

LUNA VIGGIANO DE ALVARENGA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM CIANOBACTÉRIAS DA FAMÍLIA
NOSTOCACEAE CULTIVADAS SOB ESTRESSE SALINO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS, BRASIL
2015

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

T

A473r
2015

Alvarenga, Luna Viggiano de, 1989-
Respostas fisiológicas em cianobactérias da família
Nostocaceae cultivadas sob estresse salino / Luna Viggiano
de Alvarenga. - Viçosa, MG, 2015.
xi, 36f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Wagner Luiz Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.33-36.

1. Cianobactérias. 2. Cianobactérias - Efeito do sal.
3. Cianobactérias - Metabolismo. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

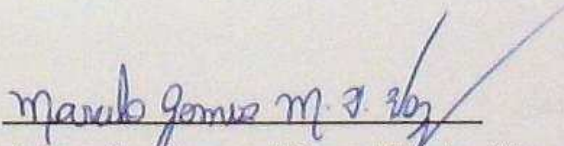
CDD 22. ed. 579.39

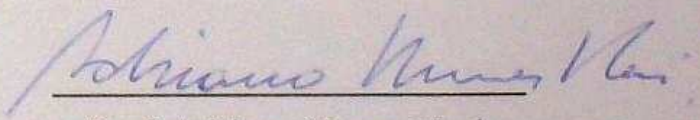
LUNA VIGGIANO DE ALVARENGA

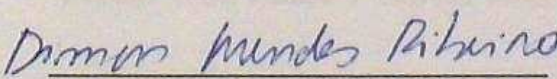
**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM CIANOBACTÉRIAS DA FAMÍLIA
NOSTOCACEAE CULTIVADAS SOB ESTRESSE SALINO**

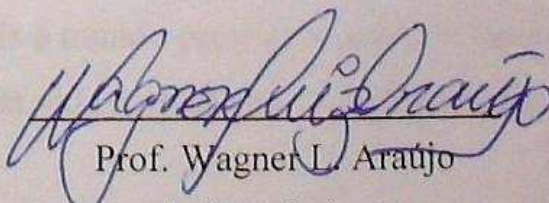
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: Viçosa, 19 de fevereiro de 2015.


Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz


Prof. Adriano Nunes Nesi


Prof. Dimas Mendes Ribeiro
(coorientador)


Prof. Wagner L. Araújo
(orientador)

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o mundo pertence a quem se atreve,
e toda vida é muito pra ser insignificante."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e maior agradecimento aos meus avós Léa e Viggiano, por me darem raízes.

Aos meus avós, Sônia e Diogênes, por me ensinarem o valor do carinho e da dedicação diária em nossas vidas.

Ao meu pai Roberto, pela paciência e pelo amor incondicional.

A minha tia Zana, por ser uma pessoa tão evoluída e me ensinar cada dia um pouquinho mais.

Aos meus tios Eve, Anna e João me amarem como filha/irmã e me emprestarem a tia Zana de vez em quando.

As meus tios Leleu, Dadá, Tico e Cacado por se doarem pra mim, vocês são parte fundamental da minha personalidade.

A família Vilinha, Pelin, Ninoca, Natizuda, Pri e Tucano, obrigada pelo carinho e constante atenção, tornando cada dia uma experiência maravilhosa!

Aos meus amigos Pri, Flávio, Alice e Robert e muitos outros que não tenho visto com frequência obrigada pela paciência, mesmo distante vocês moram no meu coração.

Ao Professor Wagner L. Araújo, pela orientação, amizade e dedicação, estando sempre presente.

Aos Professores Adriano Nunes Nesi e Dimas Mendes Ribeiro pela co-orientação e por todo o suporte dado durante esse período.

Ao Dr. Marcelo Gomes Marçal Viera Vaz pela amizade, comentários construtivos e presença na minha banca de defesa.

Ao Professor Raimundo Barros, aka Tabatã, pela amizade, conselhos e cafezinhos estratégicos.

Ao Professor e coordenador do programa, Fábio M. DaMatta, pela amizade e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório para realização das análises bioquímicas.

Aos amigos do grupo de pesquisa Dora, David, Kallyne, Roberto, Vitor, Willian, Dani, Franklin, Paula, Jorge Perez, Jorge Condori, Mari, Ibia, Flávio, Carla Quinhones e Acácio pelo companheirismo e atenção, tornando meus dias mais divertidos e ajudando sempre que possível.

Ao Allan e a Naira, agradeço a amizade e o companheirismo nos experimentos, pois sem a dedicação deles nenhum objetivo teria sido alcançado.

Aos técnicos e servidores Rogério Gomide, João Bosco, Carlos Raimundo, Antônio Cordeiro, Mercês e Luciene por me auxiliarem sempre com um sorriso no rosto quando solicitados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelo suporte durante o mestrado.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução	1
2. Material e métodos	6
2.1 Obtenção e seleção de cepas de cianobactérias	6
2.1.1 Condições de cultivo	6
2.2 Caracterização da cepa UFV059	7
2.2.1 Curvas de crescimento	7
2.2.2 Quantificação de NaCl no meio de cultivo	8
2.2.3 Ensaio bioquímico	8
2.2.3.1 Pigmentos fotossintetizantes	8
2.2.3.2 Carboidratos solúveis totais	9
2.2.3.3 Aminoácidos totais	9
2.2.3.4 Proteínas totais	10
2.3 Análises comparativas entre UFV059 e a cepa modelo PCC 7120	10
2.3.1 Ensaio bioquímico	11
2.3.2 Determinação das taxas de consumo e evolução de oxigênio	11
2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas	11
3. Resultados	12
3.1 Caracterização da cepa UFV059	12
3.1.1 Curvas de crescimento sob estresse salino	12
3.1.2 Metabolismo da cepa UFV059 sob estresse salino	13
3.1.3 Concentração Na^+ no meio de cultura	17
3.2 Comparação entre as cepas UFV059 e PCC7120	18
3.2.1 Análises para obtenção da DL_{50}	18
3.2.3 Curva de crescimento com adição das respectivas DL_{50}	19
3.2.4 Caracterização morfológica das cepas PCC7120 e UFV059	20
3.2.5 Metabolismo das cepas UFV059 e PCC7120 sob concentrações	

	referentes as respectivas DL_{50}	24
4.	Discussão	27
4.1	Caracterização da cepa UFV059	27
4.2	Comparações entre UFV059 e PCC7120	29
5.	Conclusões e perspectivas	32
6.	Referências bibliográficas	33

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
A	Fotossíntese líquida
ATP	Adenosina trifosfato
BG11	Meio de cultura (BG-11 do inglês “Blue Green medium”)
CCM	Coleção de Cianobactéria e Microalgas
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DBV	Departamento de Biologia Vegetal
DO	Densidade óptica
EPS	Exopolissacarídeos
g	Força centrífuga
h	Hora
Kg	Quilograma
M	Molar
m ²	Metro quadrado
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
nm	Nanometro
PCC	Coleção de Culturas Pasteur “Pasteur Culture Collection”
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
R _d	Respiração no escuro
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
s	Segundos
UFV	Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

ALVARENGA, Luna Viggiano de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2015. **Respostas fisiológicas em cianobactérias da família Nostocaceae cultivadas sob estresse salino.** Orientador: Wagner L. Araújo. Coorientador: Dimas M. Ribeiro.

Cianobactérias são procariotos fotossintetizantes amplamente distribuídos em todo o globo terrestre, apresentando mecanismos de adaptação e diversas vias metabólicas eficazes a condições ambientais limitantes à maioria dos seres vivos. Não obstante, as cianobactérias são organismos vantajosos para aplicações industriais, em função do seu rápido crescimento em comparação as plantas, necessidades nutricionais simples (luz solar, água e CO₂ principalmente), e possibilidade de manipulação genética. Devido à sua diversidade natural e capacidade de crescer em diversos habitats, como áreas impróprias à agricultura, há uma crescente tendência na exploração de cianobactérias para a produção de biomassa e biocombustíveis. Ademais, esses organismos mostram-se adequados à análise e entendimento dos mecanismos adaptativos desenvolvidos em resposta às mudanças nas condições ambientais. Este projeto buscou analisar a fisiologia e o metabolismo de uma cianobactéria (UFV059) coletada em ambiente hipersalino (salinidade entre 77-237 gL⁻¹) e comparar com a cepa modelo da família Nostocaceae, PCC7120. Os resultados obtidos indicam uma alta tolerância ao estresse salino pela cepa UFV059, apresentando crescimento em meio suplementado com até 500 mM de NaCl e bem como em DL₅₀ nove vezes superior a observada para cepa modelo PCC7120. De maneira interessante, a cepa UFV059 apresentou aumento na concentração de clorofila a quando exposta a concentrações de 250 e 500 mM de NaCl, o que poderia culminar na manutenção de taxas fotossintéticas e consequentemente maior disponibilidade energética para os processos de aclimação. Ademais, a cepa UFV059 sobreviveu a concentrações superiores a 1M apresentando extensa diferenciação celular, o que indica uma extensa reprogramação metabólica. A tolerância observada na UFV059 ocorreu muito provavelmente em função da presença de um aparato proteico adaptado a ambientes salinos, bem como pela maior produção de EPS que restringiria, ao menos parcialmente, a entrada de cátions. Cumpre mencionar que o estresse salino representa um grande desafio na viabilização econômica do uso de cianobactérias em escala industrial, por meio do cultivo em águas salobras ou residuais. Essa

caracterização inicial possibilitou a identificação parcial de alguns dos mecanismos de tolerância na cepa UFV059; porém, uma caracterização molecular se faz necessária para compreender melhor esta cepa, até então desconhecida e podem, em longo prazo, contribuir para o desenvolvimento de cianobactérias e plantas tolerantes a alta salinidade através da engenharia genética.

ABSTRACT

ALVARENGA, Luna Viggiano de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Physiological responses of cyanobacteria of the Nostocaceae family under salt stress.** Adviser: Wagner L. Araújo. Co-Adviser: Dimas Mendes Ribeiro.

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that occupy diverse ecological niches presenting thus enormous diversity in terms of habitat, physiology, morphology, metabolic capacities and molecular properties. Cyanobacteria are also organisms advantageous for industrial applications since they have rapid cell growth, basic nutritional needs (sunlight, water, and CO₂), and great potential to be genetically modified. Due to its natural diversity and ability to grow in a variety of habitats, such as unsuitable agricultural areas, there is an increasing interest in the exploration of cyanobacteria for the production of biomass and biofuels. Moreover, cyanobacteria have been proven to be adequate for the analysis and understanding of adaptive mechanisms in response to changing environmental conditions. Thus, the main goals of this research initiative were to analyze both the physiology and metabolism of a cyanobacteria strain (UFV059) collected in a hypersaline environment (with salinity between 77-237 g L⁻¹) and compare it with the model strain of the Nostocaceae family, PCC7120. The results obtained indicates that the strain UFV059 display high tolerance to salt stress, as demonstrated by its ability to sustain grow in medium supplemented with up to 500 mM of NaCl as well as containing LD₅₀ nine times higher than observed for PCC7120. Surprisingly, UFV059 showed increased chlorophyll contents when exposed to 250 and 500 mM NaCl, which might be associated with the maintenance of photosynthetic rates and consequently allowing higher energy availability for acclimatization process. Furthermore, UFV059 survived to concentrations higher than 1M displaying extensive cell differentiation, which indicates an extensive metabolic reprogramming. The higher salt tolerance observed in UFV059 is most likely due to the presence of one previous available protein apparatus adapted to saline environments, as well as to the higher production of EPS that would restrict, at least partially, the cations entry. It is important to mention that salt stress is one major challenge for the economic viability of cyanobacteria usage on an industrial scale through cultivation in brackish or waste water. The results of this initial characterization allowed the partial

identification of some tolerance mechanisms in UFV059; however, a molecular characterization is still required to enhance our understanding regarding this strain, that in the long term might contribute to the development of both cyanobacteria and plants displaying high salinity tolerance through genetic engineering.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias, microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria, são caracterizadas por apresentar parede celular típica de bactérias gram-negativas e capacidade de realizar fotossíntese oxigênica. Esses organismos possuem uma distribuição cosmopolita, apresentando assim, adaptações para colonizar os mais diversos ambientes. Cumpre mencionar que as cianobactérias são fotoautotróficas, isto é, são capazes de realizar fotossíntese oxigênica de forma similar aos fotoautotróficos eucarióticos. No entanto, alguns grupos apresentam metabolismo heterotrófico sendo, assim, designados mixotróficos. Registre-se também que muitas espécies de cianobactérias são capazes de realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico [1].

