

ALBERTO ABRANTES ESTEVES FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA DE
DIFERENTES CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS**

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**

2013

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

T

F383c
2013
Ferreira, Alberto Abrantes Esteves, 1988-
Caracterização fisiológica e metabólica de diferentes cepas
de cianobactérias / Alberto Abrantes Esteves Ferreira. – Viçosa,
MG, 2013.
xi, 55 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. CianoBactérias - Fisiologia. 2. CianoBactérias
- Metabolismo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

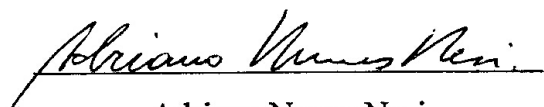
CDD 22 ed. 579.36


ALBERTO ABRANTES ESTEVES FERREIRA

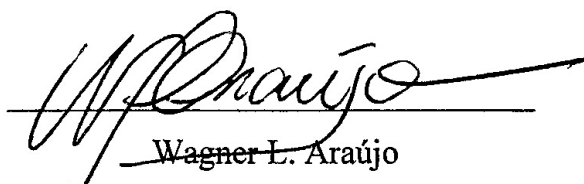
**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA DE
DIFERENTES CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS**

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: 18 de dezembro de 2013


Adriano Nunes Nesi


Débora Machado Côrrea


Wagner L. Araújo
(Orientador)

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me ensinar que tudo ocorre segundo a sua vontade. Fazendo-me entender que temos de ser pacientes, pois Ele nos prepara para que sejamos realmente capazes de conquistar nossas vitórias.

Aos meus pais, Geraldo Alberto e Maria Alaide, pela boa educação que recebi, bons exemplos de honestidade e principalmente, por me mostrarem que a melhor herança que poderiam me oferecer seria os estudos.

Às minhas avós Jaci e Diolinda (*in memoria*), pelo carinho materno que sempre demonstraram por mim e pelas boas lembranças que guardo dos momentos em que ficávamos conversando sobre situações passadas (“causos”).

Ao meu avô Antônio (*in memoria*), pela confiança e os conselhos de pai que sempre me deu, estimulando-me a estudar.

Às minhas lindas irmãs, que com toda a graciosidade e carinho me apoiaram e deram forças ao longo de toda essa caminhada.

Ao meu tio José Ailton (“Deda”) e a tia Raimunda, pelo carinho, amizade e por sempre estarem presentes em quaisquer momentos.

À minha madrinha Fátima, agradeço e parablenizo pelo carinho e bons exemplos que me deu, pois mesmo quando esteve distante se fez presente.

Agradeço à Kallyne pela paciência, companheirismo e incentivo, entendendo e me auxiliando nos momentos difíceis.

À Professora Rosane (*in memoria*), por despertar meu interesse pelas cianobactérias e compartilhar comigo seu conhecimento.

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

Ao Professor Adriano Nunes-Nesi pela co-orientação e por todo o suporte dado durante esse período.

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

Aos amigos da Ficologia Adriana, Claudinéia, Mariana, Renan, Débora e Rinamara pela amizade durante os anos de laboratório.

Aos amigos do grupo de pesquisa Dora, David, João Henrique, Dalton, Luna, Vitor, Bel, Dani, Franklin, Paula, Laise, Jorge e Rebeca pelo companheirismo e atenção, sempre me apoiando e ajudando durante todo esse período.

À Lilian, Kelly, Leandro e aos demais amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo pela amizade, atenção e por sempre me auxiliarem durante meus experimentos.

Ao Renato 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 Sr. Rogério Gomide, Sr. João Bosco, Sr. Carlos Raimundo, Sr. Antônio Cordeiro, Sra. Mercês e Sra. Luciene por me auxiliarem sempre que solicitados.

A Empresa Júnior de Biologia - In Bio e a todos os membros que nela passaram, pelo conhecimento adquirido em conjunto e pelas experiências vivenciadas.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

BIOGRAFIA

Alberto Abrantes Esteves Ferreira, filho de Geraldo Alberto Esteves de Paula e Maria Alaide Ferreira de Paula, nasceu em 16 de abril de 1988, na cidade de Janaúba, Minas Gerais. Completou o ensino básico em sua cidade natal em 2005.

Formou-se Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa em julho de 2011 e janeiro de 2012, respectivamente. Em março de 2012 iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa. Em dezembro de 2013 concluiu os requisitos para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1 Introdução.....	1
2 Material e métodos.....	5
2.1 Obtenção e seleção de cepas de cianobactérias.....	5
2.2 Condições de cultivo.....	6
2.3 Curvas de crescimento.....	6
2.4 Eliminação de contaminantes bacterianos.....	9
2.5 Avaliação de parâmetros fotossintéticos e metabólicos.....	9
2.5.1 Determinação das taxas de consumo e evolução de oxigênio e parâmetro de fluorescência.....	9
2.5.2 Análises bioquímicas.....	9
2.5.2.1 Pigmentos fotossintetizantes.....	9
2.5.2.2 Carboidratos solúveis totais.....	10
2.5.2.3 Glicogênio.....	10
2.5.2.4 Proteínas totais.....	11
2.5.2.5 Aminoácidos totais.....	12
2.5.2.6 NAD(H) e NADP(H).....	12
2.5.2.7 Lipídios totais.....	13
2.6 Ensaio enzimáticos.....	14
2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	14
3 Resultados.....	14
3.1 Crescimento e produção de biomassa.....	15
3.2 Irradiâncias de compensação e saturação.....	16
3.3 Parâmetros fotossintéticos e de fluorescência.....	17
3.4 Alterações metabólicas em resposta a variações morfológicas em cepas de cianobactérias.....	19

