a cultivos de microalgas. La sustentabilidad económica y ecológica de la producción de cultivos masivos a gran escala requiere el uso integral de la biomasa algal como fuente de diferentes metabolitos. La producción a gran escala de co-productos con valor agregado necesita de varias etapas de investigación previa para la selección de especies de crecimiento rápido adaptadas al entorno regional y la optimización de las condiciones de cultivo, que se logran solo a partir de un acabado conocimiento de la ecofisiología y el metabolismo de la especie seleccionada.

Los cultivos en laboratorio permiten caracterizar los metabolitos de interés (polisacáridos de reserva, lípidos, sustancias poliméricas extracelulares) y las condiciones de cultivo más adecuadas bajo distintas condiciones ambientales. La extrapolación a escala industrial no es directa, pero la caracterización de las vías metabólicas preponderantes y su forma de acción en situaciones críticas permiten sentar las bases para el escalado de volumen.

De los resultados de esta Tesis podemos concluir que los cultivos *in vitro* de la cepa de *Halimnobia luciae* aislada a partir de los sedimentos del estuario de Bahía Blanca presentan una tasa de crecimiento apropiada para su utilización en cultivos masivos, similar a especies de diatomeas actualmente empleadas en biorreactores. Otra característica destacable es que, en condiciones de limitación de nutrientes, si bien la biomasa final disminuyó aproximadamente 25 %, los cultivos se mantuvieron en fase estacionaria sin que se produjera su declinación inmediata. En los proteomas de células crecidas bajo condiciones de deficiencia de P se detectaron niveles mayores de RUBISCO. Teniendo en cuenta la coordinación entre las etapas fotoquímica y bioquímica de la fotosíntesis, ello

sugiere que la fijación de carbono resulta suficiente para sostener la biomasa del cultivo bajo esas condiciones. Esto implica que, aun en condiciones de carencia de nutrientes para enriquecer las células en un determinado metabolito (por ejemplo TAGs), la biomasa a cosechar resultó abundante.

Otra ventaja adicional es que, dadas sus características de especie bentónica, la adhesión de las células al fondo facilitaría la cosecha por raspado de los piletones, evitando procesos de filtrado que a gran escala resultan costosos.

La calidad del agua es un factor que incide significativamente en el costo de la producción industrial. En general se trata de evitar la utilización de agua dulce, recurso destinado prioritariamente para el consumo humano y animal. Por tratarse de una especie estuarial, *H. luciae* se puede cultivar en agua de mar, incluso si lleva una carga importante de materia orgánica, ya que la presencia de exoenzimas como fosfatasas alcalinas y proteasas permitiría a esta especie incluso incrementar la producción de biomasa en esas condiciones. De acuerdo con ello, la utilización de esta especie podría destinarse además a la biorremediación de efluentes. El cultivo en piletones permitiría la degradación de compuestos organofosforados y nitrogenados, el aprovechamiento del mucílago extracelular para la bioadsorción de metales pesados y finalmente, la producción de biomasa para biodiesel.

La fuente de nitrógeno empleada es otro factor a tener en cuenta en el cálculo de los costos del proceso a gran escala. La presencia de enzimas del ciclo de la urea detectada en los proteomas permite considerar la posibilidad de usar esta fuente nitrogenada de bajo costo como fertilizante agronómico.

El monitoreo de la evolución de los cultivos a través de distintos indicadores morfométricos y fisiológicos es clave para identificar las distintas etapas y

determinar el momento de cosecha máxima de los metabolitos a explotar. Los cambios en el biovolumen y en el diámetro de las areolas de *H. luciae* guardan relación con la eficiencia de la incorporación de nutrientes y, por ende, con la tasa de crecimiento. En *H. luciae*, únicamente se registró reducción en la tasa de crecimiento conjuntamente con la disminución del volumen celular ante la carencia de N, mientras que, desde el punto de vista morfológico, en condiciones de carencia de P sólo se evidenció la reducción del tamaño de las areolas.

Por colorimetría se observó la acumulación de lípidos en *H. luciae*. Dicha acumulación está asociada al incremento de dos isozimas V-ATPasa relacionadas con el aumento de tamaño de las vacuolas lipídicas paralelamente con la mayor abundancia de la enzima AcetilCoA carboxilasa en incubación bajo estrés nutricional. La acumulación de lípidos en la etapa estacionaria tardía, en especial en ausencia de N o luego del envejecimiento de las células, fue similar a la registrada en otras especies de diatomeas de interés para la producción. Estos resultados muestran que se puede inducir la etapa lipogénica en *H. luciae*, resultado que reafirma su potencial para la explotación como especie algal oleaginosa.

Además de los lípidos como reserva de carbono, entre los resultados observados se registró la acumulación del polisacárido crisolaminarina. La explotación de la crisolaminarina confiere una aplicación adicional a la biomasa algal como fuente de carbono para cultivo de invertebrados y moluscos. Los análisis de los proteomas de las células en medios carenciados mostraron un aumento de una enzima de la vía biosintética de la crisolaminarina, la UDP-Glucosa-pirofosforilasa/ fosfoglucomutasa.

Cabe destacar que este es el primer estudio donde se relaciona un perfil de polisacáridos obtenido por MALDI con el contenido y composición de hidratos de carbono y el análisis estructural por metilación del polisacárido de reserva. La aplicación de espectrometría de masa MALDI-TOF fue especialmente destacable en el monitoreo de la acumulación de crisolaminarina, ya que permitió detectar cambios en el grado de polimerización de este polisacárido, dependientes de la edad de las células o de la incubación bajo carencia de N o P. En consecuencia, este polisacárido constituye un indicador del estado nutricional de las células. La calibración de las señales del espectro de MALDI podría utilizarse para seleccionar el tiempo de cosecha en cultivos masivos para el aprovechamiento de diferentes metabolitos, en forma rápida y con un mínimo requerimiento de muestra; un método similar podría ser aplicado también a otras especies.

Mediante los espectros de MALDI se detectaron también cambios en las características de las sustancias poliméricas extracelulares de *H. luciae*. Esos cambios resultaron similares a las diferencias de la composición de monosacáridos entre el medio completo y los carenciados. En ambos casos se manifestó el predominio de glucosa en el medio completo y de galactosa en s-EPS-N y s-EPS-P conjuntamente con un aumento de los de ramnosa y fucosa en el primero, y de arabinosa en el segundo. En el ambiente bentónico, la degradación bacteriana de las EPS generaría diferentes señales de oligosacáridos según la abundancia o deficiencia de nutrientes, activando en la diatomea una respuesta acorde, como por ejemplo, la activación de exoenzimas.

En concordancia con la mayor secreción de mucílago bajo carencia de P, los proteomas de estas células mostraron mayor abundancia de la enzima UDP-

glucosa-6-deshidrogenasa de la vía de síntesis de glicosilaminoglicanos que componen las EPS.

Bajo condiciones de deficiencia de N, los proteomas revelaron que la movilización de N desde el cloroplasto coincidía con la clorosis observada. La actividad de varias proteínas centrales del metabolismo del nitrógeno es sensible a cambios en el potencial redox celular. Las proteínas ricas en cisteína y los tioles de bajo peso molecular como el glutatión intervienen en la señalización del potencial redox celular. Acorde con ello, se registró el aumento de la adenosilhomo-cisteinasa, enzima de la biosíntesis de la cisteína en ambos medios carenciados. El estrés oxidativo impuesto por la deficiencia nutricional también se vio reflejado en el aumento de enzimas detoxificantes como la ascorbato peroxidasa o las que intervienen en la fotorrespiración, como la glicolato oxidasa.

La menor abundancia de proteínas ribosomales bajo deficiencia de N, conjuntamente con el aumento de proteínas involucradas en la señalización y degradación proteica (como la ubiquitina o la proteína 14-3-3) y de la glutamino sintetasa que permite asimilar el amonio producto del catabolismo proteico, fueron indicadores de la removilización intracelular de este mineral.

Estos resultados permiten afirmar que la cepa de *H. luciae* aislada, cultivada y estudiada en esta Tesis es de interés para ser utilizada para encarar el escalado del volumen de cultivo y su potencial empleo como materia prima para la obtención, entre otros, de biocombustibles, crisolaminarina y exoenzimas y en procesos de saneamiento y biorremediación.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullahi A.S., Underwood G.J.C., Gretz M.R. (2006). Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.*, 42: 363-378.

Abida H., Dolch L., Meï C., Villanova V., Conte M., Block M.A., Finazzi G., Bastien O., Tirichine L., Bowler C., Rébeillé F., Petroutsos D., Jouhet J., Maréchal E. (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.*, 167: 118-136.

Acquisti C.A., Kumar S., Elser J.J. (2009). Signatures of nitrogen limitation in the elemental composition of the proteins involved in the metabolic apparatus. *Proc. R. Soc. B*, 276: 2605-2610.

Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., le Gall L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A.D., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C.L., Smirnov A., Spiegel F.W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59: 429-514.

Ai X.X., Liang J.R., Gao Y.H., Lo S.C.L., Lee F.W.F., Chen C.P., Luo C.S., Du C. (2015). MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. *J. Appl. Phycol.*, 27: 673-684.

Albersheim P., Nevins D.J., English P.D., Karr A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5: 340-345.

Alcoverro T., Conte E., Mazzella L. (2000). Production of mucilage by the Adriatic epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *J. Phycol.*, 36: 1087-1095.

Alekseeva S.A., Shevchenko N.M., Kusaykin M.I., Ponomorenko L.P., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N., Likhoshvai E.V. (2005). Polysaccharides of diatoms occurring in Lake Baikal. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 41: 185-191.

Alexander H., Jenkins B.D., Ryneerson T.A., Dyhrman S.T. (2015). Metatranscriptome analyses indicate resource partitioning between diatoms in the field. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 112: 2182-2190.

Alipanah L., Rohloff J., Winge P., Bones A.M., Brembu T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Exp. Bot.*, 66: 6281-6296.

Alipanah L., Winge P., Rohloff J., Najafi J., Brembu T., Bones A.M. (2018). Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen

deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plos One*, doi.org/10.1371/journal.pone.0193335.

Alonso D., Belarbi E., Fernández-Sevilla J., Rodríguez-Ruiz J., Molina Grima E. (2000). Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 54: 461-471.

Andrade L.M., Mendes M.A., Kowalski P., Nascimento C.A. (2015). Comparative study of different matrix/solvent systems for the analysis of crude lyophilized microalgal preparations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 29: 295-303.

Anschau A., Caruso C.S., Kuhn R.C., Franco T.T. (2017). Validation of the sulfo-phosphovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Braz. J. Chem. Eng.*, 34: 19-27.

Apoya-Horton M.D., Yin L., Underwood G.J.C., Gretz M.R. (2006). Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 42: 379-390.

Aráoz R., Guérineau V., Rippka R., Palibroda N., Herdman M., Laprevote O., von Döhren H., Tandeau de Marsac N., Erhard M. (2008). MALDI-TOF-MS detection of the low molecular weight neurotoxins anatoxin-a and homoanatoxin-a on lyophilized and fresh filaments of axenic *Oscillatoria* strains. *Toxicon*, 51: 1308-1315.

Archibald J.M. (2012). The evolution of algae by secondary and tertiary endosymbiosis. *Adv. Bot. Res.*, 64: 87-118.

Archibald J.M. (2015). Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Curr. Biol.*, 25: 911-921.

Armbrecht L., Roughan M., Rossi V., Schaeffer A., Davies P., Waite A., Armand L. (2014). Phytoplankton composition under contrasting oceanographic conditions: upwelling and downwelling (eastern Australia). *Cont. Shelf Res.*, 75: 54-67.

Armbrust E.V., Berges J.A., Bowler C., Green B.R., Martinez D., Putnam N.H., Zhou S., Allen A.E., Apt K.E., Bechner M. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306: 79-86.

Aslam S.N., Cresswell-Maynard T., Thomas D.N., Underwood G.J.C. (2012). Production and characterization of the intra- and extracellular carbohydrates and polymeric substances (EPS) of three sea-ice diatom species, and evidence for a cryoprotective role for EPS. *J. Phycol.*, 48: 1494-1509.

- Aumeier** C., Menzel D. (2012). Secretion in the diatoms. En: *Secretions and exudates in biological systems* (Eds.: Vivanco J.M., Baluska F.). Springer, Heidelberg, pp. 221-250.
- Bahrani** A., Joo M.H. (2010). Flag leaf role in N accumulation and remobilization as affected by nitrogen in a bread and durum wheat cultivars. *Amer-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 8: 728-735.
- Bahulikar** R., Kroth P. (2008). The complex extracellular polysaccharides of mainly chain-forming freshwater diatom species from epilithic biofilms. *J. Phycol.*, 44: 1465-1475.
- Barnech Bielsa** G., Popovich C., Rodríguez M.C., Martínez A.M., Martín L., Matulewicz M.C., Leonardi P. (2016). Simultaneous production assessment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cincta*. *Algal Res.*, 15: 120-128.
- Basu** S., Patil S., Mapleson D., Russo M.T., Vitale L., Fevola C., Maumus F., Casotti R., Mock T., Caccamo M., Montresor M., Sanges R., Ferrante M.I. (2017). Finding a partner in the ocean: molecular and evolutionary bases of the response to sexual cues in a planktonic diatom. *New Phytol.*, 215: 140-156.
- Battarbee** E.W. (1986). Diatom analysis. En: *Handbook of holocene palaeoecology and palaeohydrology* (Ed.: Berglund B.E.). J. Wiley & Sons, New York, pp. 527-570.
- Beattie** A., Hirst E.L., Percival E. (1961). Studies on the metabolism of the Chrysophyceae. *Biochem. J.*, 79: 531-536.
- Bedoshvili** Y.D., Gneusheva K.V., Popova M.S., Avezova T.N., Arsentiev K.Y., Likhoshvay Y.V. (2018). Frustule morphogenesis of raphid pennate diatom *Encyonema ventricosum* (Agardh) Grunow. *Protoplasma*, 255: 911-921.
- Beier** S., Gálvez M.J., Molina V., Sarthou G., Quéroué F., Blain S., Obernosterer I. (2015). The transcriptional regulation of the glyoxylate cycle in SAR11 in response to iron fertilization in the Southern Ocean. *Environ. Microbiol. Rep.*, 7: 427-434.
- Bellou** S., Baeshen M., Elazzazy A., Aggeli D., Sayegh F., Aggelis G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 32: 1476-1493.
- Bender** S.J., Durkin C.A., Berthiaume C.T., Morales R.L., Armbrust E.V. (2014). Transcriptional responses of three model diatoms to nitrate limitation of growth. *Front. Mar. Sci.*, 1: 2-15.
- Blommaert** L., Lavaud J., Vyverman W., Sabbe K. (2018). Behavioural versus physiological photoprotection in epipelagic and epipsammic benthic diatoms. *Eur. J. Phycol.*, 53: 146-155.

Bohórquez J., McGenity T.J., Papaspyrou S., Garcia-Robledo E., Corzo A., Underwood G.J. (2017). Different types of diatom-derived extracellular polymeric substances drive changes in heterotrophic bacterial communities from intertidal sediments. *Front. Microbiol.*, 8: 1-16.

Bondoc K.G.V., Lembke C., Vyverman W., Pohnert G. (2018). Selective chemoattraction of the benthic diatom *Seminavis robusta* to phosphate but not to inorganic nitrogen sources contributes to biofilm structuring. *Microbiology Open*, doi.org/10.1002/ mbo3.694.

Bowler C., Allen A.E., Badger J.H., Grimwood J., Jabbari K., Kuo A., Maheswari U., Martens C., Maumus F., Otillar R.P. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456: 239-244.

Bowler C., Vardi A., Allen A. (2010). Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 2: 333-365.

Brembu T., Mühlroth A., Alipanah L., Bones A.M. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. B*, doi: 10.1098/rstb.2016.0406.

Bristow L.A., Mohr W., Ahmerkamp S., Kuypers M. (2017). Nutrients that limit growth in the ocean. *Curr. Biol.*, 27: 474-478.

Bromke M.A., Giavalisco P., Willmitzer L., Hesse H. (2013). Metabolic analysis of adaptation to short-term changes in culture conditions of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0067340.

Bromke M.A., Sabir J.S., Alfassi F.A., Hajarrah N.H., Kabli S.A., Al-Malki A.L., Ashworth M.P., Méret M., Jansen R.K., Willmitzer L. (2015). Metabolomic profiling of 13 diatom cultures and their adaptation to nitrate limited growth conditions. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0138965.

Bubis J., Levitsky L., Ivanov M., Tarasova I., Gorshkov M. (2017). Comparative evaluation of label-free quantification methods for shotgun proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 31: 606-612.

Buchanan B., Gruissem R., Jones R. (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA, 1367pp.

Büchel C., Wilhelm C., Wagnere V., Mittag M. (2017). Functional proteomics of light-harvesting complex proteins under varying light-conditions in diatoms. *J. Plant Physiol.*, 217: 38-43.

Burki F. (2014). The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic. *C. S. H. Perspect. Biol.*, doi: 10.1101/cshperspect.a016147.

Byreddy A.R., Gupta A., Barrow C., Puri M. (2016). A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *J. Microbiol. Meth.*, 125: 28-32.