As cianobactérias apresentaram papel fundamental no processo de evolução na Terra, sendo os primeiros organismos a fotossíntese oxigênica. Nesse contexto, a fotossíntese requer a ação coordenada dos dois fotossistemas (PSI e PSII) para gerar um potencial eletroquímico necessário à extração de elétrons da água e evolução do oxigênio molecular [2]. Desta forma, a produção de oxigênio pelas cianobactérias foi também responsável pela oxidação da atmosfera terrestre que ocorreu entre 2,4 e 2,2 bilhões de anos atrás; ademais, esses microrganismos contribuíram substancialmente para a produção primária durante a Era Proterozóica e são, atualmente, importantes agentes nos ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio [3].

Variações ambientais e temporais atuam como força motriz para a evolução e aquisição de genes [4]. De maneira particular, as cianobactérias ocupam diversos nichos ecológicos e apresentam enorme diversidade em termos de habitats, fisiologia, morfologia, capacidade metabólica e propriedades moleculares [5]. Nesse sentido, a evolução das cianobactérias trata-se de um processo contínuo, baseado na transferência horizontal de ácidos nucléicos e de plasmídeos entre cepas de espécies distintas de cianobactérias e outros procariotos, gerando uma rápida aclimação e adaptação a flutuações ambientais [6, 7]. Como consequência desse processo nota-se a ocorrência de uma grande diversidade de cianobactérias, resultando em numerosas morfologias e genótipos ecologicamente especializados [8]. As perdas ou principalmente, ganho de genes, associados às pressões seletivas realizadas por diferentes fatores ambientais parecem responsáveis por uma extensa diversificação

morfológica, acompanhada por divergências fisiológicas e metabólicas significativas entre as ordens do Phylum Cyanobacteria [4].

A salinidade do meio é um dos fatores abióticos mais importantes para organismos aquáticos, como a maioria das cianobactérias. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da aclimação a altas concentrações de sais em cianobactérias são amplamente reconhecidos [9-15]. O aumento na concentração de sais do ambiente externo leva a perda de água pela célula e a entrada de íons danosos ao metabolismo celular pode ser letal a célula. Assim, para tolerar o estresse salino, as cianobactérias utilizam usualmente de dois mecanismos básicos: (i) aumento de sistemas de exportação ativa de íons [14], e (ii) acúmulo de compostos orgânicos osmoprotetores, de baixa massa molecular e carga líquida ausente [16], compostos principalmente por moléculas hidrofílicas que não interferem com o metabolismo basal da célula [9].

Estes compostos, comumente denominados de solutos compatíveis, ajudam a manter a integridade da membrana e a estabilidade do aparato proteico celular [17, 18]. Cepas moderadamente halotolerante, como o organismo modelo *Synechocystis* sp. PCC6803 acumulam normalmente glicosilglicerol (GG) como principal soluto compatível [16]. Por outro lado, cianobactérias halofílicas sintetizam o soluto compatível glicina betaína [19]. Em adição a estes grupos principais de solutos compatíveis observados em cianobactérias, alguns compostos são restringidos a certas espécies ou são acumulados em menores quantidades. Recentemente, foi descoberta a ocorrência de glicosilglicerato (GGA) como um soluto compatível secundário em cianobactérias marinhas, tais como nas espécies picoplanctônicas *Prochlorococcus* / *Synechococcus* [20]. GGA, um soluto compatível bastante incomum pois é carregado negativamente, parece funcionar substituindo glutamato, devido à limitação de nitrogênio no oceano central, no contrabalanço com a carga positiva do K^+ , íon acumulado em resposta ao estresse salino [21].

Cianobactérias unicelulares da ordem Chroococcales são comumente encontradas em ambientes moderadamente salinos. Para essa adaptação de sucesso este grupo de cianobactérias parece utilizar um mecanismo altamente coordenado que se inicia imediatamente após a exposição ao sal [14]. Para tanto, a captação de K^+ levando a imediata extrusão do Na^+ , o qual é altamente danoso ao metabolismo celular [14], ocorre, nas primeiras 2 h, de maneira simultânea à síntese de solutos compatíveis (e.g., glicosilglicerol). Posteriormente, a extrusão do K^+ e Cl^- ocorre, o

que pode acontecer até 12 h após a exposição ao sal. É importante mencionar que esses transportadores rápidos de Na^+ são aparentemente pré-existent e ativados a partir de concentrações de 300 mM de NaCl, ao menos em células de *Synechocystis* sp. PCC6803 [22]. Neste contexto, foi também previamente estabelecido que esses transportadores utilizam da força próton motora gerada por bombas primárias de H^+ , tais como H^+ ATPases ou citocromo oxidase da cadeia respiratória [23]. Tal fato justificaria, ao menos parcialmente, o aumento nas taxas respiratórias e a maior razão PSI/PSII [24], aumentando dessa forma, o fluxo cíclico de elétrons e, consequentemente, a síntese de ATP. Cabe mencionar também que, tendo-se em vista que a cadeia transportadora de elétrons em cianobactéria é mista, apresentando elementos fotossintéticos e respiratórios, a oxidase terminal pode receber elétrons oriundos do PSII prevenindo, assim, uma super redução da cadeia transportadora de elétrons presente nas membranas dos tilacóides [14].

Dois trabalhos independentes demonstraram que cinco genes, identificados como codificantes dos antiportes de Na^+/H^+ no genoma de *Synechocystis* PCC6803, seriam responsáveis pelo transporte rápido de Na^+ para fora da célula [25, 26]. Acreditava-se que tais genes (NhaS1, NhaS2, NhaS3, NhaS4 e NhaS5) eram redundantes. Porém, com exceção do mutante NhaS3, nenhum dos mutantes apresentou redução significativa do crescimento sob condições de alta concentração de sal e/ou pH elevado [25]. Adicionalmente, foi também constatado que o transportador NhaS3 está presente nas membranas dos tilacóides e parece estar associado com a manutenção da homeostase entre citoplasma e lúmen, particularmente durante as variações diárias, sendo super expresso em condições de estresse salino [26].

A detecção e transdução de sinais para o estresse salino ainda não foi completamente elucidada. Cumpre mencionar, no entanto, a existência de candidatos promissores, como os sistemas de dois componentes, composto por uma histidina quinase (Hik) e uma proteína reguladora da resposta correspondente (RRE), que atuam como um ativador/repressor de transcrição e que desempenham papel importante na detecção de sinais físicos e químicos ambientais em bactérias. Uma vez que tais sistemas estão envolvidos na resposta ao sal em *Escherichia coli*, foi construída uma biblioteca mutante Hik com o intuito de se verificar possíveis alterações no transcriptoma global de *Synechocystis* sp. PCC 6803 sob estresse salino

[27]. Este estudo identificou quatro histidinas quinases (Hik16, Hik34, Hik33 e Hik41), que estariam, de alguma forma, envolvidas na transdução de sinais durante o estresse salino, devido a não expressão de aproximadamente 20% dos genes cuja expressão era induzida no selvagem em presença de sal.

Diversas mudanças são comumente observadas em resposta ao estresse salino em cianobactérias. Nesse contexto, alterações nos perfis de proteínas em resposta ao estresse salino já foram relatadas [28, 29]. Ademais, 200-300 genes foram relatados sendo supra-regulados e aproximadamente o mesmo número teve expressão reduzida, em cepas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 após adição de 4% de NaCl [7]. No entanto, a análise em séries temporais mostrou que a maioria dos genes alterados possui expressão transitória e que entre os genes inicialmente responsivos ao estresse salino, muitos codificam proteínas de função biológica ainda desconhecida. Apenas a expressão de alguns genes permaneceu aumentada após aclimação de longo prazo ao sal [22] e grande parte desses genes também são diferencialmente regulados em outras condições de estresses, tais quais, alta incidência luminosa, baixas temperaturas, alta concentração de espécies reativas de oxigênio e pH ácidos [30, 31].

Cumprir mencionar que cianobactérias filamentosas heterocitadas (e.g., *Anabaena* sp.) geralmente apresentam baixa tolerância a NaCl e são usualmente encontradas em ambientes de água doce [32]. Nesse contexto, acreditava-se que o único soluto compatível acumulado em resposta ao sal nesse gênero fosse a sacarose [33]. Todavia, foi demonstrado que sob concentrações crescentes de NaCl, células de *Anabaena* sp. (PCC7120 e PCC7119) e de *A. variabilis* acumulam oligossacarídeos que contêm frutose [17]. Registre-se que estes polímeros não foram encontrados em microalgas, sendo, portanto, constituintes celulares específicos de cianobactérias. Estes oligossacarídeos não-redutores, nomeados em geral, como “sucroglucans”, acumulam-se de forma reversível em presença de NaCl [17]. Além de sua óbvia função como reserva de carboidratos em vegetais, esses compostos podem também desempenhar um papel importante na tolerância a vários estresses abióticos em cianobactérias [17].

Em *Anabaena* sp. PCC7120 após a exposição ao estresse salino (150 mM de NaCl por 24 h) foi observado metabolismo característico de fotorrespiração, apresentando expressão 2,6 vezes maior do gene da proteína Rubisco, em comparação com as células controle [34]. Adicionalmente, todos os genes relacionados ao

metabolismo do glicolato, exceção feita ao gene que codifica hidroximetil-serina transferase, demonstraram incrementos na expressão após 1 h de exposição ao sal. De forma contrária ao observado para a expressão do gene da proteína Rubisco, os genes que codificam as proteínas fosforibulocinase e transcetolase foram negativamente regulados após 24 h em presença de NaCl, sugerindo a inibição da assimilação do carbono sob condições de alta salinidade [34]. Registre-se também que resultados semelhantes foram relatados em trabalhos distintos [35, 36]. Ademais, a redução na assimilação de carbono pode também ser atribuída, ao menos parcialmente, à inibição do fotossistema II, como observado pela menor produção de NADPH [37, 38].

Os exopolissacarídeos (EPSs), substâncias acumuladas no exterior das células, fornecem proteção física e química além de auxiliar na formação de mantas microbianas [39]. Saliente-se também que os EPSs presentes em cianobactérias são, em sua grande maioria, fortemente aniônicos, contendo um ou dois ácidos urônicos diferentes, bem como grupos sulfatos, uma característica rara entre bactérias [40]. Neste contexto, a presença de EPS com carga negativa circundante às células parece desempenhar um papel importante no sequestro de cátions metálicos, contribuindo, assim, para a proteção das células contra estresses ambientais, como dessecação, luz ultravioleta, biomineralização e estresse salino [41]. Por outro lado, essa camada circundante pode criar também um microambiente enriquecido com nutrientes essenciais para o crescimento celular, que possam estar em quantidades limitantes no ambiente [42].

A presente proposta buscou analisar, fisiológica e metabolicamente, duas cepas de cianobactérias pertencentes a família Nostocaceae, cultivadas sob condições de estresse salino. Inicialmente, realizou-se a caracterização de uma cepa coletada na Laguna Amarga, Torres Del Paine, no Chile, no que diz respeito as respostas fisiológicas e metabólicas à diferentes concentrações de NaCl. Em um segundo momento, essa cepa foi comparada à cepa modelo da família Nostocaceae em estudos fisiológicos, PCC7120. Assim, uma caracterização fisiológica e metabólica foi realizada em cepas consideradas contrastantes quanto à tolerância ao estresse salino. Essa caracterização possibilitou a inferência dos distintos mecanismos de halotolerância e de aclimação a diferentes concentrações de NaCl em cianobactérias filamentosas que fixam nitrogênio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e seleção das cepas de cianobactérias

Neste trabalho utilizaram-se organismos da família Nostocaceae do Phylum Cyanobacteria com caracteres morfológicos semelhantes: cianobactérias filamentosas sem ramificações, com presença de heterócitos intercalares e terminais, e acinetos seriados. Desta forma, duas cepas da Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Laboratório de Ficologia (DBV/UFV) foram utilizadas, sendo uma coletada na Laguna Amarga, Torres Del Paine, Chile (doravante denominada UFV059, Fig. 1A), cuja salinidade varia entre 77 e 237 g L⁻¹ e o pH entre 7,2 e 9,4 [43]. A outra cepa utilizada foi obtida junto ao Instituto Pasteur, França (doravante denominada PCC7120, Fig. 1B). Apesar de ambas as cepas serem de ambiente dulceaquícola, as mesmas são provenientes de diferentes regiões, levando-se em consideração as condições ambientais nas quais os organismos estavam inseridos.

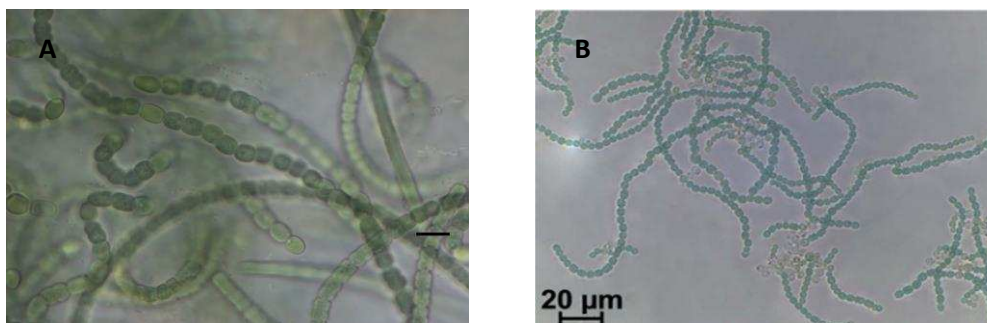


Figura 1: **Cepas utilizadas nesse trabalho.** (A) Cepa UFV059, coletada na Laguna Amarga, Torres Del Paine, Chile e (B) Cepa PCC7120, gentilmente doada pelo Instituto Pasteur.