3.4.1	Pigmentos.....	19
3.4.2	Proteínas e aminoácidos totais.....	21
3.4.3	Carboidratos solúveis totais e glicogênio.....	22
3.4.4	Lipídios totais.....	23
3.4.5	Produtividade diária.....	23
3.4.6	Concentrações de nucleotídeos de piridina.....	25
3.5	Atividade enzimática acoplada conjunta da OGDC e SSADH.....	27
3.6	Análises multivariadas.....	28
3.6.1	Análises de componentes principais.....	28
3.6.2	Correlação entre as variáveis analisadas.....	29
4	Discussão.....	31
4.1	Fisiologia e metabolismo: aspectos associados ao crescimento e produção diária de biomassa.....	32
4.2	Produção de reservas e suas possíveis aplicações biotecnológicas.....	35
4.3	Aspectos fisiológicos e metabólicos em diferentes cepas de cianobactérias e suas implicações em relações morfológicas e moleculares.....	39
5	Conclusões.....	42
	Referências	43
	Dados suplementares.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	- Graus Celsius
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
2-OGDC	- 2-oxoglutarato descarboxilase
2-OGDH	- 2-oxoglutarato desidrogenase
<i>A</i>	- Fotossíntese líquida
ATP	- Adenosina trifosfato
BG-11	- Meio de cultura para algas azul esverdeadas (BG-11 do inglês “Blue Green medium”)
CCM	- Coleção de Cianobactéria e Microalgas
DBC	- Delineamento em Blocos Casualizados
DBV	- Departamento de Biologia Vegetal
DTT	- DL-Ditiotreitol (DTT do inglês “DL-Dithiothreitol”)
ETR	- Taxa de transporte de elétrons
F_v/F_m	- Rendimento quântico máximo do fotossistema II
<i>g</i>	- Força centrífuga
H	- Hora
H ₂	- Gás hidrogênio
I_c	- Irradiância de compensação
I_s	- Irradiância de saturação
Kg	- Quilograma
M	- Molar
m ²	- Metro quadrato
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
MTT	- Brometo de azul de triazolil tetrazolito (MTT do inglês “Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide”)
N	- Nitrogênio

NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
nm	- Nanometro
NO	- Dissipação de energia por fluorescência e calor
PCC	- Coleção de Culturas Paster (PCC do inglês “Paster Culture Collection”)
PES	- Fenazina etosulfato (PES do inglês “Phenazine ethosulfate ”)
PMS	- Fenasina metasulfato (PMS do inglês “Phenazine methosulfato”)
PSI	- Fotossistema I
PSII	- Fotossistema II
R _d	- Respiração no escuro
RFA	- Radiação fotossinteticamente ativa
s	- Segundo
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SSADH	- Semialdeído succínico desidrogenase
TCA	- Ácidos Tricarboxílicos
TCR	- Taxa de crescimento relativo
TPP	- Tiamina Pirofosfato (TPP do inglês “Thiamine Pirophosphate”)
UFV	- Universidade Federal de Viçosa
ΦPSII	- Eficiência fotoquímica do fotossistema II adaptado a luz

RESUMO

FERREIRA, Alberto Abrantes Esteves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro, 2013. **Caracterização fisiológica e metabólica de diferentes cepas de cianobactérias.** Orientador: Wagner L. Araújo.

Este trabalho é o primeiro a explorar como a variação natural, em termos de morfologia, pode estar relacionada a alterações no crescimento, fisiologia e metabolismo em cianobactérias. Esses micro-organismos fotossintetizantes ocupam atualmente diversos nichos ecológicos e, conseqüentemente, apresentam uma enorme diversidade fisiológica, metabólica e molecular. Desse modo, verifica-se um grande potencial no uso de cianobactérias em aplicações biotecnológicas. Contudo, pouco ou nada se sabe acerca da variação natural entre diferentes cepas no que diz respeito ao metabolismo em geral. Neste trabalho utilizou-se 18 cepas de cianobactérias divididas em três grupos, tomando como base os caracteres morfológicos apresentados: unicelular, filamentoso homocitado e filamentoso heterocitado. O maior crescimento observado em algumas cepas mostrou-se intimamente associado: (i) a alta eficiência na absorção e utilização de luz, refletindo diretamente em incrementos em fotossíntese líquida (A); (ii) às menores demandas energéticas associadas a respiração no escuro (R_d) e fixação de nitrogênio e, (iii) ao balanço adequado entre A , R_d e fixação de nitrogênio influenciando a taxa de crescimento relativo (TCR), produtividade diária de biomassa e acúmulo de reservas (proteínas, carboidratos e lipídios). Em síntese, foi possível observar um grande potencial das cepas unicelulares para a produção de biomassa, carboidratos solúveis totais e lipídios, ao passo que as cepas homocitadas mostraram-se promissoras produtoras de proteínas. Embora as cepas heterocitadas não tenham apresentado maior produtividade de nenhuma das reservas avaliadas, essas cepas demonstram elevado potencial para a produção de hidrogênio. Utilizando análises multivariadas foi possível observar que o agrupamento resultante das comparações fisiológicas, metabólicas e de crescimento mostrou-se coerente ao observado por comparações morfológicas prévias, o que permite inferir que as variações morfológicas apresentadas pelas cepas aqui utilizadas acarretaram em alterações na fisiologia, metabolismo e crescimento. Desse modo, os resultados demonstram a importância de uma detalhada caracterização fisiológica dos organismos desse phylum, para um melhor entendimento das relações metabólicas existentes nesse grupo e seleção de cepas com potencial para aplicações biotecnológicas várias.