- Caballero** M.A., Jallet D., Shi L., Rithner C., Zhang Y., Peers G. (2016). Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.*, 20: 180-188.
- Callow** J.A., Callow M.E. (2011). Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nat. Commun.*, 2: 244-254.
- Cañavate** J.P., Armada I., Ríos J.L., Hachero-Cruzado I. (2016). Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry*, 124: 68-78.
- Carbone** M.E., Spetter C.V., Marcovecchio J.E. (2016). Seasonal and spatial variability of macronutrients and Chlorophyll a based on GIS in the South American estuary (Bahía Blanca, Argentina). *Environ. Earth Sci.*, 75: 1-13.
- Carvalho** R.N., Bopp S.K., Lettieri T. (2011). Transcriptomics responses in marine diatom *Thalassiosira pseudonana* exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbon Benzo[a]pyrene. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0026985.
- Carvalho** H.H., Silva P.A., Mendes G.C., Brustolini O.J., Pimenta M.R., Gouveia B.C., Valente M.A., Ramos H.J., Soares-Ramos J.R., Fontes E.P. (2014). The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiol.*, 164: 654-670.
- Charney** J., Tomarelli R. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, 171: 501-505.
- Chen** Y.C. (2012). The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. *Food Chem.*, 131: 211-219.
- Chen** X.H., Li Y.Y., Zhang H., Liu J.L., Xie Z.X., Lin L., Wang D.Z. (2018). Quantitative proteomics reveals common and specific responses of a marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to different macronutrient deficiencies. *Front. Microbiol.*, doi: 10.3389/fmicb.2018.02761.
- Chepurnov** V.A., Mann D.G. (2004). Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms. *Phycol. Res.*, 52: 1-12.
- Chiovitti** A., Bacic A., Burke J., Wetherbee R. (2003a). Heterogeneous xylose-rich glycans are associated with extracellular glycoproteins from the biofouling diatom *Craspedostauros australis* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.*, 38: 351-360.
- Chiovitti** A., Higgins M.J., Harper R., Wetherbee R., Bacic A. (2003b). The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 39: 543-554.

- Chiovitti A.**, Molino P., Crawford S.A., Teng R., Spurck T., Wetherbee R. (2004). The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *Eur. J. Phycol.*, 39: 117-128.
- Chiovitti A.**, Harper RE, Willis A, Bacic A, Mulvaney P, Wetherbee R. (2005). Variation in the substituted 3-linked mannans closely associated with the silicified wall of diatoms. *J. Phycol.*, 41: 1154-1161.
- Chiovitti A.**, Dugdale T.M., Wetherbee R. (2006). Diatom adhesives: molecular and mechanical properties. En: *Biological Adhesives* (Ed.: Smith A.M., Callow J.A.). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 79-103.
- Ciucanu I.**, Kerek F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 131: 209-217.
- Clement R.**, Lignon S., Mansuelle P., Jensen E., Pophillat M., Lebrun R., Denis Y., Puppo C., Maberly S., Gontero B. (2017). Responses of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to changes in CO₂ concentration: a proteomic approach. *Sci. Rep.*, doi: 10.1038/srep42333.
- Cohn S.A.**, Disparti N.C. (1994). Environmental factors influencing diatom cell motility. *J. Phycol.*, 30: 818-828.
- Cohn S.A.**, Spurck T., Pickett-Heaps J.D. (1999). High energy irradiation at the leading tip of moving diatoms causes a rapid change of cell direction. *Diatom Res.*, 14: 193-206.
- Cohn S.A.** (2001). Photo-stimulated effects on diatom motility. En: *Photomovement* (Ed.: Hädar D.P, Lebert M.). Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 375-401.
- Cohn S.A.**, Farrell J., Munro J., Ragland R., Weitzell R., Wibisono B. (2003). The effect of temperature and mixed species composition on diatom motility and adhesion. *Diatom Res.*, 18: 225-243.
- Cohn S.A.**, Bahena M., Davis J., Ragland R.L., Rauschenberg C., Smith B. (2004). Characterisation of the diatom photophobic response to high irradiance. *Diatom Res.*, 19: 167-179.
- Cohn S.A.**, Halpin D., Hawley N., Ismail A., Kaplan Z., Kordes T., Kuhn J., Macke W., Marhaver K., Ness B., Olszewski S., Pike A., Rice E., Sbarboro J., Wolske A., Zapata Y. (2015). Comparative analysis of light-stimulated motility responses in three diatom species. *Diatom Res.*, 30: 213-225.
- Conner S.D.**, Schmid S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37-44.
- Consalvey M.**, Paterson D.M., Underwood G.J.C. (2004). The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom Res.*, 19: 181-202.

- Covey** T.R., Schneider B.B., Javaheri H., LeBlanc J., Ivosev G., Corr J.J., Kovarik P. (2009). ESI, APCI, and MALDI. A comparison of the central analytical figures of merit: Sensitivity, reproducibility, and speed. En: *Electrospray and MALDI mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications* (Ed: Cole R.B.). John Wiley & Sons, pp. 441-490.
- Cox** E. (2014). Diatom identification in the face of changing species concepts and evidence of phenotypic plasticity. *J. Micropalaeontol.*, 33: 111-120.
- Cox** E. (2015). Coscinodiscophyceae, Mediophyceae, Fragilariophyceae, Bacillariophyceae (Diatoms). En: *Syllabus of plant families Adolf Engler's syllabus der pflanzenfamilien. Part 2/1 Photoautotrophic eukaryotic Algae* (Ed.: Frey W.). Stuttgart, Germany, pp. 61-102.
- Crawford** S., Higgins M.J., Mulvaney P., Wetherbee R. (2001). Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. *J. Phycol.*, 37: 543-554.
- Cruz de Carvalho** M.H., Sun H., Bowler C., Chua N. (2016). Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytol.*, 210: 497-510.
- Daboussi** F., Leduc S., Maréchal A., Dubois G., Guyot V., Perez-Michaut C., Amato A., Falciatore A., Juillerat A., Beurdeley M., Voytas D.F., Cavarec L., Duchateau P. (2014). Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat. Commun.*, doi:10. 1038/ncomms4831.
- Daglio** Y., Salum L., Erra-Balsells R., Rodríguez M. C, Matulewicz M. C. (2018). Characterization of nutrient status of *Halamphora luciae* (Bacillariophyceae) using matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur. J. Phycol.*, 53: 422-432.
- Dalle-Donne** I., Milzani A., Gagliano N., Colombo R., Giustarini D., Rossi R. (2008). Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.*, 10: 445-474.
- De Brouwer** J.F.C., Stal, L.J. (2002). Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 38: 464-472.
- De Brouwer** J.F.C., Wolfstein K., Stal, L.J. (2002). Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. *Eur. J. Phycol.*, 37: 37-44.
- De Brouwer** J.F.C., Neu L.J., Stal L.J. (2006). On the function of secretion of extracellular polymeric substances by benthic diatoms and their role in intertidal mudflats: a review of recent insights and views. En: *Functioning of microphytobenthos in estuaries* (Ed.: Kromkamp J.C., de Brouwer J.F.C.,

Blanchard G.F., Forster R.M., Créach V.). Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Amsterdam, pp. 45-61.

Decho A.W. (1994). Molecular scale events influencing the macro-scale cohesiveness of exopolymers. En: *Biostabilization of sediment* (Eds.: Krumbein W.E., Paterson D.M., Stal L.J.). BIS Verlag, pp. 135-148.

Decho A.W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.*, 20: 1257-1273.

Delattre C., Pierre G., Laroche C., Michaud P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 34: 1159-1179.

Depauw F., Rogato A., Ribera d'Alcala M., Falciatore A. (2012). Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *J. Exp. Bot.*, 63: 1575-1591.

de Tommasi E., Gielis J., Rogato A. (2017). Diatom frustule morphogenesis and function: a multidisciplinary survey. *Mar. Genom.*, 35: 1-18.

Diaz J., Ingall E., Benitez-Nelson C., Peterson D., de Jonge M., McNulty I., Brandes J. (2008). Marine Polyphosphate: A key player in geologic phosphorus sequestration. *Science*, 320: 652-655.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2014). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dittami S., Gurvan M., Collén J., Boyen C., Toron T. (2010). Chlorophyll-binding proteins revisited -a multigenic family of light-harvesting and stress proteins from a brown algal perspective. *BMC Evol. Biol.*, 10: 1-14.

Dole M. Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B. (1968). Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, 49: 2240-2249.

Domingues N., Matos A.R., Marques da Silva J., Cartaxana P. (2012). Response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to photooxidative stress resulting from high light exposure. *Plos One*, doi.org/10.1371/journal.pone.0038162.

Drebes G. (1966). On the life history of the marine plankton diatom *Stephanopyxis palmeriana*. *Helgoland Wiss. Meeresunter*, 13: 101-114.

Dreisewerd K. (2014). Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406: 2261-2278.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.