2.1.1 Condições de cultivo

As culturas estoque foram mantidas em sala de crescimento em frascos Erlenmeyers (50 mL) contendo 20 mL meio de cultivo BG11 [44], sem adição de nitrogênio (N), de acordo com as exigências fisiológicas das linhagens. Para a produção de inóculos, alíquotas de 400 µL foram retiradas das culturas estoque e inoculadas em Erlenmeyers (125 mL) contendo 40 mL de meio de cultivo BG11. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 14/10 h (luz/escuro), temperatura de 24 ± 2 °C, intensidade luminosa de 50 µmol m⁻²s⁻¹ e agitação constante (30 g) durante todo período de cultivo.

2.2 Caracterização da cepa UFV059

A cepa UFV059 foi isolada a partir de amostras coletadas na Laguna Amarga, em Torres Del Paine, Chile, caracterizado como *Athalassohalino*, com altas concentrações de sais e grande concentração de carbonato, portanto um alto pH (SODA Lake). Neste trabalho, a cepa UFV059 foi analisada metabolicamente e fisiologicamente buscando-se elucidar os possíveis mecanismos que possibilitam a sobrevivência dessa cepa em ambientes salinos.

2.2.1 Curvas de crescimento

Para identificar e caracterizar o comportamento da cepa UFV059 em diferentes concentrações de NaCl, curvas de crescimento foram descritas. As culturas foram mantidas nas condições descritas anteriormente (vide item 2.1.1) e no início do cultivo foi adicionado NaCl nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 mM mantendo-se um controle sem adição de sal. As avaliações de crescimento foram realizadas em triplicata por meio de contagem de células em intervalos de 48 h e de forma simultânea foi feita análise da curva por densidade óptica (DO) a 750 nm. Os cultivos foram interrompidos quando o crescimento atingiu a fase estacionária, aproximadamente 15 dias após a adição do sal. A contagem de células foi realizada a partir de 100 µL de amostra homogeneizada e mantida em microtubo para posterior contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A determinação do número de células mL⁻¹ foi obtida pela equação e posteriormente analisada a fidelidade com a curva de DO a 750 nm.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células mL}^{-1} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células} \times \text{fator de diluição} \times 10.000}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}}$$

Amostras de 2 ml do cultivo das curvas de crescimento em diferentes concentrações de NaCl foram centrifugadas a 11.000 g por 12 min a 4 °C e o precipitado ressuspensionado em solução salina 0,85% (p/v) e filtrado através de membranas (0,22 µm) com 2,5 cm de diâmetro, permanecendo por 24 h em estufa com circulação forçada de ar possibilitando, assim, a obtenção da curva de crescimento em valores de massa seca.

2.2.2 Quantificação de NaCl no meio de cultivo

O teor de NaCl total nas amostras foi determinado em um espectrômetro de emissão com plasma indutivamente acoplado (modelo ICAP 61E traço analisador, ThermoElectron, San Jose, CA). Amostras individuais de 8 ml de cultura obtidas nas diferentes curvas de crescimento em presença de 250 e 750 mM de NaCl foram centrifugadas a 11.000 g por 12 min a 4 °C. O sobrenadante contendo o meio de cultivo foi então analisado e comparado a uma curva de calibração feita com solução de íons Na⁺ em diferentes concentrações (0 a 40 pM). As curvas de concentração de Na⁺ foram feitas em comparação com o meio de cultura BG-11 sem adição de sal. Foram necessárias diluições de 10.000 vezes do sobrenadante para inclusão das concentrações de Na⁺ adicionadas ao meio (250 e 750 mM) à curva de calibração.

2.2.3 Ensaaios bioquímicos

As amostras foram coletadas a cada 48 h de exposição das células as concentrações de 0, 250, 500, 750 e 1000 mM de NaCl. Alíquotas de 2 ml obtidas durante a amostragem foram filtradas a vácuo, utilizando-se de filtros porosos (0,22 µm) com 2,5 cm de diâmetro. Os filtros foram transferidos para tubos de 2 mL e congelados em nitrogênio líquido [45] e, em seguida, armazenados a -80 °C, até o momento do uso.

2.2.3.1 Pigmentos fotossintetizantes

Para a extração de clorofila a foram utilizados 2 mL de cultura. Esse volume foi centrifugado a 13.000 g por 5 minutos, submetendo-se o precipitado a extração etanólica a quente. Para isso adicionou-se 250 µL de etanol 98% (v/v) aos microtubos que continham as alíquotas. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos a 80 °C sob agitação constante de 837 g. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo microtubo de 1,5 mL. O precipitado resultante foi submetido a duas sequências de extrações conforme descrito acima, utilizando-se 250 µL de etanol 80% (v/v) e 50% (v/v). Os sobrenadantes obtidos foram misturados e assim como os precipitados resultantes armazenados a -80 °C [46]. A concentração de clorofila a foi espectrofotometricamente determinada imediatamente após a extração, sendo a absorvância determinada a 665 nm [47].

2.2.3.2 Carboidratos solúveis totais

Para extração foram coletados 2 mL de cultura, volume esse que foi centrifugado a 11.000 g por 10 minutos e ressuspendido duas vezes em água destilada. Após a centrifugação adicionou-se ao pellet 1 mL de H₂SO₄ (1M). Os tubos foram mantidos por 30 minutos a 80° C e posteriormente centrifugados a 13.000 g por 10 minutos. Após esse período transferiu-se 100 µL do sobrenadante para tubos de 2 mL e a esse volume adicionou-se 60 µL de fenol 5% (v/v) e 300 µL de H₂SO₄ concentrado. A solução foi mantida a 90°C por 5 minutos. Para a determinação da concentração de carboidratos solúveis totais a absorvância foi determinada a 490 nm [48].

2.2.3.3 Aminoácidos totais

A concentração de aminoácidos totais foi determinada como previamente descrito [49]. Para tanto, coletaram-se 20 mL de cultura os quais foram centrifugados a 11.000 g por 10 minutos. O precipitado obtido foi submetido a extração etanólica a quente. Por fim, montou-se uma reação em placa de Elisa, aplicando em cada poço os seguintes volumes: 50 µL de extrato etanólico, 150 µL da solução contendo tampão citrato de sódio (1M) com 0,2% (p/v) ácido ascórbico pH 5,2 e ninhidrina 1% (p/v). A reação foi mantida a 95 °C por 25 minutos no escuro, procedendo-se a leitura da absorvância a 550 nm para a determinação da concentração de aminoácidos totais.

2.2.3.4 Proteínas totais

Para extração de proteínas 2 mL de cultura foram centrifugados a 11.000 g por 10 minutos e ressuspendidos duas vezes em água destilada. Após centrifugação 500 µL de NaOH (0,1 M) contendo 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), foi adicionado ao precipitado. Posteriormente, os tubos foram mantidos por 30 minutos a 95° C, seguidos de posterior resfriamento em gelo por 5 minutos. Após esse resfriamento adicionou-se ao extrato obtido 125 µL de HCl (0,4 M), procedendo-se a homogeneização e centrifugação a 11.000 g por 10 minutos. Para a determinação das proteínas totais 100 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de 2 mL com a adição de 500 µL de uma solução preparada previamente (6 mL de NaOH 0,1N/Na₂CO₃ 2%, (p/v), 60 µL de CuSO₄ 0,5% (p/v) e 60 µL de tartarato de sódio e potássio 1% (p/v), mantendo a reação à temperatura ambiente por 20 minutos. Em

seguida, adicionou-se 100 µL da solução de folin fenol (folin fenol/água destilada, 1:1 (v/v), mantendo-se a reação no escuro à temperatura ambiente por 40 minutos. Para a determinação da concentração de proteínas totais a absorvância da solução foi determinada a 750nm [50].

2.3 Análises comparativas entre UFV059 e a cepa modelo PCC7120

As cianobactérias utilizadas para as análises comparativas, UFV059 e PCC7120, foram cultivadas nas mesmas condições descritas no item 2.1.1. As doses letais (DL_{50}), definida como a concentração mínima de sal capaz de matar 50 % das células após 72 h de exposição ao sal, segundo as orientações da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) para ensaio de substâncias químicas (OECD Guidelines for Algae Test, 2006) foram determinadas a partir contagem de células das cepas UFV059 e PCC7120, expostas a diferentes concentrações de NaCl e utilizadas no cultivo dos experimentos de comparação entre as cepas. No quinto dia de cultivo, ou seja, na entrada da fase log, a concentração de NaCl correspondente as DL_{50} de cada uma das cepas foi adicionada ao meio de cultivo possibilitando que as coletas fossem realizadas 0, 12, 24, 48 e 96 h após a exposição ao sal para análises bioquímicas.

Posteriormente, fotos microscópicas foram obtidas com auxílio de microscópio de luz Olympus (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) para análise dos aspectos morfológicos e de agregação, assim como, para visualização da integridade e comportamento celular em resposta ao período de exposição ao estresse salino.

2.3.1 Ensaios bioquímicos

Alíquotas obtidas durante a amostragem foram filtradas a vácuo [45] e armazenadas a -80 °C, até o posterior uso. Para a comparação entre as cepas PCC7120 e UFV059 foram utilizados os mesmo parâmetros bioquímicos descritos anteriormente para a caracterização da cepa UFV059 (vide itens 2.2.3.1- 2.2.3.4).

2.3.2 Determinação das taxas de consumo e evolução de oxigênio

As taxas de consumo e evolução de oxigênio foram determinadas em cultivo livre de sal, em um eletrodo do tipo Clark ligado a um monitor de oxigênio biológico

e acoplado a um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), como previamente descrito [51, 52]. Foi realizada análise de respiração no escuro e fotossíntese com a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 25 °C.

2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram montados em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de um mesmo tratamento comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade e as médias de diferentes tratamentos num mesmo ponto de cultivo comparadas pelo teste t student a 1% de probabilidade, executados no software SigmaPlot (versão11.0, Systat Software).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da cepa UFV059

3.1.1 Curvas de crescimento sob estresse salino

As curvas de crescimento, realizadas tanto pela DO quanto pela contagem de células, apresentaram comportamento similar (Fig. 2A). De maneira geral, a cepa UFV059 apresentou variação nas tendências de crescimento quando cultivada em diferentes concentrações de NaCl. Foi possível verificar que o número de células e consequentemente a produção de massa seca foram gradualmente reduzidos com o incremento de sal no meio de cultura (Fig. 2). Cabe mencionar também que, na ausência de sal, UFV059 apresentou uma fase de crescimento exponencial de oito dias com entrada na fase log no 6º dia e na fase estacionária após o 14º dia de cultivo (Fig. 2A,B). O valor máximo de massa seca encontrado ($8,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cultura) foi alcançado no 14º dia de cultivo sem adição de sal. A partir do 8º dia de cultivo, isto é, dois dias após a entrada na fase log, foi possível observar que as células cultivadas sem adição de sal se encontravam agregadas em colônias, sob uma rigorosa bainha de mucilagem, tornando difícil homogeneização para as análises a posteriori.

É importante mencionar que a curva de crescimento obtida na concentração de 250 mM de NaCl apresentou uma fase lag mais extensa, necessitando de dois dias a mais para aclimação ao meio de cultivo em relação à curva sem adição de sal (Fig. 2). Por outro lado, foi observada uma menor fase log (apenas quatro dias; Fig. 2A) e redução de 61 % da biomassa máxima produzida (Fig. 2B). Foi verificado também nessa condição incrementos na produção de biomassa a partir do 6º dia, quando iniciou-se a fase log, em concordância com os dados de DO.

Na concentração de 500 mM de NaCl a cepa UFV059 também apresentou aumento da fase lag, demorando dez dias para apresentar crescimento significativo (Fig. 2A,B). Por outro lado, sob a concentração de 500 mM de NaCl UFV059 apresentou uma fase log curta de apenas quatro dias e redução de 72% na produção de biomassa total, de forma similar ao observado em presença de 250 mM de NaCl. O cultivo sob as concentrações de 750 e 1000 mM de NaCl não possibilitou aumento do crescimento em densidade ou massa seca para UFV059 (Fig. 2A,B). Não obstante, através de análises microscópicas foi possível verificar a diferenciação generalizada

das células vegetativas em acinetos (células de resistência) a partir do 4º dia de exposição às concentrações de 750 e 1000 mM de NaCl.