ABSTRACT

FERREIRA, Alberto Abrantes Esteves, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Physiological and metabolic characterization of different cyanobacterial strains**. Adviser: Wagner L. Araújo.

This is the first work to explore in details how natural variation in terms of morphology may be related to changes in growth, physiology and metabolism in cyanobacterial strains. Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that occupy diverse ecological niches and exhibit enormous diversity in terms of their habitats, physiology, morphology and metabolic capabilities. Accordingly, there is a growing interest for exploring these microorganisms for biotechnological applications. However, our knowledge concerning natural variation within different cyanobacteria strains in regard to metabolism is little and in general fragmented. In the present work, 18 cyanobacteria strains were used. These strains were separated in three groups based on morphological characters namely unicellular cyanobacteria, non-heterocystous cyanobacterial filaments and heterocystous cyanobacterial filaments. Higher growth in some strains was closely associated with: (i) an increased light absorption efficiency and use, reflecting directly on increments in net assimilation (A); (ii) a lower energetic requirement alongside dark respiration (R_d) and nitrogen fixation; and (iii) an adequate balance between A , R_d and nitrogen fixation impacting the relative growth rate (RGR), daily biomass productivity and reserve accumulation (e.g. proteins, carbohydrates and lipids). In summary, it was observed a large potential of unicellular cyanobacterial strains for biomass, total soluble carbohydrates and lipids production, whereas non-heterocystous cyanobacterial strains were identified as promising protein producers. Although heterocystous cyanobacterial strains did not presented higher productivity of any evaluated reserves, these strains have an intrinsic potential for hydrogen production. Moreover, multivariate analysis revealed that physiological, metabolic and growth comparisons are consistent with previous morphological comparison. It is reasonable to assume that the morphological changes presented by the cyanobacterial strains used culminated in physiological, metabolic, and growth related changes. Furthermore, the results obtained demonstrate the importance of an extensive physiological and metabolic characterization within this phylum for a better understanding of metabolic relationships and selection of strains with higher potential for biotechnological applications.

1. INTRODUÇÃO

Embora provavelmente não seja o processo metabólico mais antigo da Terra, a fotossíntese surgiu muito cedo na história de nosso planeta. Inicialmente, organismos anoxigênicos realizaram as primeiras atividades fotossintéticas utilizando doadores de elétrons distintos, tais como H_2 , H_2S e $Fe(OH)$. Registre-se, todavia, que estes substratos eram muito menos abundantes em comparação ao pool (quase ilimitado) de água (H_2O) sobre a superfície do planeta. Desse modo, o processo evolutivo convergiu de maneira a favorecer organismos capazes de utilizar H_2O como fonte de elétrons e prótons para a redução do CO_2 atmosférico fixado, utilizando a energia solar para conduzir esta reação ([Tomitani et al., 2006](#); [Blankenship, 2010](#); [Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011](#)).

As cianobactérias, pertencem a um grupo filogenético único de bactérias capazes de produzir oxigênio durante a fotossíntese utilizando H_2O como doador de elétrons. Esses organismos já habitam a terra por 2,6 a 3,5 bilhões de anos e desempenharam um papel importante na formação de uma atmosfera rica em oxigênio. Concomitantemente, estas novas condições, propiciaram a evolução do metabolismo aeróbio e o surgimento de formas de vida mais avançadas ([Kump, 2008](#); [Bosak et al., 2009](#); [Govindjee & Shevela, 2011](#)).

As variações ambientais e temporais em termos de luz, CO_2 e O_2 atuam como força motriz para a evolução, aquisição de genes e propriedades fisiológicas em organismos diversos ([Badger et al., 2006](#)). De maneira particular, as cianobactérias, ocupam atualmente diversos nichos ecológicos, apresentando enorme diversidade em termos de habitat, fisiologia, morfologia, capacidade metabólica e propriedades moleculares. Acredita-se que estes fatores tenham sido importantes para o sucesso evolutivo e ecológico das cianobactérias ([Beck et al., 2012](#)). Nesse sentido, percebe-se também que a evolução das cianobactérias tem sido um processo contínuo, baseado na transferência horizontal de ácidos nucleicos (DNA) entre cepas e dentro de populações, em combinação com a rápida aclimação e adaptação ([Hagemann et al., 2001](#); [Komárek & Kastovský, 2003](#)). Uma consequência deste processo altamente regulado é a ocorrência de uma grande diversidade de cianobactérias, resultando em numerosos tipos de morfologias e genótipos ecologicamente especializados (Komárek, 2006). Desse modo, as perdas ou, principalmente, ganho de genes, associados às pressões seletivas realizadas por diferentes fatores ambientais podem ter sido responsáveis pela extensa diversificação morfológica, acompanhada por divergências fisiológicas e metabólicas significativas entre as ordens do Phylum Cyanophyta.