- Dunstan** G.A., Volkman J.K., Barret S.M., Leroi J.M., Jeffrey S.W. (1994). Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 35: 155-161.
- Dyhrman** S.T., Jenkins B., Rynearson T., Saito M., Mercier M., Alexander H., Whitney L., Drzewianowski A., Bulygin V., Bertrand E., Wu Z., Benitez-Nelson C., Heithoff A. (2012). The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0033768.
- Eixler** S., Karsten U., Selig U. (2006). Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxioiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia*, 45: 53-60.
- El-Aneed** A., Cohen A., Banoub J. (2009). Mass Spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 44: 210-230.
- Eng** J., McCormack A.L., Yates J.R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5: 976-989.
- Erra-Balsells** R. (2004). Del volar de las proteínas y de cómo lograrlo (Espectrometría de masa UV-MALDI). *Química Viva*, 3: 56-69.
- Ezequiel** J., Laviale M., Frankenbach S., Cartaxana P., Serôdio J. (2015). Photoacclimation state determines the photobehaviour of motile microalgae: the case of a benthic diatom. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 468: 11-20.
- Fabris** M., Matthijs M., Rombauts S., Vyverman W., Goossens A., Baart G.J. (2012). The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway. *Plant J.*, 70: 1004-1014.
- Facchinelli** F., Weber A. (2011). The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Front. Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2011.00050.
- Falkowski** P.G., Knoll A.H. (2007). Evolution of primary producers in the sea. Academic Press. New York, USA, 456 pp.
- Fan** L., Li R., Pan J. (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci.*, 20: 388-397.
- Feng** T., Yang Z., Zheng J., Xie Y., Li D., Murugan S., Yang W., Liu J., Li H. (2015). Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Sci. Rep.*, doi: 10.1038/srep10373.
- Fenn** J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246: 64-71.

Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281: 237-240.

Fields M.W., Hise A., Lohman E.J., Bell T., Gardner R.D., Corredor L., Moll K., Peyton B.M., Characklis G.W., Gerlach R. (2014). Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 4805-4816.

Flori S., Jouneau P.H., Bailleul B., Gallet B., Estrozi L., Moriscot C., Bastien O., Eicke S., Schober A., Bártulos C.R., Maréchal E., Kroth P.G., Petroutsos D., Zeeman S., Breyton C., Schoehn G., Falconet D., Finazzi G. (2017). Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nat. Commun.*, doi: 10.1038/ncomms15885.

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.

Fortunato A.E., Jaubert M., Enomoto G., Bouly J., Raniello R., Thaler M., Malviya S., Bernardes J., Rappaport F., Gentili B., Huysman M., Carbone A., Bowler C., d'Alcalà M., Ikeuchi M., Falciatore A. (2016). Diatom phytochromes reveal the existence of far-red-light-based sensing in the ocean. *Plant Cell*, 28: 616-628.

Führling J.I., Cramer J.T., Schneider J., Baruch P., Gerardy-Schahn R., Fedorov R. (2015). A quaternary mechanism enables the complex biological functions of octameric human UDP-glucose pyrophosphorylase, a key enzyme in cell metabolism. *Sci. Rep.*, doi: 10.1038/srep09618.

Fukuyama Y., Kolender A., Nishioka M., Nonami H., Matulewicz M.C., Erra-Balsells R., Cerezo A. (2005). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 4)-xylans from *Nothogenia fastigiata* using nor-harmane as matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19: 349-358.

Ge F., Huang W., Chen Z., Zhang C., Xiong Q., Bowler C., Yang J., Xu J., Hu H. (2014). Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell*, 26: 1681-1697.

Galachyants Y.P., Zakharova Y., Petrova D., Morozov A., Sidorov I., Marchenkov A., Logacheva M., Markelov M., Khabudaev K., Likhoshway Y., Grachev M. (2015). Sequencing of the complete genome of an araphid pennate diatom *Synedra acus* subsp. *radians* from Lake Baikal. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 461: 84-88.

Geider R., Plat T., Raven J. (1986). Size dependence of growth and photosynthesis in diatoms: a synthesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 30: 93-104.

Geider R.J., Laroche J., Greene R.M., Olaizola M. (1993). Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.*, 29: 755-766.

Geider R., Delucia E., Falkowski P.G., Finzi A., Grime P., Grace J., Kana T., La Roche J., Long S., Osborne B., Platt T., Prentice I., Raven J., Schlesinger W., Smetacek V., Stuart V., Sathyendranath S., Thomas R., Vogelmann T., Williams P., Woodward I. (2001). Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Glob. Change Biol.*, 7: 849-882.

Geider R., La Roche J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.*, 37: 1-17.

Gelos E., Spagnuolo J. (1982). Estudio composicional de los sedimentos de fondo de la Ría de Bahía Blanca entre Puerto Cuatrerros y Puerto Ingeniero White. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 1: 3-22.

Girollo D., Vieira A.A., Paulsen B.S. (2003). Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 39: 1109-1115.

González M., Parra O., Cifuentes A. (1995). Técnicas de cultivo de microalgas en el laboratorio. En: *Manual de métodos ficológicos* (Ed.: Alveal K., Ferrario M. E., Oliveira E., Sar E.). Anibal Pinto S.A., Chile, pp. 238-239.

Goto N., Mitamura O., Terai H. (2001). Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 257: 73-86.

Graham L., Wilcox L. (2009). *Algae*, 2^{ed.} Benjamin Cummings (Pearson), San Francisco, CA., USA, 640 pp.

Granum E., Mykkestad S.M. (2001). Mobilization of β -1,3-glucan and biosynthesis of amino acids induced by NH_4^+ addition to N-limited cells of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 37: 772-782.

Granum E., Kirkvold S., Mykkestad S.M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 242: 83-94.

Granum E., Raven J., Leegood R.C. (2005). How do marine diatoms fix 10 billion tonnes of inorganic carbon per year?. *Can. J. Bot.*, 83: 898-908.

Gross M. (2012). The mysteries of the diatoms. *Curr.Biol.*, 22:581-585.

- Grouneva I.**, Rokka A., Aro E. (2011). The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *J. Proteome Res.*, 10: 5338-5353.
- Grouneva I.**, Muth-Pawlak D., Battchikova N., Aro E. (2016). Changes in relative thylakoid protein abundance induced by fluctuating light in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Proteome Res.*, 15: 1649-1658.
- Gruber A.**, Kroth P.G. (2017). Intracellular metabolic pathway distribution in diatoms and tools for genome-enabled experimental diatom research. *Phil. Trans. R. Soc. B*, doi.org/10.1098/rstb.2016.0402.
- Guerrini F.**, Cangini M., Boni L. (2000). Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *J. Phycol.*, 36: 882-890.
- Gügi B.**, Le Costaouëc T., Burel C., Lerouge P., Helbert W., Bardor M. (2015). Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Mar. Drugs*, 13: 5993-6018.
- Guillard R.R.L.** (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of Marine Invertebrate Animals* (Ed.: Smith W.L., Chanley M.H.). Plenum Press, New York, USA, pp. 26-60.
- Guinder V.A.**, Molinero J.C., López Abbate C.M., Berasategui A.A., Popovich C.A., Spetter C.V., Marcovecchio J.E., Freije R.H. (2017). Phenological changes of blooming diatoms promoted by compound bottom-Up and Top-Down controls. *Estuar. Coasts*, 40: 95-104.
- Guzman-Murillo M.**, Ascencio F. (2000). Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 473-478.
- Harvey D.J.** (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.*, 18: 349-451.
- Harvey D.J.** (2006). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update covering the period 1999–2000. *Mass Spectrom. Rev.*, 25: 595-662.
- Hashir M.A.**, Stecher G., Bonn G.K. (2008). Identification of low molecular weight carbohydrates employing new binary mixtures for matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22: 2185-2194.
- Hasle G.R.**, Syvertsen E.E. (1997). Marine diatoms. En: *Identifying marine phytoplankton* (Ed.: Thomas C.R.). Academic Press, San Diego, CA, pp. 5-385.