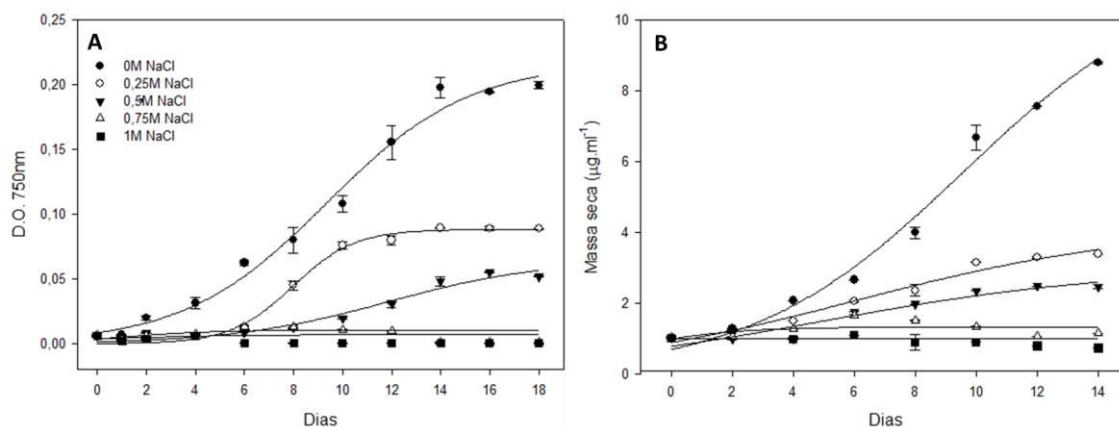


Figura 2: **Curvas de crescimento da cepa UFV059 cultivada sob diferentes concentrações de NaCl.** No dia da inoculação da cepa UFV059 a 1% (v/v), promoveu-se a adição de 0, 250, 500, 750 e 1000 mM de NaCl. O crescimento foi monitorado, a cada dois dias, mediante análise da densidade óptica (A) e da massa seca (B). Valores representam curvas de tendência feitas a partir das médias $\pm$ erro padrão (n= 3).

3.1.2 Alterações metabólicas na cepa UFV059 sob estresse salino

Em condições consideradas, em teoria, ótimas para o crescimento da cepa UFV059 (cultivo sem adição de sal), as concentrações de carboidratos e proteínas totais permaneceram constantes ao longo dos dias de cultivo (Fig. 3). Quando cultivada em presença de 250 mM de NaCl, a cepa UFV059 apresentou aumento progressivo na concentração de carboidratos, atingindo concentração máxima no 4º dia de exposição, com subsequente redução e retomando os valores iniciais (semelhantes ao controle) ao 14º dia de cultivo (Fig. 3A). Verificou-se também um incremento na concentração de carboidratos com a aplicação de 500 mM de NaCl, similar ao verificado com 250 mM de NaCl. Ressalte-se, todavia, que quando cultivada em meio contendo 500 mM de NaCl a cepa apresentou redução nas concentrações de carboidratos totais no 8º dia de cultivo, 2 dias antes do observado no tratamento com 250 mM (Fig. 3A). Nos tratamentos com 750 e 1000 mM de NaCl foram observados, nas primeiras 48 h de exposição, aumentos nas concentrações de carboidratos. No entanto, no tratamento com 750 mM de NaCl verificou-se redução na concentração de carboidratos no 6º dia de cultivo e com a concentração salina

máxima utilizada foi observada a redução precocemente, com apenas quatro dias após adição de sal. Em ambos os tratamentos, após essa redução observou-se a manutenção nos valores de carboidratos em níveis semelhantes aos da curva controle.

A concentração de proteínas totais apresentou comportamento similar ao observado para os carboidratos na ausência de sal, com manutenção dos valores durante todo o cultivo. Por outro lado, verificou-se aumento em proteínas totais na cepa exposta a concentração de 250 e 500 mM de NaCl, com valores máximos alcançados no 2º dia após o início do experimento. Os valores de proteínas aumentaram logo no segundo dia no tratamento com 250 mM de forma semelhante ao observado para os carboidratos, com uma tendência de queda até o décimo dia de cultivo (Fig. 3B). A adição de 500 mM de NaCl promoveu reduções na concentração de proteínas totais após 8 dias de cultivo, semelhante ao observado para os carboidratos. Em presença de 750 mM de NaCl a cepa UFV059 teve aumentos na concentração de proteínas totais nos primeiros dois dias, assim como observado nos cultivos com 250 e 500 mM de NaCl; entretanto, de maneira interessante, a partir do 4º dia a concentração de proteínas totais foi reduzida a níveis semelhantes àqueles encontrados nas células cultivadas em meio livre de sal. No tratamento com a maior concentração sal não foram observadas grandes flutuações na concentração de proteínas, verificando-se apenas a manutenção dos níveis de proteínas totais nos primeiros quatro dias, com a posterior redução dos teores a partir do 6º dia de exposição ao estresse salino.

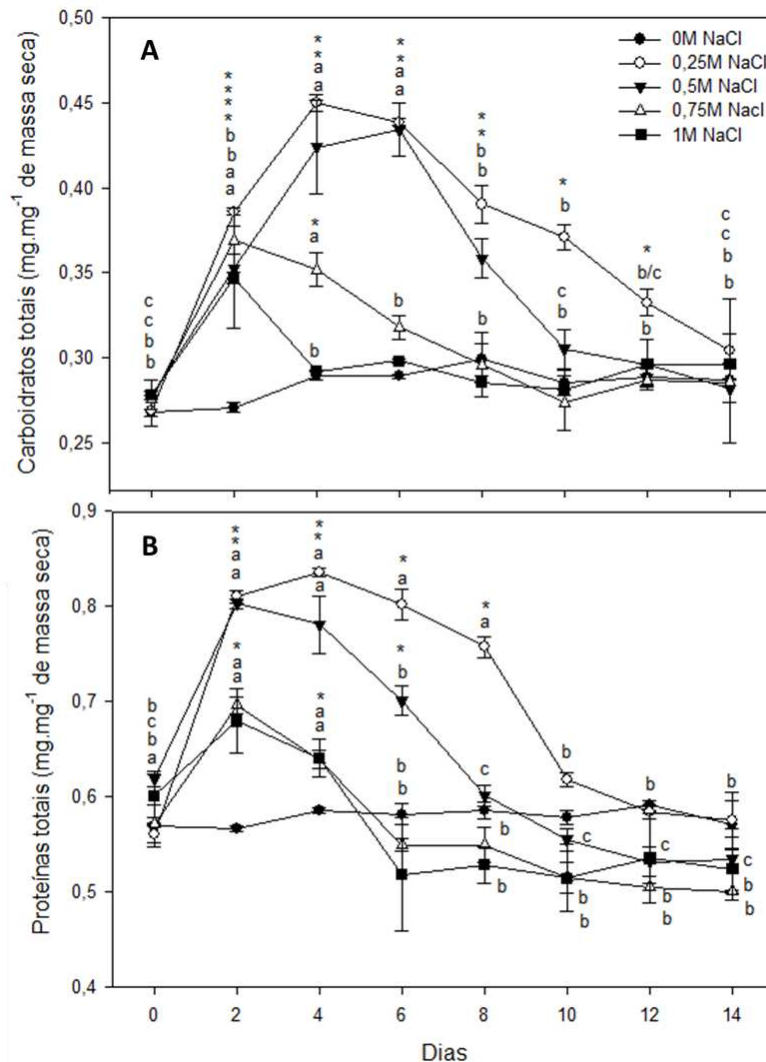


Figura 3: **Alterações na concentração de carboidratos e proteínas totais na cepa UFV059 em resposta ao estresse salino.** A concentração de carboidratos (A) e proteínas (B) totais foi determinada na cepa UFV059 cultivada sob concentrações de 0, 250, 500, 750 e 1000 mM de NaCl no meio de cultivo. Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 3$) em função dos dias de cultivo. Dentro de um mesmo tratamento, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dentro de um mesmo dia de amostragem, a presença de um asterisco (*) denota médias diferentes entre si pelo teste t student ($p < 0,01$).

No tratamento com 250 mM de NaCl foi observado expressivo incremento na concentração de aminoácidos totais nas primeiras 48 h, seguida pela manutenção destes níveis até o 8º dia de exposição seguido pela expressiva queda após o 10º dia (Fig. 4). É importante ressaltar que a queda observada coincide com a data de saída da fase exponencial da cepa UFV059 (Fig. 2A,B). A cultura cultivada sob

concentrações de 750 mM apresenta manutenção dos níveis de aminoácidos até o sexto dia, quando ocorreram quedas na concentração desses compostos, sendo alcançadas, a partir desse dia, concentrações inferiores às iniciais (Fig. 4). Os níveis de aminoácidos foram sempre mais elevados em células exposta a 250 mM do que a 750 mM de NaCl.

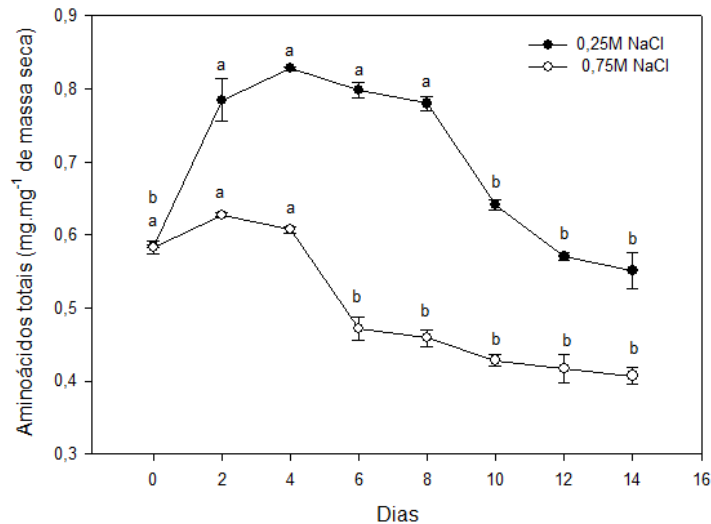


Figura 4: **Alterações na concentração de aminoácidos totais na cepa UFV059 em resposta ao estresse salino.** A concentração de aminoácidos totais foi determinada na cepa UFV059 cultivada sob concentrações de 250 e 750 mM de NaCl no meio de cultivo. Valores representam médias $\pm$ erro padrão (n= 3) em função dos dias de cultivo. Dentro de um mesmo tratamento, médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

No cultivo livre de sal (condições controle) a cepa UFV059 apresentou manutenção nos teores de clorofilas totais em base de massa seca. Não obstante, nos tratamentos com 250 e 500 mM de NaCl foram observadas incrementos nas concentrações de clorofilas totais com concentrações significativamente maiores em relação ao controle até o 10º dia de cultivo. A partir do 10º dia as culturas cultivadas em presença de 250 e 500 mM voltaram a apresentar valores similares ao cultivo sem adição de sal (Fig. 5). A concentração de clorofilas totais sofreu incrementos nas primeiras 48 h com 750 mM de NaCl, em relação ao controle, sofrendo reduções gradativas a partir do 2º dia e apresentando valores menores que os observados no controle a partir do 8º dia. Quando cultivada em presença de 1000 mM de NaCl, a cepa UFV059 manteve o conteúdo de clorofilas totais por dois dias, com posterior

redução na concentração de clorofilas em relação ao controle e aos valores apresentados no tratamento, mantendo concentrações reduzidas pelo restante do cultivo.

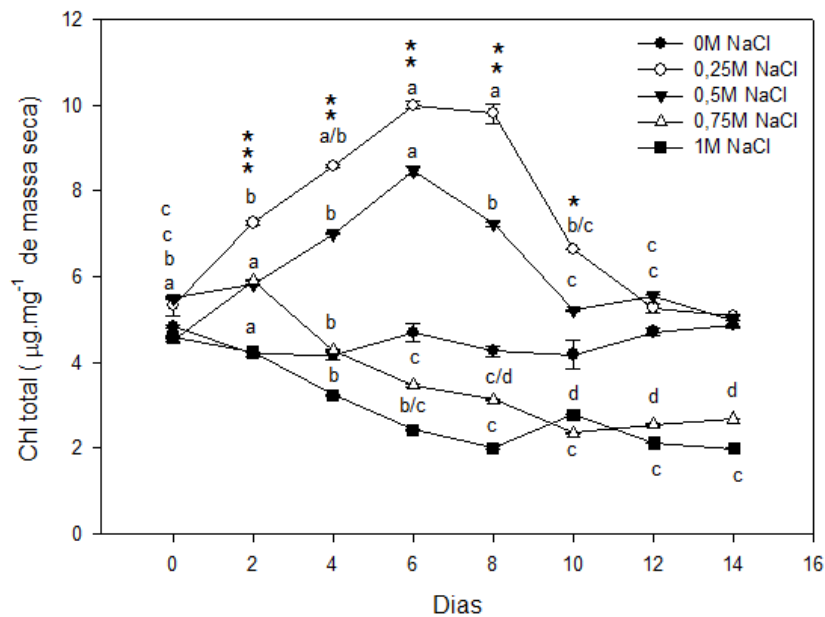


Figura 5: **Alterações na concentração de clorofilas na cepa UFV059 em resposta ao estresse salino.** As concentrações de clorofilas totais foram determinadas na cepa UFV059 cultivada sob concentrações de 0, 250, 500, 750 e 1000 mM de NaCl. Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n=3$) em função dos dias de cultivo. Dentro de um mesmo tratamento, médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Dentro de um mesmo ponto de amostragem, médias seguidas por * diferem do ponto do tratamento controle pelo teste t student ($p<0,01$).