As cianobactérias apresentam uma enorme diversidade em termos de tamanho de genoma o que se traduz em uma complexa organização metabólica ([Beck et al., 2012](#)). Assim, em

cianobactérias com genomas relativamente pequenos (4 milhões de pares de base - Ordem Chroococcales), esse genoma estaria representado principalmente por genes do metabolismo central, ao contrário do encontrado em espécies com genomas maiores (12 milhões de pares de base - ordem Nostocales). Assim, o genoma básico das cianobactérias unicelulares *Prochlorococcus* spp. codifica entre 52 e 66% de todas as proteínas, ao passo que em *Anabaena* sp., uma representante da Ordem Nostocales, esse genoma básico codifica apenas 25% ([Rippka et al., 1979](#)). Essas divergências também parecem estar presentes entre representantes de uma mesma ordem ou mesmo gênero ([Mulkidjianian et al., 2006](#)), demonstrando que a grande diversidade natural apresentada pelas cianobactérias pode estar relacionada não apenas as variações morfológicas, mas também ao ambiente e ao histórico evolutivo desses micro-organismos. Em adição é plausível sugerir que essa diversidade seja resultado, em última instância, de extensas modificações e rearranjos genômicos, o que justificaria, ao menos em parte, as divergências observadas em termos de tamanho do genoma.

Inicialmente, as cianobactérias foram separadas, em termos de classificações taxonômicas, com base unicamente em caracteres morfológicos distintos ([Anagnostidis & Komarek, 1985](#)). O advento de metodologias modernas, contudo, estimulou o desenvolvimento de novos modelos de classificação, influenciando, assim, sua taxonomia. Dessa forma, a classificação de cianobactérias vem sendo atualmente revista com base também em estudos moleculares. Assim, dados moleculares utilizando sequências de RNA ribossomal 16S e do gene *nifD* evidenciaram que as cianobactérias heterocitadas, ramificadas ou não, formam um grupo monofilético único ([Lyra et al., 2001](#); [Henson et al., 2004](#)). Por outro lado, cepas unicelulares e filamentosas homocitadas apresentam provavelmente uma origem polifilética ([Litvaitis, 2002](#); [Valério et al., 2009](#)). A combinação entre ambas abordagens, molecular e morfológica, para a classificação moderna dos organismos é, portanto, essencial para estudos sobre o histórico evolutivo desses organismos (Komárek, 2006). Nesse contexto, a utilização de parâmetros fisiológicos e metabólicos, somados aos parâmetros morfológicos e filogenéticos já existentes, pode contribuir significativamente para um melhor entendimento das relações entre diferentes clados da árvore filogenética.

Embora a maquinaria fotossintética das cianobactérias tenha sido amplamente estudada e discutida em termos de evolução das cianobactérias ([Badger et al., 2006](#)), pouco se conhece sobre a evolução de outras vias metabólicas e de sua diversidade metabólica em cianobactérias ([Steinhauser et al., 2012](#)). Nesse sentido, durante mais de quatro décadas acreditou-se que esses micro-organismos apresentavam o ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) incompleto, devido à ausência da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase (2-OGDH). No entanto, evidências recentes demonstram que o ciclo TCA pode ser concluído pela ação de duas enzimas alternativas, a 2-oxoglutarato descarboxilase (2-OGDC) e a semialdeído succínico desidrogenase (SSADH) ([Zhang & Bryant,](#)

[2011](#)). Estas duas enzimas seriam capazes de substituir, funcionalmente, as enzimas 2-OGDH e succinil-CoA ligase, gerando equivalentes redutores e completando assim todo o ciclo ([Zhang & Bryant, 2011](#)). A descoberta dessa variante metabólica estimula questionamentos sobre a vantagem evolutiva da aquisição desses genes, considerando que (i) algumas espécies de cianobactérias foram capazes sobreviver sem eles ([Steinhauser et al., 2012](#)) e (ii) outros organismos superiores (plantas e animais) apresentam a enzima 2-OGDH ativa na ausência dessas duas outras enzimas. Percebe-se, portanto, que de um ponto de vista metabólico e molecular diferenças entre cepas de cianobactérias parecem evidentes. Contudo, até o presente momento, nenhum estudo detalhado foi realizado com vistas a caracterizar molecular e metabolicamente diferentes cepas de cianobactérias.

Registre-se também que as cianobactérias apresentam-se como organismos vantajosos para utilização em aplicações industriais, uma vez que possuem crescimento celular rápido, necessidades nutricionais básicas (luz solar, água e CO₂) e elevadas taxas de mutação, o que lhes confere grande potencial para serem geneticamente modificadas ([Heidorn et al., 2011](#); [Ruffing, 2011](#); [Wilde & Dienst, 2011](#)). Devido à sua diversidade natural e capacidade de crescer em uma variedade de habitats, como áreas impróprias a agricultura, há um crescente interesse na exploração destes microrganismos para a produção de biocombustíveis e outros produtos de alto valor de mercado ([Machado & Atsumi, 2012](#)). Entretanto, além de conhecer melhor os fundamentos biológicos faz-se necessário também conhecer a diversidade fisiológica e metabólica das cianobactérias, de modo a otimizar sua aplicação em processos biotecnológicos.

Grande parte da produção de biocombustíveis tem se concentrado em plantas de interesse agrônômico (e.g., milho, cana-de-açúcar, soja e óleo de palma, dentre outras). Contudo, o uso dessas plantas em áreas que poderiam ser utilizadas para a produção de alimentos, somados a perda de ecossistemas e o aumento nos preços dos alimentos tem sido amplamente debatidos ([Gnansounou et al., 2009](#)). Saliente-se, entretanto, que embora a maioria das opções para bioenergia falhe em ambos os casos atualmente, a utilização de micro-organismos tem demonstrado um elevado potencial para produção de energia renovável. Cumpre mencionar, portanto, que cianobactérias apresentam capacidade fotossintética para converter até 10% da energia solar em biomassa, em comparação com o 1% registrado em culturas energéticas convencionais, tais como o milho ou cana-de-açúcar, ou os 5% obtidos por algas ([Parmar et al., 2011](#)).