- Hehenberger** E., Burki F., Kolisko M., Keeling P.J. (2016). Functional relationship between a dinoflagellate host and its diatom endosymbiont. *Mol. Biol. Evol.*, 33: 2376-2390.
- Hein** M., Pedersen M.F., Sand-Jensen K. (1995). Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 118: 247-253.
- Herbstová** M., Bína D., Kaňa R., Vácha F., Litvín R. (2017). Red-light phenotype in a marine diatom involves a specialized oligomeric red-shifted antenna and altered cell morphology. *Sci. Rep.*, doi: 10.1038/s41598-017-12247-0.
- Hernández** I., Whitton B.A. (1996). Retention of *p*-nitrophenol and 4-methylumbelliferone by marine macroalgae and implications for measurement of alkaline phosphatase activity. *J. Phycol.*, 32: 819-825.
- Hernández** I., Niell X., Whitton B.A. (2002). Phosphatase activity of benthic marine algae. An overview. *J. Appl. Phycol.*, 14: 475-487.
- Hessen** D.O., Anderson T.R. (2008). Excess carbon in aquatic organisms and ecosystems: physiological, ecological, and evolutionary implications. *Limnol. Oceanogr.*, 53: 1685-1696.
- Higgins** M.J., Molino P., Mulvaney P., Wetherbee R. (2003). The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility. *J. Phycol.*, 39: 1181-1193.
- Hildebrand** M. (2005). Cloning and functional characterization of ammonium transporters from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 41: 105-113.
- Hildebrand** M. (2008). Diatoms, biomineralization processes, and genomics. *Chem. Rev.*, 108: 4855-4874.
- Hildebrand** M., Manandhar-Shrestha K., Abbriano R. (2017). Effects of chrysolaminarin synthase knockdown in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Implications of reduced carbohydrate storage relative to green algae. *Algal Res.*, 23: 66-77.
- Hoagland** K.D., Rosowski J.R., Gretz M.R., Roemer, S.C. (1993). Diatom extracellular polymeric substances: Function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.*, 29: 537-566.
- Hockin** N.L., Mock T., Mulholland F., Kopriva S., Malin G. (2012). The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiol.*, 158: 299-312.
- Hoffman** E., Stroobant V. (2007). Mass spectrometry: Principles and applications. John Wiley & Sons. England, 489 pp.

- Holzmann** M., Berney C., Hohenegger J. (2006) Molecular identification of diatom endosymbionts in nummulitid Foraminifera. *Symbiosis*, 42: 93-101.
- Hu** Q., Noll R., Li H., Makarov A., Hardman M., Cooks G. (2005). The orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.*, 40: 430-443.
- Hu** Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.*, 4: 621-639.
- Jakob** T., Wagner H., Stehfest K., Wilhelm C. (2007). A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, 58: 2101-2112.
- Jallet** D., Caballero M.A., Gallina A.A., Youngblood M., Peers G. (2016). Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Res.*, 18: 51-60.
- Janse** I., van Rijssel M., Ottema A., Gottschal J.C. (1999). Microbial breakdown of *Phaeocystis* mucopolysaccharides. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 1447-1457.
- Jaubert** M., Bouly J.P., Ribera d'Alcala M., Falciatore A. (2017). Light sensing and responses in marine microalgae. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 37:70-77.
- Jensen** K., Moestrup O., Schmid A.M. (2003). Ultrastructure of the male gametes from two centric diatoms, *Chaetoceros laciniosus* and *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, 42: 98-105.
- Jian** J., Zeng D., Wei W., Lin H., Li P., Liu W. (2017). The combination of RNA and protein profiling reveals the response to nitrogen depletion in *Thalassiosira pseudonana*. *Sci. Rep.*, doi:10.1038/s41598-017-09546-x.
- Juhas** M., von Zadow A., Spexard M., Schmidt M., Kottke T., Büchel C. (2014). A novel cryptochrome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* influences the regulation of light-harvesting protein levels. *FEBS J.*, 281: 2299-2311.
- Ke** J., Behal R.H., Back S.L., Nikolau B.J., Wurtele E.S., Oliver D.J. (2000). The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.*, 123: 497-508.
- Kim** H.S., Hong J.T., Kim Y., Han S. (2011). Stimulatory effect of β -glucans on immune cells. *Immune Netw.*, 11: 191-195.
- Kim** J., Brown C.M., Kim M.K., Burrows E.H., Bach S., Lun D.S., Falkowski P.G. (2017). Effect of cell cycle arrest on intermediate metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114: 8007-8016.
- Kjørboe** T. (2008). A mechanistic approach to plankton ecology. Princeton University Press. New Jersey, USA, 209 pp.

Krammer K., Lange-Bertalot H. (1988). Bacillariophyceae. Parte 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Eds.: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. y Mollenhauer D.). Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 1-596.

Krishnamurthy K.V. (1999). Fluorescence microscopic cytochemistry. En: *Methods in cell wall cytochemistry* (Ed.: Krishnamurthy K.V.). CRC press, Florida, pp. 151-176.

Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C., Sumper M. (2000). Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 14133-14138.

Kröger N., Poulsen N. (2008). Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annu. Rev. Genet.*, 42: 83-107.

Kroth P.G., Chiovitti A., Gruber A., Martin-Jezequel V., Mock T., Schnitzler Parker M., Stanley M.S., Kaplan A., Caron L., Weber T., Maheswari U., Armbrust V., Bowle C. (2008). A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0001426.

Kuczyńska P., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Mar. Drugs*, 13: 5847-5881.

La Colla N., Negrin V., Marcovecchio J.E., Botté S. (2015). Dissolved and particulate metals dynamics in a human impacted estuary from the SW Atlantic. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 166: 45-55.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Landoni M., Duschak V., Erra-Balsells R., Couto A.S. (2008). UV-MALDI Mass spectrometry analysis of NBD glycosphingolipids without an External Matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19: 923-926.

Lange-Bertalot H. (2001). *Navicula sensu stricto*. 10 Genera separated from *Navicula sensu lato*. *Frustulia*. En: *Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats* (Ed.: Lange-Bertalot H.). Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag. K.G., pp. 1-526.

Laštovičková M., Chmelik J., Bobalova J. (2009). The combination of simple MALDI matrices for the improvement of intact glycoproteins and glycans analysis. *Int. J. Mass Spectrom.*, 281: 82-88.

Leandro S.M., Gil M., Delgadillo I. (2003). Partial characterisation of exopolysaccharides exudated by planktonic diatoms maintained in batch cultures. *Acta Oecol.*, 24: 49-55.

- Le Costaouëc** T., Unamunzaga C., Mantecon L., Helbert W. (2017). New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.*, 26: 172-179.
- Leonardi** R., Zhang Y.M., Rock C.O., Jackowski S. (2005). Coenzyme A: Back in action. *Prog. Lipid Res.*, 44: 125-153.
- Leonardi** P.I.; Popovich C., Damiani M.C. (2011). Feedstocks for second-generation biodiesel: microalgae's biology and oil composition. En: *Economic effects of biofuel production*. (Ed.: dos Santos Bernardes M.A.). In Tech Publisher.Croacia, pp.318-346.
- Leonardos** N., Geider R. (2004). Responses of elemental and biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* to growth under varying light and nitrate: phosphate supply ratios and their influence on critical N:P. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 2105-2114.
- Levitan** O., Dinamarca J., Zelzion E., Lun D., Guerra L.T., Kim M.K., Kim J., Van Mooy B.A.S., Bhattacharya D., Falkowski P. (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *P. Natl. Acad. Sci.USA*, 112: 412-417.
- Levkov** Z. (2009). *Amphora sensu lato*. En: *Diatoms of Europe: diatoms of the european inland waters and comparable habitats* vol. 5 (Ed.: Lange-Bertalot H.). A.R.G. Gantner Verlag K.G. Ruggell, Liechtenstein, 916 pp.
- Lewis** W.M. (1984). The diatom sex clock and its evolutionary significance. *Am. Nat.*, 123: 73-80.
- Liang** J.R., Ai X.X., Gao Y.H., Chen C.P. (2013). MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Appl. Phycol.*, 25: 477-484.
- Lin** H.Y., Shih C.Y., Liu H.C., Chang J., Chen L.C., Chen Y.R., Lin H.T., Chang Y.Y., Hsu C.H., Lin H.J. (2013). Identification and characterization of an extracellular alkaline phosphatase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biotechnol.*, 15: 425-436.
- Lin** Q., Liang J.R., Huang Q.Q., Luo C.S., Anderson D.M., Bowler C., Chen C., Li X., Gao Y. (2017). Differential cellular responses associated with oxidative stress and cell fate decision under nitrate and phosphate limitations in *Thalassiosira pseudonana*: Comparative proteomics. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0184849.
- Liu** S., Guo Z.L., Li T., Huang H., Lin S.J. (2011). Photosynthetic efficiency, cell volume, and elemental stoichiometric ratios in *Thalassiosira weissflogii* under phosphorus limitation. *Chin. J. Oceanol.Limn.*, 29:1048-1056.
- Lohr** M., Wilhelm C. (1999). Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 8784-8789
- Lomas** M., Glibert P. (2000). Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *J. Phycol.*, 36: 903-913.

Lommer M., Specht M., Roy A., Kraemer L., Andreson R., Gutowska M., Wolf J., Bergner S., Schilhabel M., Klostermeier U., Beiko R., Rosenstiel P., Hippler M., LaRoche J. (2012). Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biol.*, 13: 1-20.

Longworth J., Wu D., Huete-Ortega M., Wright P.C., Vaidyanathan S. (2016). Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. *Algal Res.*, 18: 213-224.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Lynn S.G., Kilham S., Kreeger D., Interlandi S.J. (2000). Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the fresh water diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 36: 510-522.