3.1.3 Concentração de Na^+ no meio de cultura

A análise das concentrações de Na^+ no meio de cultura sem adição de sal foi realizada como controle negativo, com o intuito de se expressar apenas a concentração de Na^+ acrescida ao meio na forma de NaCl, desconsiderando, portanto, outros sais eventualmente presentes no meio de cultivo. A análise do meio de cultura contendo 250 e 750 mM de NaCl indicou a manutenção da concentração de Na^+ durante os 12 dias de cultivo, não ocorrendo variações significativas ao longo do cultivo (Fig. 6). Cumpre mencionar também que os valores de Na^+ obtidos são

menores que os teoricamente adicionados ao meio de cultivo (~ 225 mM e 700 mM de Na^+ nos tratamentos com 250 e 750 mM de NaCl aplicado, respectivamente).

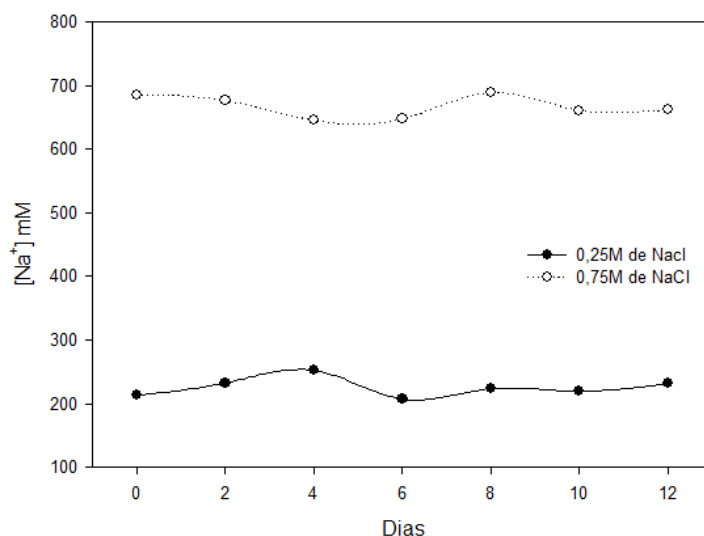


Figura 6: **Concentrações de Na^+ no meio de cultura da cepa UFV059 ao longo do cultivo em presença de NaCl.** A cepa foi cultivada em concentrações de 250 mM e 750 mM de NaCl adicionados ao meio de cultivo ao longo de 12 dias. Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n= 3$) em função dos dias de cultivo.

3.2 Comparações entre UFV059 e PCC7120

3.2.1 Determinação da DL_{50} em resposta ao estresse salino

Com intuito de se compreender melhor as possíveis alterações metabólicas que ocorrem em cianobactérias em resposta ao estresse salino, um experimento foi realizado para a obtenção da DL_{50} , que representa a concentração de NaCl capaz de matar 50% das células após 72 h de exposição. Utilizou-se a cepa UFV059, cujos resultados, previamente apresentados, demonstram ser capaz de tolerar altas concentrações de NaCl. Para efeitos comparativos utilizou-se a cepa modelo PCC7120, reconhecidamente sensível a altas concentrações de NaCl [53]. Nesse contexto, e de acordo com o hipotetizado, a DL_{50} encontrada para a cepa PCC7120 foi de 100 mM de NaCl, valor semelhante ao observado previamente em outros trabalhos [53], ao passo que para a cepa UFV059 a DL_{50} foi de 890 mM, isto é, 9 vezes superior ao observado para a cepa modelo. Para obtenção da DL_{50} , as cepas

foram expostas a concentrações crescentes de NaCl. De maneira resumida, a cepa UFV059, ao ser exposta a concentrações crescentes de NaCl, apresentou 42 % de morte celular em exposição a 750 mM e 64 % a 1000 mM (Fig. 7). Saliente-se aqui que mesmo na maior concentração de sal utilizada (1500 mM) a cepa UFV059 não apresentou morte de toda colônia, como observado para a cepa PCC7120 nos tratamentos com concentrações de NaCl superiores a 250 mM. Cabe mencionar também que no tratamento com a maior concentração de sal a cepa PCC7120 apresentou cerca 87% de morte celular, sendo as células sobreviventes, em sua maioria, acinetos.

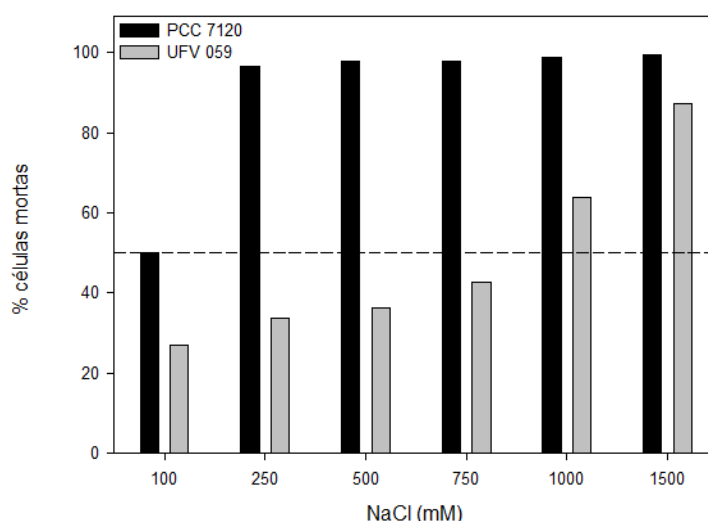


Figura 7: Resposta diferencial a concentrações crescentes de NaCl em cepas de cianobactérias contrastantes na tolerância ao estresse salino. Duas cepas, UFV059 e PCC7120, foram cultivadas em presença de diferentes concentrações de NaCl por 72 h. Decorrido esse tempo, a dose letal 50 (DL₅₀), concentração de NaCl que causa 50% de morte celular após 72 h de exposição, foi determinada mediante a contagem de células expostas aos tratamentos, e comparando esses valores com os encontrados no cultivo sem adição de sal para cada cepa.

3.2.2 Crescimento é afetado em resposta à adição das respectivas DL₅₀ em cianobactérias

Uma vez determinada a DL₅₀ as cepas UFV059 e PCC7120 foram expostas às respectivas concentrações de NaCl, com o intuito de se entender melhor a resposta diferencial observada nesses organismos. Após exposição às suas respectivas DL₅₀, as

cepas UFV059 e PCC7120 apresentaram respostas semelhantes, paralisando o crescimento com posterior queda na produção de massa seca. Registre-se também que a cepa UFV059 apresentou maior biomassa ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação à cepa PCC7120. Além disso, a cepa PCC7120 apresentou reduções de massa seca após 72 h de exposição ao sal, o que foi observado somente 96 h após a exposição ao sal em UFV059.

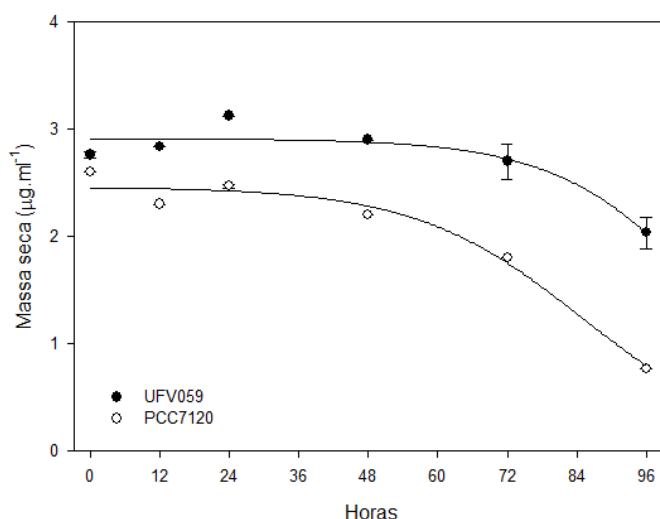


Figura 8: **A aplicação de concentrações de sal equivalente a DL_{50} afeta o crescimento em cianobactérias.** Curvas de crescimento das cepas UFV059 e PCC7120 cultivadas sob concentrações de NaCl correspondentes às respectivas DL_{50} . Cinco dias após o inóculo das cepas UFV059 e PCC7120 a 1% (v/v), promoveu-se a adição de 890 e 100 mM de NaCl, respectivamente. O crescimento foi monitorado, 12, 24, 48, 72 e 96 h após adição do sal e expresso em massa seca ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores representam curvas de tendência feitas a partir das médias $\pm$ erro padrão ($n=3$) em função do tempo de cultivo em presença de sal.

3.2.3 Caracterização morfológica das cepas PCC7120 e UFV059

A cepa UFV059, diferentemente da PCC7120, em condições de cultivo controle (sem adição de sal) apresenta coloração esverdeada mais intensa e maior agregação da colônia, enquanto a PCC7120 (Fig. 9A,B). Em adição, UFV059 se agrupa em grumos (Fig. 9B) e seus filamentos são, em sua maioria, organizados paralelamente (Fig. 9F), possibilitando assim uma maior compactação das colônias, diferentemente de PCC7120, cujos filamentos encontram-se dispersos e sem organização aparente (Fig. 9E). Ademais, ambas as cepas (UFV059 e PCC7120) são pertencentes à família Nostocaceae e possuem caracteres morfológicos semelhantes, sendo ambas

filamentosas, não apresentam ramificações, com presença de heterócitos, intercalares e terminais, e acinetos seriados (Fig. 9G,H).

As cepas UFV059 e PCC7120, quando expostas as concentrações de sal referente às suas respectivas DL_{50} , apresentaram respostas visualmente distintas ao estresse salino. A cepa UFV059 apresentou manutenção da viabilidade celular até 72 h após a exposição ao sal, com intensa diferenciação de acinetos após esse período (Fig. 10F). Apesar de sofrer morte celular, as colônias da cepa UFV059 mantiveram uma aparência mais saudável que PCC7120, com coloração mais intensa e manutenção de filamentos intactos, mesmo após 96 h de exposição ao estresse salino (Fig. 10B, D, F e H). Por outro lado, a cepa PCC7120 apresentou perda do conteúdo celular com apenas 24 h de exposição ao sal, e esse processo se tornou contínuo ao longo da exposição ao estresse (Fig. 10A). Registre-se que, após 96 h de exposição ao sal, a cepa PCC7120 apresentou perda do conteúdo celular em quase toda colônia, com quebra de filamentos e redução da pigmentação, sendo quase impossível encontrar células que não tenham sofrido danos com o estresse salino de 100 mM de NaCl (Fig. 10G). Não foi visualizado nenhum tipo de diferenciação celular na cepa PCC7120.