A utilização de cianobactérias para a produção de etanol apresenta como vantagem o fato desses micro-organismos possuírem a capacidade de realizar fermentação de forma natural, sem a necessidade da adição de culturas de leveduras, como ocorre em processos fermentativos de culturas energéticas tradicionais ([Palinska & Krumbein, 2000](#); [Gonzalez-Fernandez et al., 2012](#)). Não obstante, a produção de gás hidrogênio utilizando cianobactérias também constitui uma fonte

de energia alternativa para um futuro no qual a disponibilidade de combustíveis fósseis será limitada ([Dutta et al., 2005](#); [Abed et al., 2009](#)). Desse modo, as cianobactérias representam um sistema promissor para a produção de biocombustíveis e, embora melhorias sejam ainda requeridas, principalmente por meio de engenharia genética, a produção de biocombustíveis a partir de cianobactérias oferece potenciais vantagens sobre o sistema de produção agrícola ([Li et al., 2008](#)).

A presença de um ciclo incomum do TCA em cianobactérias gera uma perspectiva interessante para a engenharia genética visando aplicações biotecnológicas, uma vez que quando comparadas a eucariontes fototróficos, as cianobactérias não apresentam compartimentalização celular, o que as tornam particularmente adequadas para a utilização nesses processos. Em adição, e voltando-se a uma perspectiva mais metabólica, parece razoável assumir que a engenharia metabólica deva concentrar-se na introdução de vias que levam a novos produtos e/ou a melhoria de rendimento, produtividade e fisiologia celular em geral. Assim, a quantificação de fluxos metabólicos é aparentemente um pré-requisito crucial para dirigir o substrato ao produto desejado. Neste contexto, as grandes quantidades de sequências de dados acumulados de procariontes e eucariontes, juntamente com o aumento de dados gerados por abordagens “ômicas” proporcionam novas oportunidades para o estudo da evolução molecular e seu impacto fisiológico, não apenas de enzimas individuais, mas também de vias metabólicas em um contexto mais amplo do metabolismo celular ([Steinhauser et al., 2012](#)).

Tomados em conjunto, verifica-se um grande potencial no uso de cianobactérias com vistas a aplicações biotecnológicas. Contudo, pouco ou nada se sabe acerca da variação natural entre diferentes cepas de cianobactérias no que diz respeito ao seu metabolismo de forma geral. O presente trabalho objetivou, portanto, descrever uma caracterização fisiológica e metabólica detalhada em cepas de cianobactérias disponíveis na Coleção de Cianobactérias e Microalgas (CCM) presente no Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Ademais, pretendeu-se também avaliar se as relações morfológicas entre as espécies se mantêm ao compará-las por meio de critérios fisiológicos e metabólicos. Adicionalmente, procurou-se identificar possíveis cepas que se destaquem por apresentarem uma maior expressão em vias de produção de compostos de interesse econômico e que possam ser utilizadas futuramente em processos de engenharia genética visando aplicações biotecnológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e seleção de cepas de cianobactérias

Para este trabalho foram utilizadas 18 cepas da Coleção de Cianobactérias e Microalgas (CCM) do Laboratório de Ficologia (DBV). Essas cepas foram selecionadas priorizando organismos com caracteres morfológicos distintos, de modo a contemplar as diferentes Ordens do Phylum Cyanophyta (Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales) ([Anagnostidis & Komarek, 1985](#)). As condições ambientais nas quais esses organismos estavam submetidos também foram consideradas buscando, assim, selecionar cepas de diferentes regiões geográficas.

Devido à pequena disponibilidade de cepas unicelulares na CCM foram selecionadas apenas três cepas: *Synechococcus elongatus* (PCC 7942), *Synechocystis* sp. (PCC 6803) e *Synechocystis* sp1. Em termos de cepas filamentosas homocitadas foram obtidos cinco representantes: *Phormidium* sp., *Phormidium* sp.1, *Pseudanabaena muscicola*, *Geitlerinema unigranulatum* e *Lyngbya* sp. Em relação às cepas filamentosas heterocitadas, por apresentarem uma maior diversidade em termos de caracteres morfológicos, foram utilizados dez representantes: *Anabaena* sp., *Brasilonema octagenarum*, *Calothrix* sp., *Fischerella* sp., *Gloeotrichia* sp., *Nodularia* sp., *Nostoc* sp. (PCC7120), *Nostoc* sp.1, *Stigonema* sp. e *Trichormus* sp. (Tabela 1; Figura 1).

2.2 Condições de cultivo

As culturas estoque de cada cepa foram cultivadas em sala de crescimento em frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo 40 mL meio de cultivo BG-11 ([Rippka et al., 1979](#)). Com o intuito de se manter os caracteres morfológicos normalmente observados nas cepas, optou-se por adicionar nitrogênio (N) apenas no meio de cultivo utilizado para as cepas não heterocitadas. Para a produção de inóculos, alíquotas de 2 mL foram retiradas das culturas estoque referentes a cada cepa e inoculadas em Erlenmeyers (125mL) contendo 40 mL de meio de cultivo BG-11. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro), temperatura de 24 ± 2 °C, intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e agitação constante (120 g), por um período entre 10 a 15 dias, dependendo da cepa.