Lyon B.R., Lee P., Bennett J., DiTullio G., Jarnech M. (2011). Proteomic analysis of a sea-ice diatom: salinity acclimation provides new insight into the dimethylsulfoniopropionate production pathway. *Plant Physiol.*, 157: 1926-1941.

Ma Y.H., Wang X., Niu Y.F., Yang Z.K., Zhang M.H., Wang Z.M., Yang W., Liu J., Li H. (2014). Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microb. Cell Fact.*, doi: 10.1186/s12934-014-0100-9.

Magaletti E., Urbani R., Sist P., Ferrari C.R., Cicero A.M. (2004). Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N and P limitation. *Eur. J. Phycol.*, 39: 133-142.

Maheswari U., Jabbari K., Petit J.L., Porcel B.M., Allen A.E., Cadoret J.P., De Martino A., Heijde M., Kaas R., La Roche J., Lopez P., Jézéquel V., Meichenin A., Mock T., Schnitzler Parker M., Vardi A., Armbrust V., Weissenbach J., Katinka M., Bowler C. (2010). Digital expression profiling of novel diatom transcripts provides insight into their biological functions. *Genome Biol.*, doi: 10.1186/gb-2010-11-8-r85.

Makri A., Bellou S., Birkou M., Papatrehas K., Papatrehas K., Dolapsakis N.P., Bokas D., Papanikolaou S., Aggelis G. (2011). Lipid synthesized by micro-algae grown in laboratory- and industrial-scale bioreactors. *Eng. Life Sci.*, 11: 52-58.

Mann D.G., Chepurnov V.A., Idei M. (2003). Mating system, sexual reproduction, and auxosporulation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta). *J. Phycol.*, 39: 1067-1084.

Marshansky V., Futai M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr.Opin. Cell Biol.*, 20: 415-426.

- Martin** P., Van Mooy B.A.S., Heithoff A., Dyhrman S.T. (2011). Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *ISME J.*, 5: 1057-1060.
- Martín** L.A., Popovich C.A., Martínez A.M., Damiani M.C., Leonardi P.I. (2016). Oil assessment of *Halamphora coffeaeformis* diatom growing in a hybrid two-stage system for biodiesel production. *Renew. Energ.*, 92: 127-135.
- Matsuda** Y., Kroth P.G. (2014). Carbon fixation in diatoms. En: *The Structural Basis of Biological Energy Generation* (Ed.: Hohmann-Marriott M.F.). Springer Netherlands, pp. 335-362.
- Matthijs** M., Fabris M., Obata T., Foubert I., Franco-Zorrilla J.M., Solano R., Fernie, Vyverman A.R., Goossens A. (2017). The transcription factor bZIP14 regulates the TCA cycle in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *EMBO J.*, 36: 1559-1576.
- McConville** M.J., Bacic A., Clarke A.E. (1986). Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom *Stauroneis amphioxys* (Gregory). *Carbohydr. Res.*, 153: 330-333.
- McLachlan** D.H., Brownlee C., Taylor A., Geider R., Underwood G.J.C. (2009). Light-induced motile responses of the estuarine benthic diatoms *Navicula perminuta* and *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 45: 592-599.
- McLafferty** F.W., Turecek F. (1993). Interpretation of mass spectra. University Science Books. California, 371 pp.
- Medlin** L., Kaczmarska I. (2004). Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia*, 43: 245-270.
- Medlin** L. (2016). Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia*, 55: 79-103.
- Medlin** L. (2017). Evolution of the diatoms: IX. Two datasets resolving monophyletic classes of diatoms are used to explore the validity of adding short clone library sequences to the analysis. *Eur. J. Phycol.*, 52: 90-103.
- Mereschkowsky** C. (1903). Les types de l'endochrome chez les diatomées. *Botanicheskii Zhurnal*, 21: 1-106.
- Michalski** A., Damoc E., Hauschild J.P., Lange O., Wiegand A., Makarov A., Nagaraj N., Cox J., Mann M., Horning S. (2011). Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell Proteomics*, doi: 10.1074/mcp.M111.011015.

Mishra S.K., Suh W.I., Farooq W., Moon M., Shrivastav A., Park M., Yang J. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technol.*, 155: 330-333.

Mock T., Otilar R.P., Strauss J., McMullan M., Paaanen P., Schmutz J., Salamov A., Sanges R., Toseland A., Ward B., Allen A., Dupont C., Frickenhaus S., Maumus F., Veluchamy A., Wu T., Barry K.W., Falciatore A., Ferrante M. (2017). Evolutionary genomics of the cold-adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature*, 541:536-540.

Molino P.J., Hodson O.M., Quinn J.F., Wetherbee R. (2006). Utilizing QCM-D to characterize the adhesive mucilage secreted by two marine diatom species *in situ* and in real-time. *Biomacromolecules*, 7: 3276-3282.

Molino P.J., Wetherbee R. (2008). The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*, 24: 365-379.

Moog D., Stork S., Reislöhner S., Grosche C., Maier U.G. (2015). *In vivo* localization studies in the stramenopile alga *Nannochloropsis oceanica*. *Protist*, 166: 161-171.

Muhseen Z., Xiong Q., Chen Z., Ge F. (2015). Proteomics studies on stress responses in diatoms. *Proteomics*, 15: 3943-3953.

Myklestad S., Haug A. (1972). Production of carbohydrates by the marine *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 9: 125-136.

Myklestad S. (1989). Production, chemical structure, metabolism, and biological function of the (1→3)-linked, β 3-D-glucans in diatoms. *Biol. Oceanogr.*, 6: 313-326.

Myklestad S. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci. Total Environ.*, 165: 155-164.

Nagao R., Tomo T., Noguchi E., Suzuki T., Okumura A., Narikawa R., Enami I., Ikeuchi M. (2012). Proteases are associated with a minor fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein from the diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1817: 2110-2117.

Negrin V.L., Botte S.E., Pratolongo P.D., González Trilla G., Marcovecchio J.E. (2016). Ecological processes and biogeochemical cycling in salt marshes: synthesis of studies in the Bahía Blanca estuary (Argentina). *Hydrobiologia*, 774: 217-235.

Nelson N., Perzov N., Cohen A., Hagai K., Padlerand V., Nelson H. (2000). The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J. Exp. Biol.*, 203: 89-95.

- Nicolau A.**, Santos L., Santos C., Mota M. (2014). Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) applied to diatom identification: influence of culturing age. *Aquat. Biol.*, 20: 139-144.
- Nie L.**, Wu G., Culley D.E., Scholten J.C.M., Zhang W. (2007). Integrative analysis of transcriptomic and proteomic data: challenges, solutions and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27: 63-75.
- Nielsen P.H.**, Jahn P. (1999). Extraction of EPS. En: *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function* (Eds.:Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C.). Springer, Berlin, pp. 49-72.
- Nonami H.**, Fukui S., Erra-Balsells R. (1997). β -carbolinealkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: a comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *J. Mass Spectrom.*, 32: 287-296.
- Nunn B.**, Aker J., Shaffer S., Tsai Y., Strzepek R., Boyd P., Freeman T., Brittnacher M., Malmström L., Goodlett D. (2009). Deciphering diatom biochemical pathways via whole-cell proteomics. *Aquat. Microb. Ecol.*, 55: 241-253.
- Obata T.**, Fernie A.R., Nunes-Nesi A. (2013). The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. *Metabolites*, 3: 325-346.
- Obernosterer I.**, Herndl G.J. (1995). Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N-P ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116: 247-257.
- Olsen J.V.**, Macek B., Lange O., Makarov A., Horning S., Mann M. (2007). Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods*, 4: 709-712.
- Padisák J.**, Soróczki-Pintér É., Rezner Z. (2003). Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton-an experimental study. *Hydrobiologia*, 500: 243-257.
- Pan J.**, Bournod C., Pizani N., Cuadrado D., Carmona N. (2013). Characterization of microbial mats from a siliciclastic tidal flat (Bahía Blanca Estuary, Argentina). *Geomicrobiol. J.*, 30: 665-674.
- Parodi E.**, Barria de Cao S. (2003). Benthic microalgal communities in the inner part of the Bahía Blanca estuary (Argentina): a preliminary qualitative study. *Oceanol. Acta*, 25: 279-284.
- Paulsen B.S.**, Myklestad S. (1978). Structural studies of the reserve glucan produced by the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *Carbohydr. Res.*, 62: 386-388.