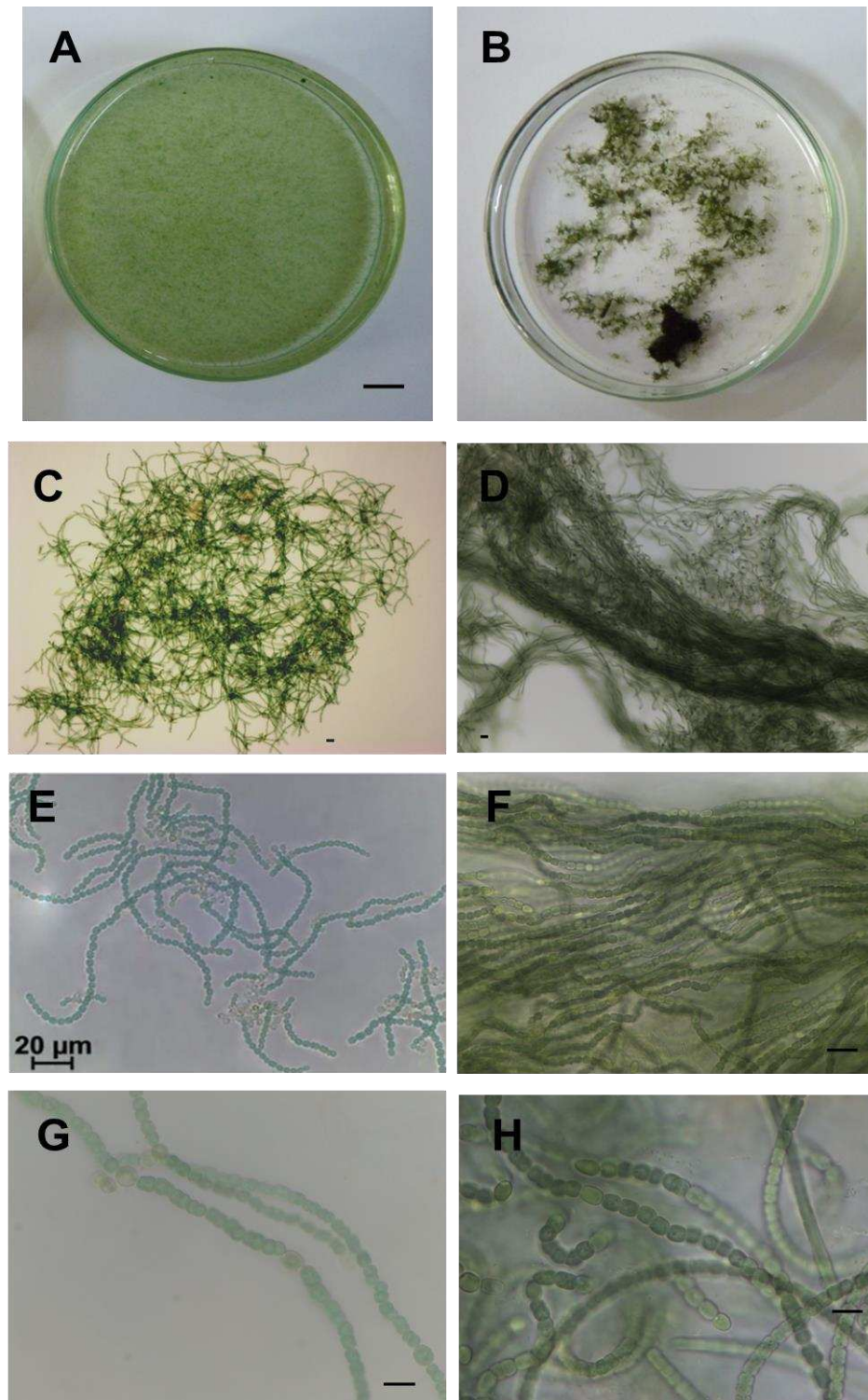


Figura 9: **Características morfológicas das cepas PCC7120 e UFV059 em ausência de sal (cultivo controle).** As cepas PCC7120 (A, C, E e G) e UFV059 (B, D, F e H) respectivamente, foram cultivadas sem adição de sal. **A-B:** Aspecto macroscópico de agregação da colônia. **C-D:** Aspecto microscópico de agregação. **E-F:** padrão de agregação e morfologia celular, aumento 20x1. **G-H:** Morfologia celular. A barra de escala representa 20 μm .

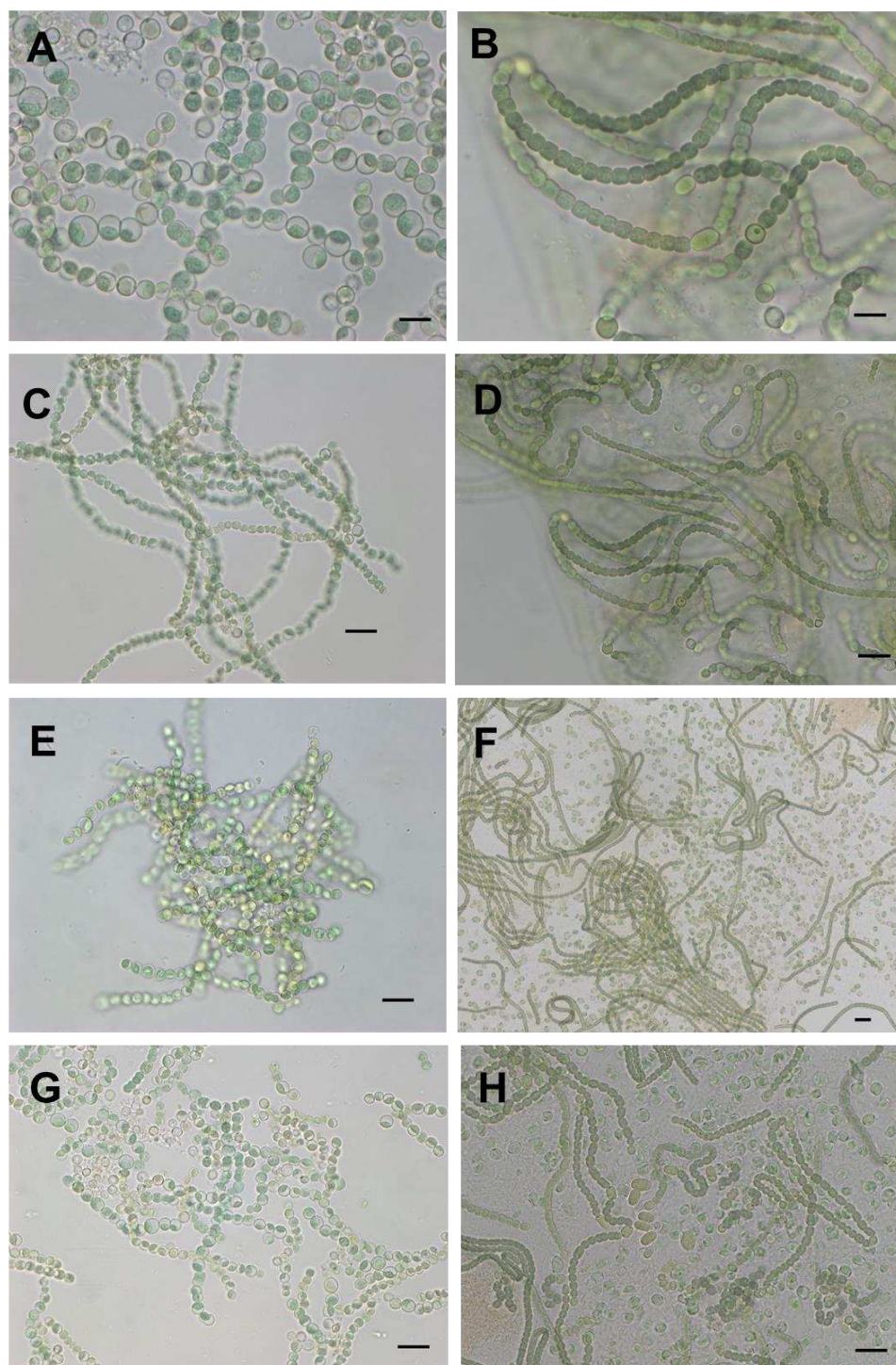


Figura 10: Características morfológicas das cepas PCC7120 e UFV059 após a adição de uma concentração de sal equivalente as respectivas DL_{50} . As Cepas PCC7120 (A, C, E e G) e UFV059 (B, D, F e H), foram cultivadas com adição de 100 e 890 mM de NaCl respectivamente, valores correspondentes a DL_{50} de cada cepa. A-B: 24 h de exposição ao estresse salino, aumento 40x1 C-D: 48 h de exposição ao estresse salino. E-F: 72 h de estresse salino. G-H: 96 h de exposição ao estresse salino. A barra de escala representa 20 μ m.

3.2.4 Respostas metabólicas das cepas UFV059 e PCC7120 cultivadas sob concentrações de NaCl referentes às respectivas DL₅₀

A exposição às concentrações de 890 e 100 mM de NaCl, referentes à DL₅₀ das cepas UFV059 e PCC7120, respectivamente, ocasionou respostas metabólicas distintas entre as cianobactérias estudadas. Mesmo antes da exposição às DL₅₀ as cepas já apresentavam concentrações de carboidratos e proteínas relativamente distintas (Fig. 11). Assim, a cepa UFV059 apresentou maiores valores de carboidratos solúveis totais (Fig. 11A) antes da exposição ao sal, apresentando um ligeiro incremento após 12 h de exposição ao sal. Cabe mencionar, no entanto, que não houve diferença significativa ao longo dos dias de estresse salino para UFV059 no que respeita as concentrações de carboidratos, que se mantiveram praticamente constantes e superiores às da cepa PCC7120 praticamente durante todo o cultivo. Após 12 h exposição a DL₅₀ a cepa PCC7120 apresentou um grande incremento na concentração de carboidratos solúveis totais, superando os valores encontrados na cepa UFV059. Entretanto, logo nas primeiras 24 h de exposição ao sal, a concentração de carboidratos na cepa PCC7120 retornou a níveis semelhantes aos iniciais, com posterior manutenção das concentrações até o fim do cultivo. Tais resultados corroboram os dados de massa seca, em que se observa a manutenção destes, com exceção do horário 12 h na cepa PCC 7120, cujo aumento na concentração de carboidratos totais não se reflete em dados de massa seca e indicam, possivelmente, uma reprogramação metabólica em resposta ao sal.

De maneira similar, os valores de proteínas totais não se alteraram significativamente durante o cultivo na cepa UFV059. Contudo, os valores foram superiores aos apresentados pela cepa PCC7120 em todos os pontos de coleta. A concentração de proteínas da cepa PCC7120, por outro lado, sofreu variação significativa após 12h de exposição a DL₅₀, alcançando níveis similares aos da cepa UFV059. De modo semelhante ao observado para os carboidratos totais, os teores de proteínas atingiram seu máximo 12 h após a exposição ao sal na cepa PCC7120, com posterior decréscimo. Apenas 48 h após a exposição ao sal, a concentração de proteínas totais da cepa PCC7120 reduziu a valores semelhantes aos iniciais, com manutenção dos valores de proteínas totais até o fim da exposição ao sal.

A concentração de clorofilas totais da cepa UFV059 foi cerca de duas vezes maior que os apresentados pela cepa PCC7120 (Fig. 12). Ressalte-se também que

pouca, se alguma, variação na concentração de clorofila por unidade de massa foi observada ao longo do estresse nas duas cepas. A cepa UFV059 apresentou maiores concentrações de clorofilas totais durante todos os dias de cultivo sob exposição a DL_{50} , havendo incrementos nos valores de clorofilas totais em função do valor inicial apenas 48 h após a exposição ao sal. A concentração de clorofilas totais não se alterou na cepa PCC7120 durante as 96 h de exposição à DL_{50} (Fig. 12). Não houve diferença nas taxas respiratórias entre as duas cepas estudadas. Por outro lado, a cepa UFV059 apresentou uma maior eficiência fotossintética quando comparada a cepa PCC7120 (Fig. 13).

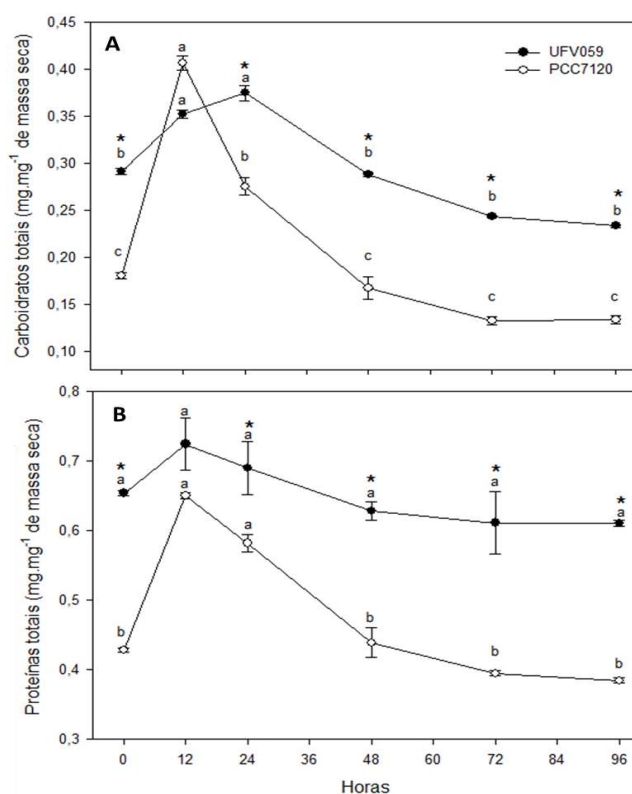


Figura 11: **Alteração na concentração de carboidratos e proteínas nas cepas UFV059 e PCC7120 em resposta ao estresse salino.** A concentração de carboidratos (A) e proteínas (B) totais das cepas UFV059 e PCC7120 cultivadas sob concentrações de NaCl correspondentes as respectivas DL_{50} foi determinada ao longo do período de exposição ao estresse salino e expressas em massa seca (mg). Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n= 3$) em função das horas de cultivo. Dentro de um mesmo tratamento, médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Dentro de um mesmo ponto de amostragem, médias seguidas por * diferem do ponto do tratamento controle pelo teste t student ($p<0,01$).