2.3 Curvas de crescimento

Para identificar as diferentes fases de crescimento (lag, log e estacionária), curvas de crescimento foram realizadas. Foram utilizados frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo 40 mL de meio BG-11 e a cada um dos frascos foi inoculado 1% de biomassa (v/v). As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. As avaliações de crescimento foram realizadas por meio de contagem de células em intervalos de 24 h; registre-se, no entanto, que para a cepa *Brasilonema octagenarum*, devido ao seu crescimento lento, as avaliações foram realizadas

em intervalos de 48 h. As curvas de crescimento foram interrompidas após o quarto dia na fase estacionária. A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada a partir da fase log de cada cepa, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$TCR = \frac{\ln(n^{\circ} \text{ células final}) - \ln(n^{\circ} \text{ células inicial})}{t_f - t_o}$$

onde, ln = logaritmo do número de células, t_o = dia em que a fase log iniciou e t_f = último dia da fase log.

Tabela 1: Informações referentes às cepas utilizadas neste trabalho.

	Cepa	Registro interno	Característica morfológica	Local de amostragem
Unicelular	<i>Synechocystis</i> sp.1	CCM-UFV 039	Unicelular	Laguna Amarga Torres De Paine - Chile
	* <i>Synechocystis</i> sp. (PCC 6803)	CCM-UFV 061	Unicelular	Água doce – Califórnia/EUA
	* <i>Synechococcus elongatus</i> (PCC 7942)	CCM-UFV 044	Unicelular	Água doce – Califórnia/EUA
Filamentoso homocitado	<i>Pseudanabaena muscicola</i>	CCM-UFV 007	Filamentoso homocitado	Região de Caatinga – Norte de Minas
	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	CCM-UFV 024	Filamentoso homocitado	Área de mineração – Paracatu/MG
	<i>Phormidium</i> sp.	CCM-UFV 027	Filamentoso homocitado	Laguna Amarga Torres De Paine – Chile
	<i>Phormidium</i> sp.1	CCM-UFV 036	Filamentoso homocitado	Canaleta de posto de combustível – Viçosa/MG
	<i>Lyngbya</i> sp.	CCM-UFV 047	Filamentoso homocitado	Estufa UCP – Viçosa/MG
Filamentoso heterocitado	<i>Calothrix</i> sp.	CCM-UFV 006	Filamentoso heterocitado	Área de mineração – Paracatu/MG
	<i>Gloeotrichia</i> sp.	CCM-UFV 037	Filamentoso heterocitado	Canaleta de posto de combustível – Viçosa/MG
	<i>Anabaena</i> sp.	CCM-UFV 016	Filamentoso heterocitado	Ribeirão do Funil – Ouro Preto/MG
	<i>Trichormus</i> sp.	CCM-UFV 035	Filamentoso heterocitado	Tanque de arsênio – Viçosa/MG
	* <i>Nostoc</i> sp. (PCC 7120)	CCM-UFV 062	Filamentoso heterocitado	Paster Culture Colection – França
	<i>Nostoc</i> sp.1	CCM-UFV 020	Filamentoso heterocitado	Ribeirão do Funil – Ouro Preto/MG
	<i>Nodularia</i> sp.	CCM-UFV 030	Filamentoso heterocitado	Ribeirão do Funil – Ouro Preto/MG
	<i>Stigonema</i> sp.	CCM-UFV 033	Filamentoso heterocitado ramificado	Rio Carangola – Carangola/MG
	<i>Fischerella</i> sp.	ANT-040	Filamentoso heterocitado Ramificado	Ilha do Rei George - Antártica
<i>Brasilonema octagenarum</i>	UFV E1	Filamentoso heterocitado com ramificação falsa	Viveiro do eucalipto – Timóteo/MG	

As cepas foram selecionadas da Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Laboratório de Ficologia da UFV. Asterisco (*) denota cepas obtidas da Paster Culture Collection (PCC).