- Paz B.**, Riobó P., Franco J.M. (2011). Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25: 3627-3639.
- Peers G.S.**, Milligan A., Harrison P. (2000). Assay optimization and regulation of urease activity in two marine diatoms. *J. Phycol.*, 36: 523-528.
- Penna A.**, Berluti S., Penna N., Magnani M. (1999). Influence of nutrient ratios on the *in vitro* extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *J. Plankton Res.*, 21: 1681-1690.
- Pérez-Lloréns L.**, Benítez E., Vergara J., Berges J. (2003). Characterization of proteolytic enzyme activities in macroalgae. *Eur. J. Phycol.*, 38: 55-64.
- Perry M.J.** (1976). Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in oligotrophic waters of central North-Pacific. *Limnol. Oceanogr.*, 21: 88-107.
- Pickett-Heaps J.D.**, Schmid A. Edgar L.A. (1990). The cell biology of diatom valve formation. En: *Progress in Phycological Research* (Eds.: Round F.E., Chapman D.J.). Biopress Bristol, pp. 1-168.
- Popovich C.A.**, Marcovecchio J. (2008). Spatial and temporal variability of phytoplankton and environmental factors in a temperate estuary of South America (Atlantic coast, Argentina). *Cont. Shelf Res.*, 28: 236-244.
- Popovich C.A.**, Damiani C., Constenla D., Martínez A.M., Freije H., Giovanardi M., Pancaldi S., Leonardi P.I. (2012). *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource Technol.*, 114: 287-293.
- Powell N.**, Shilton A., Chistia Y., Pratt S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae – defining the polyphosphate dynamics. *Water Res.*, 43: 4207-4213.
- Puddu A.**, Zoppini A., Fazi S., Rosati M., Amalfitano S., Magaletti E. (2003). Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46: 257-268.
- Pulz O.**, Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biot.*, 65: 635-648.
- Reinfelder J.R.**, Milligan A., Morel F. (2004). The role of the C₄ pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom. *Plant Physiol.*, 135: 2106-2111.
- Remmers I.M.**, Martens D.E., Wijffels R.H., Lamers P.P. (2017). Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen

starvation at different light intensities. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0175630.

Remmers I.M., D'Adamo S., Martens D.E., de Vos R., Mumm R., America A., Cordewener J., Bakker L., Peters S., Wijffels R., Lamers P. (2018). Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during nitrogen limitation. *Algal Res.*, 35: 33-49.

Revsbech N.P., Jorgensen B.B., Blackburn T.H., Cohen Y. (1983). Microelectrode studies of the photosynthetic and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 1062-1074.

Reynolds C.S. (1984). Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biol.*, 14: 111-142.

Reynolds C.S. (1993). The ecology of the freshwater phytoplankton. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 396 pp.

Ritchie R.J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46: 115-126.

Roberts K., Granum E., Leegood R., Raven J. (2007). C₃ and C₄ pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control. *Plant Physiol.*, 145, 230-235.

Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R., (2008). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102: 100-112.

Roessler P.G. (1987). UDP glucose pyrophosphorylase activity in the diatom *Cyclotella cryptica*: pathway of chrysolaminarin biosynthesis. *J. Phycol.*, 23: 494-498.

Rosenwasser S., Graff van Creveld S., Schatza D., Malitskya S., Tzfadiaa O., Aharonia A., Levinb Y., Gabashvilb A., Feldmesserb E., Vardi A. (2014). Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Plos One*, 1: 1-14.

Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. (1990). The diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 747 pp.

Ruddy G., Turley C.M., Jones T. (1998). Ecological interaction and sediment transport on an intertidal mudflat I. *Geol. Soc. (London)*, 139: 149-166.

Saburova M.A., Polikarpov I.G. (2003). Diatom activity within soft sediments: behavioural and physiological processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 251: 115-126.

Sarthou G., Timmermans K.R., Blain S., Tréguer P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *J. Sea Res.*, 53: 25-42.

Sayanova O., Mimouni V., Ulmann L., Morant-Manceau A., Pasquet V., Schoefs B., Napier J.A. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, doi: 10.1098/rstb.2016.0407.

Scheffel A., Poulsen N., Shian S., Kröger N. (2011). Nanopatterned protein microrings from a diatom that direct silica morphogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 108: 3175-3180.

Schellenberger Costa B., Sachse M., Jungandreas A., Bartulos C.R., Gruber A., Jakob T., Kroth P.G., Wilhelm C. (2013). Aureochrome 1a is involved in the photoacclimation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0074451.

Scherer C., Wiltshire K., Bickmeyer U. (2008). Inhibition of multidrug resistance transporters in the diatom *Thalassiosira rotula* facilitates dye staining. *Plant Physiol. Biochem.*, 46: 100-103.

Schiller J., Süß R., Arnhold J., Fuchs B., Lessig J., Müller M., Petković M., Spalteholz H., Zschörnig O., Arnold K. (2004). Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog. Lipid Res.*, 43: 449-488.

Schmitz J., Srikanth N., Hüdig M., Poschmann G., Lercher M., Maurino V. (2017). The ancestors of diatoms evolved a unique mitochondrial dehydrogenase to oxidize photorespiratory glycolate. *Photosynth. Res.*, 132: 183-196.

Scholz B., Liebezeit G. (2012). Growth responses of 25 benthic marine Wadden Sea diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea) in relation to varying culture conditions. *Diatom Res.*, 27: 65-73.

Schultz M.P. (2007). Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling*, 23: 331-341.

Schwartz S., Reyzer M., Caprioli R. (2003). Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom.*, 38: 699-708.

Sen C.K., Packer L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72: 653-669.

Shea E.M., Carpita. N.C. (1988). Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *J. Chromatogr.*, 445: 424-428.

Shih C.Y., Kang L.K., Chang J. (2015). Transcriptional responses to phosphorus stress in the marine diatom, *Chaetoceros affinis*, reveal characteristic genes and expression patterns in phosphorus uptake and intracellular recycling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 470: 43-54.

- Smith** D.J., Underwood G.J.C. (2000). The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *J. Phycol.*, 36: 321-333.
- Smith** S.R., Abbriano R.M., Hildebrand M. (2012). Comparative analysis of diatom genomes reveals substantial differences in the organization of carbon partitioning pathways. *Algal Res.*, 1: 2-16.
- Snoeijs** P., Balashova N. (1998). Intercalibration and distribution of diatom species in the Baltic Sea. V. Opulus press. Uppsala, 144 pp.
- Spetter** C., Popovich C., Arias A., Asteasuain R., Freije R., Marcovecchio J. (2015). Role of nutrients in phytoplankton development during a winter diatom bloom in a eutrophic South American estuary (Bahía Blanca, Argentina). *J. Coastal Res.*, 299: 76-87.
- Staats** N., de Winder B., Stal L., Mur L. (1999). Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol.*, 34: 161-169.
- Staats** N., Stal L.J., Mur L.R. (2000). Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 249: 13-27.
- Steen** H., Mann M. (2004). The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 699-711.
- Stone** B. (2006). Callose and related glucans. *ELS*, doi:10.1038/npg.els.00041.
- Størseth** T.R., Kirkvold, S., Skjermo J., Reitan K.I. (2006). A branched β -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydr. Res.*, 341: 2108-2114.
- Strickland** J.D., Parsons T.R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada Bulletin*, 167: 185-199.
- Sumper** M., Brunner E., Lehmann G. (2005). Biomineralization in diatoms: Characterization of novel polyamines associated with silica. *FEBS Letters*, 579: 3765-3769.
- Sumper** M., Hett R., Lehmann G., Wenzl S. (2007). A code for lysine modifications of a silica biomineralizing silaffin protein. *Angew. Chem.*, 46: 8405-8408.
- Sun** J., Liu D. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.*, 25: 1331-1346.
- Svensson** F., Norberg J., Snoeijs P. (2014). Diatom cell size, coloniality and motility: trade-offs between temperature, salinity and nutrient supply with climate change. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0109993.

- Takabayashi** M., Wilkerson F., Robertson D. (2005). Response of glutamine synthetase gene transcription and enzyme activity to external nitrogen sources in the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 41: 84-94.
- Tanaka** K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida S., Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analysis up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2: 151-153.
- Tanaka** T., Maeda Y., Veluchamy A., Tanaka M., Abida H., Maréchal E., Bowler C., Muto M., Sunaga Y., Tanaka M., Yoshino T. (2015). Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell.*, 27: 162-176.
- Taylor** A.R., Brownlee C., Wheeler G. (2012). Proton channels in algae: reasons to be excited. *Trends Plant Sci.*, 17: 675-684.
- Tesson** B., Hildebrand M. (2013). Characterization and localization of insoluble organic matrices associated with diatom cell walls: insight into their roles during cell wall formation. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0061675.
- Thajuddin** N., Ilavarasi A., Baldev E., MubarakAli D., Alharbi N., Chinnathambi A., Alharbi S. (2015). Stress induced lipids accumulation in naviculoid marine diatoms for bioenergy application. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.*, 4: 18-24.
- Theriot** E.C., Ashworth M., Ruck E., Nakov T., Jansen R.K. (2010). A preliminary multi-gene phylogeny of the diatoms. *Plant Ecol. Evol.*, 143: 278-296.
- Thompson** S., Taylor A., Brownlee C., Callow M., Callow J. (2008). The role of nitric oxide in diatom adhesion in relation to substratum properties. *J. Phycol.*, 44: 967-976.
- Tortell** P. (2000). Evolutionary and ecological perspectives on carbon acquisition in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 744-750.
- Tréguer** P., Bowler C., Moriceau B., Dutkiewicz S., Gehlen M., Aumont O., Bittner L., Dugdale R., Finkel Z., Iudicone D., Jahn O., Guidi L., Lasbleiz M., Leblanc K., Levy M., Pondaven P. (2018). Influence of diatom diversity on the ocean biological carbon pump. *Nat. Geosci.*, 11:27-37.
- Underwood** G.J.C. (1994). On Beyond BACI: Sampling designs that might reliably detect environmental disturbances. *Ecol. Appl.*, 4: 3-15.
- Underwood** G.J.C., Paterson D. (2003). The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Adv. Bot. Res.*, 40: 183-233.
- Underwood** G.J.C., Boulcott M., Raines C.A., Waldron K. (2004). Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: Dynamics, changes

in composition, and pathways of production: Exopolymer production by diatoms. *J. Phycol.*, 40: 293-304.