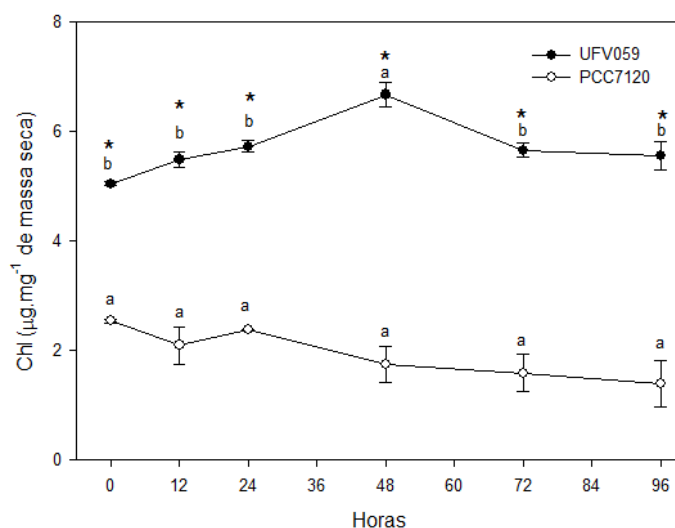


Figura 12: **Alteração na concentração de clorofilas nas cepas UFV059 e PCC7120 em resposta ao estresse salino.** A concentração de clorofilas totais das cepas UFV059 e PCC7120 cultivadas sob concentrações de NaCl correspondentes as respectivas DL_{50} foi determinada e expressas em massa seca (mg). Valores representam médias $\pm$ erro padrão (n= 3) em função das horas de cultivo. Dentro de um mesmo tratamento, médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dentro de um mesmo ponto de amostragem, médias seguidas por * diferem do ponto do tratamento controle pelo teste t student ($p < 0,01$).

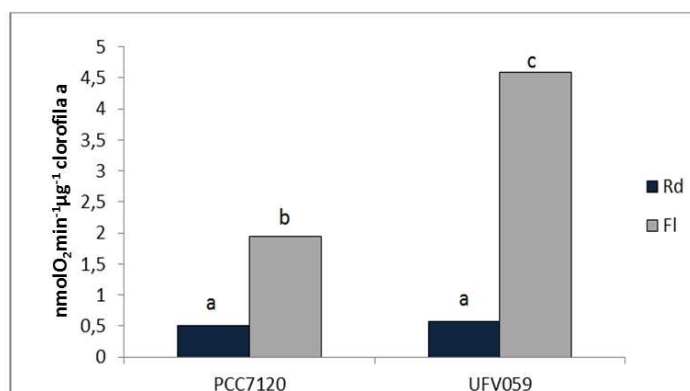


Figura 13: **Alterações nas trocas gasosas nas cepas UFV059 e PCC7120 em cultivo controle.** As taxas de consumo e evolução de oxigênio foram determinadas nas cepas UFV059 e PCC7120 cultivadas sob concentrações de NaCl, correspondentes as respectivas DL_{50} . R_d : respiração no escuro, F_L : fotossíntese líquida. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste Tukey.

4. DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fisiológica da cepa UFV059

Neste trabalho, utilizaram-se cianobactérias heterocitadas capazes de fixar nitrogênio, com origem que remete à era pré-cambriana (mais de 3×10^9 anos atrás). Nesse grupo, ainda não foram identificados transportadores específicos de Na^+ . Assim, a baixa incidência desses organismos em ambientes salinos é comumente atribuída à ausência desses transportadores, concomitantemente com uma menor eficiência dos solutos compatíveis produzidos [32]. Cumpre mencionar que utilizou-se aqui uma cepa, UFV059, capaz de tolerar altas concentrações de sal, muito provavelmente por evitar grandemente a entrada de íons (Fig. 6), associada a uma rápida e extensiva reprogramação metabólica (Figs. 9 e 10). A família Nostocaceae, a qual as cianobactérias utilizadas nesse trabalho pertencem, apresenta grande variabilidade morfológica e estrutural devido, em grande parte, à presença de complexas estratégias ecofisiológicas de adaptação a um amplo espectro de estresses abióticos, tais como alterações drásticas na temperatura, oxidação fotoquímica, deficiência de nutrientes (principalmente nitrogênio), alterações de pH, salinidade, estresse osmótico e luz ultravioleta [54]. Desta forma, esses organismos parecem adequados para a análise e entendimento dos mecanismos ativos desenvolvidos em resposta às mudanças das condições ambientais. Ademais, o fato de as cianobactérias serem filogeneticamente relacionadas com os cloroplastos [55] e dada à similaridade da sua fisiologia e metabolismo com aqueles presentes em plantas, esses microrganismos são ótimos sistemas modelo para investigação de respostas a vários estresses ambientais e a elucidação de resposta comumente observadas em plantas submetidas a esses estresses.

As análises de crescimento da cepa UFV059 realizadas por absorbância, em comparação com as por contagem de células, apresentaram menor variação associada às repetições amostrais. Isso ocorreu provavelmente, devido à formação de agregados celulares sob uma densa bainha de EPS, dificilmente desagregados sem ocasionar a quebra dos filamentos e que dificultaram o processo de visualização das células. É importante mencionar também que curvas de crescimento sem adição de sal e expressas em massa seca seguiram o mesmo comportamento que as curvas obtidas por DO, o que indica que o crescimento da cepa UFV059 apresenta padrões de

metabolismo de divisão celular homogêneo e contínuo. Não obstante, os dados obtidos no que se refere à divisão celular e acúmulo de biomassa para a cepa UFV059 em resposta a adição de 250 mM de NaCl (Fig. 2B), assim como a redução da fase log (Fig. 2A), sugerem um maior gasto energético, associado muito possivelmente, à manutenção do crescimento em presença de sal. Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesse trabalho indicam que a cepa UFV059 seria capaz de tolerar altas concentrações de sal mediante um redirecionamento da energia produzida durante a fotossíntese (Fig. 12) para processos de adaptação ao estresse salino, como bombas ativas de extrusão de íons, produção de solutos compatíveis e outros mecanismos que tornam permissíveis a manutenção do crescimento em concentrações moderadas de sal [14]. Registre-se também que a baixa produção de biomassa apresentada pela cepa UFV059, após a exposição ao estresse salino (Fig. 2B), está intimamente relacionada a família ao qual esta cepa pertence e pode ser adicionalmente associada a um maior gasto energético para os processos de aclimação ao ambiente com sal, como discutido anteriormente. A cepa UFV059 apresentou aumento nas concentrações de carboidratos solúveis em todas concentrações de NaCl ao qual foi exposta (Fig. 3A), provavelmente associada a incrementos em solutos compatíveis [7], produzidos em resposta ao estresse salino. Ademais, a cepa UFV059 apresentou aumento nos teores de clorofilas totais nos tratamentos com 250 e 500 mM de NaCl (Fig. 4), possivelmente associados à uma tentativa de manutenção das taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, do uso da energia produzida para os processos de adaptação.

A generalizada diferenciação celular em acinetos, observada nos tratamentos com 750 e 1000 mM de NaCl podem justificar, ao menos parcialmente, a manutenção da biomassa apesar da ausência de filamentos vegetativos, devido ao maior tamanho e densidade apresentado pelas células de resistência. Neste contexto, a cepa UFV059 exposta a 250, 500 e 750 mM de NaCl apresentou incrementos em proteínas totais a partir do segundo dia de exposição ao sal, aumento esse possivelmente relacionado com alterações no padrão de expressão de proteínas necessárias para a rápida aclimação ao estresse salino, como enzimas responsáveis pela síntese de solutos compatíveis. De forma contrária, a partir do sexto dia células expostas a 750 e 1000 mM de NaCl foram caracterizadas por reduções na concentração de proteínas totais, redução essa provavelmente associada com a diferenciação das células vegetativas em acinetos, cuja a atividade metabólica é reduzida [56]. Cumpre mencionar também que

acinetos são geralmente reconhecidos pela sua maior dimensão, granulação conspícua devido às altas concentrações de glicogênio e cianoficina, assim como pela presença de uma camada de polissacarídeos semelhante a observada em heterócitos [57].

Duas estratégias eficazes para a aclimação ao estresse salino são comumente observadas em microrganismos e são denominadas "salt-in" e "sal-out" [58] [14]. Organismos que utilizam a estratégia "salt-in" são caracterizados por um grande acúmulo de íons inorgânicos no citoplasma (2 a 3 M, principalmente na forma de KCl) o que garante a continuidade da absorção de água e a manutenção da pressão de turgescência celular. Registre-se, no entanto, que essa estratégia parece ser restrita a um pequeno número de microrganismos halofílicos verdadeiros, por exemplo, haloarqueas aeróbias da ordem Halobacteriales [58]. Não obstante, a maioria dos procariontes, incluindo cianobactérias e todos os microrganismos eucarióticos, usam a estratégia "sal-out" para aclimataram-se a altas concentrações de sal. A base dessa estratégia, como anteriormente discutido, reside na manutenção de uma baixa concentração interna de íons, com a necessária aclimação osmótica sendo obtida através do de um expressivo acúmulo de solutos compatíveis. Neste contexto, as concentrações de Na^+ encontradas no meio de cultivo (Fig.6), menores que os valores teoricamente adicionados ao meio (~ 225 e 700 mM de Na^+ para cultivos com 250 e 750 mM de NaCl adicionado, respectivamente), são provavelmente resultado da adsorção do sódio presente no meio de cultivo pelo EPS circundante às células da UFV059.

4.2 Análises comparativas entre UFV059 e PCC7120

Uma alternativa para se viabilizar economicamente o uso de cianobactérias em escala industrial é a utilização de águas residuais ou salobras para seu cultivo. Desta forma, a seleção de cepas halotolerantes, assim como, sua avaliação metabólica e molecular fazem-se extremamente necessárias. Registre-se também que as cianobactérias constituem um grupo de organismos vantajosos para aplicações industriais, uma vez que possuem rápido crescimento celular, necessidades nutricionais básicas (luz solar, água e CO_2) e elevadas taxas de mutação, apresentando assim, em última instância, grande potencial para serem geneticamente modificadas. Desse modo, as cianobactérias representam um sistema promissor para o entendimento de respostas fisiológicas e moleculares bem como para produção de

biocombustíveis. Cabe mencionar que, embora melhorias sejam ainda requeridas [59], principalmente por meio de engenharia genética, a produção de biocombustíveis a partir de cianobactérias, utilizando-se águas residuais e salobras, oferece potenciais vantagens sobre o sistema tradicional de produção agrícola [60]. Nesse contexto, as cepas UFV059 e PCC7120, cultivadas com adição de concentrações equivalentes às respectivas DL_{50} , apresentaram diferentes estratégias metabólicas em resposta ao estresse salino. O valor de DL_{50} , concentração de NaCl capaz de matar 50% das células após 72 h de exposição, foi 9 vezes maior para a cepa UFV059 em relação a PCC7120 (890 e 100 mM, respectivamente). Em adição, apesar de ambas as cepas terem sido cultivadas nas suas respectivas DL_{50} , a cepa UFV059 apresentou maior resistência ao estresse, como observado pelos aspectos macro e microscópios (Fig. 9 B,D), e valores iniciais superiores de proteínas e carboidratos totais, que os observados em PCC7120, com a posterior manutenção desses maiores valores. Coletivamente, essas respostas possivelmente viabilizam a manutenção do metabolismo celular e do crescimento em UFV059 em condições de estresse salino (Fig. 11). Os maiores teores de clorofila (Fig. 12), associados às maiores taxas fotossintéticas (Fig. 13), culminam possivelmente em uma maior disponibilidade energética para os processos de aclimação [14].

Cumprir mencionar também que outro(s) mecanismo(s) de aclimação, além da produção de solutos compatíveis, deve(m) existir na UFV059. Assim, a manutenção dos níveis de proteínas totais (Fig. 11B) sugere também que o aparato protéico, que possivelmente garante a maior tolerância observada na cepa UFV059, já se encontra previamente disponível. Ademais, o padrão de agregação observado em UFV059 (Fig. 9B) indica uma maior produção de EPS, que poderiam atuar delimitando um microambiente favorável e impedindo, ao menos parcialmente, a entrada de sais [61]. Registre-se também, que em cianobactérias os EPS contêm hexoses (frutose, galactose, glicose e manose), pentoses (arabinose, ribose e xilose) e deoxyhexoses (fucose e ramnose), bem como ácido glucurônico e galacturônico [62]. Não obstante, a presença destes ácidos é raramente observada em EPS de outras bactérias Gram-negativas, os quais, juntamente com a ocorrência de grupos sulfato, seriam responsáveis pela natureza aniônica do EPS de cianobactérias, que permitiria o sequestro de cátions [63]. De acordo com essa ideia, mutantes de *Synechocystis* não produtores de EPS são consideravelmente menos tolerantes ao estresse salino [41].