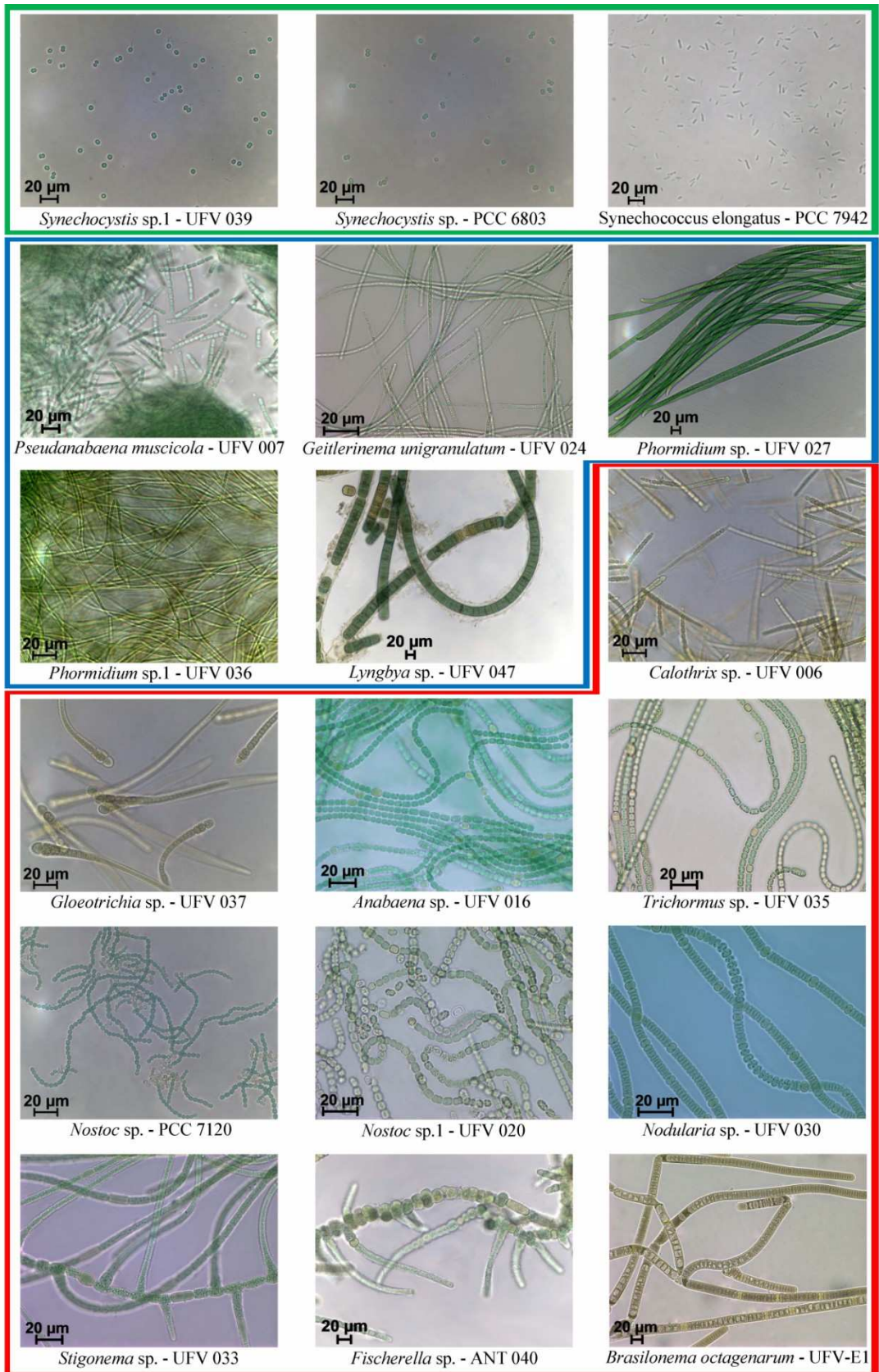


Figura 1: Imagens representativas das cepas utilizadas neste trabalho. Note que as diferentes morfologias apresentadas permitiram a seleção das cepas para as análises fisiológicas e metabólicas. Cepas unicelulares contornadas em verde, em azul, cepas filamentosas homocitadas, e, em vermelho, cepas filamentosas heterocitadas. Barras de escala representam 20 μm .

2.4 Eliminação de contaminantes bacterianos

De modo a diminuir a interferência dos contaminantes bacterianos nas avaliações de parâmetros metabólicos (descritos a seguir), as culturas foram submetidas a tratamentos com diferentes antibióticos conforme descrito previamente em detalhes ([Choi et al., 2008](#)). Em adição, foram feitas estrias sucessivas em meio sólido, lavagens em hipoclorito (3%, v/v) e adição de ciclohexamida ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando necessário.

2.5 Avaliação dos parâmetros fotossintéticos e metabólicos

As avaliações fisiológicas e metabólicas foram realizadas coletando-se amostras no dia em que as cepas atingiram a metade do período de duração da fase log. O horário de coleta para todas as avaliações foi das 8 às 12 horas da manhã.

2.5.1 Determinação das taxas de consumo e evolução de oxigênio e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Essas variáveis foram determinadas 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 ([Torzillo et al., 1998](#); [Jeon et al., 2005](#)). Foram realizadas curvas de consumo e evolução de oxigênio em resposta à irradiância, variando-se a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 0 a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) foi mensurado após aclimação das culturas por 20 minutos no escuro. A dissipação de energia por fluorescência e calor (NO), a eficiência fotoquímica do fotossistema II adaptado a luz (ΦPSII) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) foram mensuradas após a exposição das culturas a uma intensidade de luz saturante, mas não fotoinibitória ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante 5 minutos ([Mouget & Tremblin, 2002](#); [Hendrickson et al., 2004](#)).

2.5.2 Análises bioquímicas

As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , procedendo-se, *a posteriori*, as seguintes análises:

2.5.2.1 Pigmentos fotossintetizantes

Para a extração de clorofila *a* foram utilizados 2 mL de cultura de cada cepa. 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 o precipitado resultante foram armazenados a -80 °C ([Nunes-Nesi et al., 2007](#)). A concentração de clorofila *a* foi determinada espectrofotometricamente imediatamente após a extração, sendo a absorvância determinada a 665 nm ([Porra et al., 1989](#)). Para a extração de ficobiliproteínas utilizou-se 4 mL das culturas. Esse volume foi centrifugado a 11.000 g por 10 minutos e o pellet foi imediatamente ressuspensionado em 4 mL de tampão acetato de sódio (20 mM) pH 5,5. A suspensão de células obtida foi levada ao sonicador (amplitude 40% com pulsos de 5 s intercalados por intervalos de 2 s), sendo o tempo de exposição variável para cada cepa. Após o total rompimento das células foi aplicado ao extrato 100 µL de sulfato de estreptomicina 1% (p/v) e esse foi mantido a 4° C durante 30 minutos. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 11.000 g por 10 minutos. Para a determinação da concentração de ficobiliproteínas determinou-se a absorvância do sobrenadante a 565 nm (ficoeritrina), 620 nm (ficocianina) e 650 nm (aloficocianina) ([de Marsac & Houmard, 1988](#)).