Urbani R., Magaletti E., Sist P., Cicero A.M. (2005). Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of P-depletion and growth status. *Sci. Total Environ.*, 353: 300-306.

Valenzuela J., Mazurie A., Carlson R.P., Gerlach R., Cooksey K.E., Peyton B. Fields M.W. (2012). Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels*, 5: 1-17.

Valenzuela J., Carlson R.P., Gerlach R. Cooksey K., Peyton B., Fields M. (2013). Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 7049-7059.

Valle K.C., Nymark M., Aamot I., Hancke K., Winge P., Andresen K., Johnsen G., Brembu T., Bones A. (2014). System responses to equal doses of photosynthetically usable radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plos One*, doi.org/10.1371/journal.pone.0114211.

van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M. (1995). *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. Cambridge, 637 pp.

Van Mooy B.A.S., Fredricks H.F., Pedler B.E., Dyhrman S.T., Karl D.M., Koblížek M., Lomas M.W., Mincer T.J., Moore L.R., Moutin T., Rappé M., Webb E. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature (London)*, 458: 69-72.

Vårum KM, Mykkestad S. (1984). Effects of light, salinity and nutrient limitation on the production of β -1,3-D-glucan and exo-D-glucanase activity in *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 83: 13-25.

Veith T., Brauns J., Weisheit W., Mittag M., Büchel C. (2009). Identification of a specific fucoxanthin-chlorophyll protein in the light harvesting complex of photosystem I in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787: 905-912.

Visca A., Di Caprio F., Spinelli R., Altimari P., Cicci A., Iaquaniello G., Toro L., Pagnanelli F. (2017). Microalgae cultivation for lipids and carbohydrates production. *Chem. Engineer. Trans.*, 57: 1-6.

Wagner H, Jakob T, Fanesi A, Wilhelm C. (2017). Towards an understanding of the molecular regulation of carbon allocation in diatoms: the interaction of energy and carbon allocation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, doi: 10.1098/rstb.2016.041020160410.

Wan L., Han J., Sang M., Li A., Wu H. (2012). *De novo* transcriptomic analysis of an oleaginous microalga: pathway description and gene discovery for

production of next-generation biofuels. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0035142.

Wang X.X., Huang B.Q., Zhang H. (2014). Phosphorus deficiency affects multiple macromolecular biosynthesis pathways of *Thalassiosira weissflogii*. *Acta Oceanol. Sin.*, 33: 85-91.

Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Humphery-Smith I. (1995) Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16: 1090-1094.

Waterkeyn L., Bienfait A. (1987). Localization and function of beta 1,3-glucans (callose and chrysolaminarin) in *Pinnularia* genus (Diatoms). *Cellule*, 74: 199-226.

Wetherbee R., Lind J.L., Burke J., Quatrano R.S. (1998). The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *J. Phycol.*, 34: 9-15.

Whitney S.M., Houtz R.L., Alonso H. (2011). Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol.*, 155: 27-35.

Wilhelm C., Büchel C., Fisahn J., Goss R., Jakob T., Laroche J., Lavaud J., Lohr M., Riebesell U., Stehfest K., Valentin K., Kroth P.G. (2006). The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist*, 157: 91-124.

Wilhelm C., Jungandreas A., Jakob T., Goss R. (2014). Light acclimation in diatoms: from phenomenology to mechanisms. *Mar. Genom.*, 16: 5-15.

Winkler U., Stabenau H. (1995). Isolation and characterization of peroxisomes from diatoms. *Planta*, 195: 403-407.

Witkowski A., Brehm U., Palińska K., Rhiel E. (2012). Swarm-like migratory behaviour in the laboratory of a pennate diatom isolated from North Sea sediments. *Diatom Res.*, 27: 95-100.

Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. En: *Algal Culturing Techniques* (Ed.: Andersen R.A.). Elsevier Academic Press, pp. 269-285.

Wu Y., Yue F., Xu J., Beardall J. (2011). Differential photosynthetic responses of marine planktonic and benthic diatoms to ultraviolet radiation under various temperature regimes. *Biogeosciences*, 14: 5029-5037.

Wurch L.L., Haley S.T., Orchard E.D., Gobler C.J., Dyhrman S.T. (2011). Nutrient-regulated transcriptional responses in the brown tide-forming alga *Aureococcus anophagefferens*. *Environ. Microbiol.*, 13: 468-481.

- Xia S.**, Li A.F., Wan L.L., Sang M., Zhang C.W. (2013). Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*. *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, 31: 1163-1173.
- Xia S.**, Gao B., Li A., Xiong J., Ao Z., Zhang C. (2014). Preliminary Characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs*, 12: 4883-4897.
- Xiao R.**, Zheng Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.*, 34:1225-1244.
- Yamamoto T.**, Suzuki M., Kim K., Asaoka S. (2012). Growth and uptake kinetics of phosphate by benthic microalga *Nitzschia* sp. isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Phycol. Res.*, 60: 223-228.
- Yang Z.K.**, Niu Y.F., Ma Y.H., Xue J., Zhang M.H., Yang W.D., Liu J.S., Lu S.H., Guan Y., Li H.Y. (2013). Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol. Biofuels.*, doi: 10.1186/1754-6834-6-67.
- Yang Z.K.**, Ma Y.H., Zheng J.W., Yang W.D., Liu J.S., Li H.Y. (2014a). Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.*, 26: 73-82.
- Yang Z.K.**, Zheng J.W., Niu Y.F., Yang W.D., Liu J.S., Li H.Y. (2014b). Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environ. Microbiol.*, 16: 1793-1807.
- Yodsuwan N.**, Sawayama S., Sirisansaneeyakul S. (2017). Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *AGNR*, 51:190-197.
- Young R.J.**, Lovell P.A. (1991). Introduction to polymers, 2nd ed. University Press. Cambridge, 443 pp.
- Yu E.T.**, Zendejas F.J., Lane P.D., Gaucher S., Simmons B.A., Lane T.W. (2009). Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation. *J. Appl. Phycol.*, 21: 669-681.
- Zenobi R.**, Knochenmuss R. (1998). Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 17: 337-366.
- Zhang W.**, Li F., Nie L. (2010). Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiol.*, 156: 287-301.
- Zhang H.**, Ge Y. (2011). Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 4: 1-11.

Zhang S.F., Yuan C.J., Chen Y., Chen X.H., Li D.X., Liu J.L., Lin L., Wang D.Z. (2016a). Comparative transcriptomic analysis reveals novel insights into the adaptive response of *Skeletonema costatum* to changing ambient phosphorus. *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2016.01476.

Zhang H., Zeng R., Chen D., Liu J. (2016b). A pivotal role of vacuolar H⁺-ATPase in regulation of lipid production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Sci. Rep.*, 6: 313-319.

Zheng J.W., Da-Wei L., Yang L., Chen J., Liang j., Zhang L., Yang W., Liu J., Lu S.H., Li H. Y. (2016). Molecular exploration of algal interaction between the diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Algal Res.*, 17: 132-141.

Zhu W., Smith J., Huang C.M. (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.*, doi: 10.1155/2010/840518.

Zhu B.H., Shi H.P., Yang G.P., Lv N.N., Yang M., Pan K.H. (2016). Silencing UDP-glucose pyrophosphorylase gene in *Phaeodactylum tricornutum* affects carbon allocation. *New Biotechnol.*, 33: 237-244.

Zulu N.N., Zienkiewicz K., Vollheyde K., Feussner I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Prog. Lipid Res.*, 70:1-16.

Sitios webs:

www.algaebase.org
www.infostat.com.ar
www.uniprot.org
www.pfam.xfam.org