Adicionalmente, considerando-se que o estresse salino geralmente culmina na redução da fixação biológica de nitrogênio, desequilíbrios metabólicos podem também representar um desafio para as cianobactérias, e assim, os EPS podem representar um escape de carbono, particularmente quando o balanço C / N for deslocado para o excesso de carbono [62, 64].

Apesar de economicamente não ser vantajoso para cultivo comercial em larga escala, a diferenciação das células vegetativas em acinetos apresentado pela cepa UFV059 apresenta-se como um fator importante para o processo de adaptação ao estresse salino. Embora acinetos só tenham sido relatados em cianobactérias formadoras de heterocistos, isso não é uma regra e algumas cianobactérias são capazes de produzir heterócitos, porém não acinetos [65], especialmente quando cultivadas em condições ótimas por um longo prazo (e.g. PCC7120). Desta forma, a incapacidade da cepa PCC7120 de formar acinetos pode ser considerada uma característica imperativa para o valor reduzido da DL_{50} , apresentado por essa cepa em comparação com a UFV059.

A tolerância diferencial observada na cepa UFV059 pode estar relacionada também com o fato de a tolerância aos estresses salino e osmótico serem, aparentemente, fenômenos desvinculados em cianobactérias. Assim, a resposta diferencial mais marcante observada em cepas de *Anabaena* pode ser exemplificada pela atividade da enzima nitrogenase, que é sensível ao estresse salino mas completamente insensível ao estresse osmótico [66]. Neste contexto, os efeitos do estresse salino em algumas cepas de *Anabaena* sobre a fixação de nitrogênio são, portanto, uma consequência da componente iônico, extremamente danoso ao metabolismo, e não do componente osmótico.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Coletivamente, os resultados aqui obtidos indicam que a cepa UFV059 apresenta uma alta tolerância ao estresse salino, apresentando crescimento em meio suplementado com até 500 mM de NaCl. Essa maior tolerância observada na UFV059 deve ocorrer, provavelmente em função da presença de um aparato proteico adaptado a ambientes salinos, bem como pela maior produção de EPS, que restringiria ao menos parcialmente, a entrada de cátions. Os maiores teores de clorofila associados a altas taxas fotossintéticas apresentadas pela cepa UFV059, no cultivo controle, possivelmente culminam em uma maior disponibilidade energética, que poderia ser usada para processos de aclimação em condições de estresse. Ademais, a extensa diferenciação celular indica uma grande reprogramação metabólica, que juntamente com os outros mecanismos de aclimação, levou a uma maior tolerância ao estresse salino em comparação a cepa PCC7120, cuja DL_{50} foi nove vezes inferior a apresentada pela UFV059.

Considerando-se que o futuro do cultivo em massa de cianobactérias com aplicações biotecnológicas será, certamente, realizado na água do mar, em grande parte devido à limitação de água doce potável, os resultados aqui obtidos indicam que a cepa UFV059 trata-se de um material promissor. Não obstante, cepas ideais devem tolerar ao menos as condições salinas presentes na água do mar (500 mM NaCl) e, preferencialmente, concentrações ainda mais elevadas de sal, visto que com a evaporação a concentração de sais em sistemas de cultivo abertos aumenta rapidamente. Embora essa caracterização inicial tenha auxiliado na identificação parcial dos mecanismos de tolerância em UFV059, cumpre mencionar que, em longo prazo, uma caracterização molecular mais detalhada deve permitir a identificação de metabólitos e genes alvos associados à halotolerância diferencial observada na cepa UFV059 e que possam contribuir para o desenvolvimento de cianobactérias e plantas tolerantes a salinidade através da engenharia genética.

6. REFERÊNCIAS

1. Scanlan, D.J., et al., Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009. **73**(2): p. 249-299.
2. Flores, E. and A. Herrero, Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2009. **8**(1): p. 39-50.
3. Deusch, O., et al., Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Molecular Biology and Evolution*, 2008. **25**(4): p. 748-761.
4. Badger, M.R., et al., The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 2006. **57**(2): p. 249-265.
5. Beck, C., et al., The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics*, 2012. **13**(1): p. 56.
6. Komárek, J. and J. Kaštovský, Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies*, 2003. **109**(1): p. 305-325.
7. Hagemann, M., et al., Biochemical characterization of glucosylglycerol-phosphate synthase of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: comparison of crude, purified, and recombinant enzymes. *Current Microbiology*, 2001. **43**(4): p. 278-283.
8. Komárek, J., Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae*, 2006. **21**(4): p. 349-375.
9. Reed, R.H., et al., Osmotic shock-induced release of low molecular weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 1986. **8**(2): p. 101-104.
10. Reed, R.H. and W.D.P. Stewart, Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biology*, 1985. **88**(1): p. 1-9.
11. Apte, S.K. and J. Thomas, Membrane electrogenesis and sodium transport in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *European Journal of Biochemistry*, 1986. **154**(2): p. 395-401.
12. Oren, A., Diversity of organic osmotic compounds and osmotic adaptation in cyanobacteria and algae, in *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. 2007, Springer. p. 639-655.
13. Oren, A., Salts and brines, in *Ecology of cyanobacteria II*. 2012, Springer Netherlands. p. 401-426.
14. Hagemann, M., Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011. **35**(1): p. 87-123.
15. Joset, F., R. Jeanjean, and M. Hagemann, Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: Deciphering the molecular events. *Physiologia Plantarum*, 1996. **96**(4): p. 738-744.
16. Hinch, D. and M. Hagemann, Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal*, 2004. **383**: p. 277-283.
17. Salerno, G.L., et al., Fructose-containing oligosaccharides: novel compatible solutes in *Anabaena* cells exposed to salt stress. *Plant Science*, 2004. **167**(5): p. 1003-1008.

18. Bremer, E., Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial Stress Responses*, 2000: p. 79-97.
19. Reed, R.H., et al., Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1986. **39**(1-2): p. 51-56.
20. Klähn, S., et al., Glucosylglycerate: a secondary compatible solute common to marine cyanobacteria from nitrogen-poor environments. *Environmental Microbiology*, 2010. **12**(1): p. 83-94.
21. Pade, N. and M. Hagemann, Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. *Life*, 2014. **5**(1): p. 25-49.
22. Marin, K., et al., Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiology*, 2004. **136**(2): p. 3290-3300.
23. Kaneko, T., et al., Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research*, 1996. **3**(3): p. 109-136.
24. Ooyabu, J., et al., The expression pattern of NAD(P)H oxidases and the cyclic electron transport pathway around photosystem I of *Synechocystis* sp. PCC6803 depend on growth conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008. **72**(12): p. 3180-3188.
25. Elanskaya, I.V., et al., Functional analysis of the Na⁺/H⁺ antiporter encoding genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochemistry (Moscow)*, 2002. **67**(4): p. 432-440.
26. Wang, H.-L., B.L. Postier, and R.L. Burnap, Polymerase chain reaction-based mutageneses identify key transporters belonging to multigene families involved in Na⁺ and pH homeostasis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, 2002. **44**(6): p. 1493-1506.
27. Marin, K., et al., Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(15): p. 9061-9066.
28. Hagemann, M., et al., Salt-dependent protein phosphorylation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 1993. **113**(2): p. 205-209.
29. Bhagwat, A. and S.K. Apte, Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *Journal of Bacteriology*, 1989. **171**(9): p. 5187-5189.
30. Ohta, H., et al., Identification of genes expressed in response to acid stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using DNA microarrays. *Photosynthesis Research*, 2005. **84**(1-3): p. 225-230.
31. Fulda, S., et al., Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics*, 2006. **6**(9): p. 2733-2745.
32. Wolk, C.P., A. Ernst, and J. Elhai, Heterocyst metabolism and development, in *The molecular biology of cyanobacteria*, D. Bryant, Editor. 2004, Springer Netherlands. p. 769-823.
33. Mikkat, S. and M. Hagemann, Molecular analysis of the ggtBCD gene cluster of *Synechocystis* sp. strain PCC6803 encoding subunits of an ABC transporter for osmoprotective compounds. *Archives of Microbiology*, 2000. **174**(4): p. 273-282.
34. Srivastava, A.K., et al., Assessment of salinity-induced photorespiratory glycolate metabolism in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*, 2011. **157**(3): p. 911-917.

35. Seki, M., et al., Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & Integrative Genomics*, 2002. **2**(6): p. 282-291.
36. Chaves, M., J. Flexas, and C. Pinheiro, Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 2009. **103**(4): p. 551-560.
37. Lu, C. and J. Zhang, Role of light in the response of PSII photochemistry to salt stress in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Experimental Botany*, 2000. **51**(346): p. 911-917.
38. Srivastava, A., et al., Salinity-induced physiological and proteomic changes in *Anabaena doliolum*. *Environmental and Experimental Botany*, 2008. **64**(1): p. 49-57.
39. Freire-Nordi, C.S., A.A.H. Vieira, and O.R. Nascimento, The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochemistry*, 2005. **40**(6): p. 2215-2224.
40. Moreno, J., et al., Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*, 1998. **60**(3): p. 175-182.
41. Jittawuttipoka, T., et al., Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PloS One*, 2013. **8**(2): p. e55564.
42. Anagnostidis, K. and J.í. Komárek, Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 - Introduction. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 1985. **38-39**: p. 291-302.
43. da Silva, L.H., et al., Análise de esteiras microbianas e cianobactérias da laguna Amarga, Parque Nacional de Torres del Paine, Chile. *Gaea-Journal of Geoscience*, 2008. **4**(1): p. 32-37.
44. Rippka, R., et al., Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979. **111**: p. 1.
45. Krall, L., et al., Assessment of sampling strategies for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) based metabolomics of cyanobacteria. *Journal of Chromatography B*, 2009. **877**(27): p. 2952-2960.
46. Nunes-Nesi, A., et al., Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal*, 2007. **50**(6): p. 1093-1106.
47. Porra, R.J., W.A. Thompson, and P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Bioch et Biophys Acta* 1989. **975**(3): p. 384-394.
48. Masuko, T., et al., Carbohydrate analysis by a phenol sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 2005. **339**(1): p. 69-72.
49. Sienkiewicz-Porzucek, A., et al., Mild Reductions in Mitochondrial Citrate Synthase Activity Result in a Compromised Nitrate Assimilation and Reduced Leaf Pigmentation But Have No Effect on Photosynthetic Performance or Growth. *Plant Physiol*, 2008. **147**(1): p. 115-127.
50. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951. **193**(1): p. 265-275.
51. Jeon, Y.C., C.W. Cho, and Y.S. Yun, Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal*, 2005. **27**(2): p. 127-131.

52. Torzillo, G., P. Bernardini, and J. Masojidek, On-line monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on the productivity of outdoor cultures of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 1998. **34**(3): p. 504-510.
53. Rai, S., et al., Comparative proteomics unveils cross species variations in *Anabaena* under salt stress. *Journal of proteomics*, 2014. **98**: p. 254-270.
54. Sand-Jensen, K., Ecophysiology of gelatinous *Nostoc* colonies: unprecedented slow growth and survival in resource-poor and harsh environments. *Annals of Botany*, 2014. **114**(1): p. 17-33.
55. Gray, M.W. and W.F. Doolittle, Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiological Reviews*, 1982. **46**(1): p. 1.
56. Adams, D.G. and P.S. Duggan, Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist*, 1999. **144**(1): p. 3-33.
57. Golibic, S., V.N. Sergeev, and A.H. Knoll, Mesoproterozoic *Archaeoellipsoides*: akinetes of heterocystous cyanobacteria. *Lethaia*, 1995. **28**(4): p. 285-298.
58. Galinski, E.A. and H.G. Trüper, Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994. **15**(2-3): p. 95-108.
59. Esteves-Ferreira, A.A., et al., Comparative evaluation of different preservation methods for cyanobacterial strains. *Journal of Applied Phycology*, 2013. **25**(4): p. 919-929.
60. Li, Y., et al., Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 2008. **24**(4): p. 815-820.
61. García-Meza, J.V., C. Barrangue, and W. Admiraal, Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environmental toxicology and chemistry*, 2005. **24**(3): p. 573-581.
62. Kehr, J.-C. and E. Dittmann, Biosynthesis and Function of Extracellular Glycans in Cyanobacteria. *Life*, 2015. **5**(1): p. 164-180.
63. De Philippis, R., G. Colica, and E. Micheletti, Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011. **92**(4): p. 697-708.
64. Otero, A. and M. Vincenzini, *Nostoc* (cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced c/n metabolism¹. *Journal of Phycology*, 2004. **40**(1): p. 74-81.
65. Castenholz, R. and J. Waterbury, Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1989. **3**: p. 1710-1789.
66. Fernandes, T.A., V. Iyer, and S.K. Apte, Differential responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. *Applied and environmental microbiology*, 1993. **59**(3): p. 899-904.