2.5.2.2 Carboidratos solúveis totais

Para extração foram coletados 2 mL de cultura, volume esse que foi centrifugado a 11.000 g por 10 minutos e ressuspensionado 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 ([Masuko et al., 2005](#)).

2.5.2.3 Glicogênio

A concentração de glicogênio foi determinada conforme previamente descrito ([Ernst et al., 1984](#)). Brevemente, foram utilizados 40 mL de cultura, sendo esse volume

centrifugado a 11.000 g por 15 minutos e submetendo-se o precipitado a extração etanólica a quente, como descrito anteriormente. O pellet obtido após a extração etanólica foi lavado em 1 mL de etanol 100% (v/v) e centrifugado a 13.000 g por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado adicionando-se ao pellet 400 µL de KOH (0,2 M) homogeneizando o mesmo até a completa fragmentação. O extrato resultante foi mantido a 95° C durante 1 hora. Após esse período, o extrato foi armazenado a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente, 70 µL de ácido acético (1M) foram adicionados seguindo a homogeneização. A digestão do glicogênio foi realizada em placa de Elisa. Para tanto aplicou-se em cada poço os seguintes volumes: 80 µL de extrato, 30 µL de tampão citrato (0,3 M) pH 4,6, 10 µL de amiloglicosidade (2 unidades de reação/amostra) e 180 µL de água, completando um volume final de 300 µL. Para otimizar a reação, a placa foi acondicionada em um bloco térmico com agitação por 30 minutos a 55° C, sendo posteriormente mantida a 4° C por 5 minutos. Para determinação espectrofotométrica do glicogênio outra reação foi montada em placa de Elisa utilizando 150 µL de tampão T_{2x} contendo Imidazol (0,2 M) pH 6,9, NAD⁺ (4 mM), ATP (2 mM) e desidrogenase da glicose-6-fosfato (1 unidade /reação). Para cada reação foram utilizados 50 µL do extrato digerido (para algumas cepas foi necessário no entanto a utilização de um menor ou maior volume de extrato digerido) e o volume final completado para 300 µL. A absorvância foi determinada continuamente a 340 nm e quando essa atingiu a base de leitura aplicou-se 10 µL de hexoquinase (3 unidades/reação) continuando as leituras até nova estabilização.

2.5.2.4 Proteínas totais

Para extração de proteínas 2 mL de cultura foram centrifugados a 11.000 g por 10 minutos e ressuspensos duas vezes em água destilada. Após centrifugação 500 µL de NaOH (0,1 M) contendo 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), foram adicionados 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 ([Lowry et al., 1951](#)).

2.5.2.5 Aminoácidos totais

A concentração de aminoácidos totais foi determinada como previamente descrito ([Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008](#)). Para isso coletou-se 20 mL de cultura e centrifugou a 11.000 g por 10 minutos. O precipitado obtido foi submetido a extração etanólica a quente conforme descrito anteriormente. Por fim, montou-se uma reação em placa de Elisa, aplicando em cada poço os seguintes volumes: 50 µL de extrato etanólico, 50 µL de tampão citrato de sódio (1M) com 0,2% (p/v) ácido ascórbico pH 5,2 e 100 µL de 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.

2.5.2.6 NAD(H) e NADP(H)

As concentrações de NAD(H) e NADP(H) foram determinadas de acordo com protocolo previamente descrito ([Schippers et al., 2008](#)). De forma resumida, duas amostras de 15 mL de cada cultura foram identificadas como amostra “A” (utilizada para determinação dos nucleotídeos oxidados – NAD⁺ e NADP⁺) e amostra “B” (utilizada para determinação dos nucleotídeos reduzidos – NADH e NADPH). Os tubos foram centrifugados a 11.000 g por 20 minutos e os precipitados ressuspensos em 2 mL de água destilada e, posteriormente, transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 13.000 g por 5 minutos. Foram adicionados 400 µL de HClO₄ (0,1 M) e 400 µL de KOH (0,1M) as amostras “A” e “B”, respectivamente. Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização do precipitado e mantidos em gelo por 10 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 13.000 g a 4° C por 10 minutos, transferindo-se 200 µL do sobrenadante para um novo tubo. Posteriormente, esse volume foi incubado a 95° C por 2 minutos e transferido para gelo. Por fim, de modo a neutralizar as amostras, adicionou-se 200 µL de KOH (0,1 M)/Tris (0,2 M), pH 8.4, e 200 µL de HClO₄ (0,1 M)/Tris (0,2 M), pH 8.4, à amostra “A” e “B”, respectivamente. A determinação das concentrações de NAD⁺ (amostra “A”) e NADH (amostra “B”) foram realizadas em placa de Elisa, utilizando-se os seguintes volumes: 50 µL de meio de reação contendo Tricina (0,3 M)/KOH pH 9, Na₂EDTA (12 mM),

fenazina etosulfato (PES 0,3 mM), Brometo de azul de triazolil tetrazolito (MTT 1,8 mM), etanol (1,5 M) e desidrogenase do álcool (18 unidades/mL), 50 µL de água destilada e 50 µL de extrato “A” ou “B” (para algumas cepas foi necessário a utilização de um menor ou maior volume de extrato). A absorvância da reação foi determinada continuamente por 40 minutos a 570 nm. A determinação da concentração de NADP⁺ (amostra “A”) e NADPH (amostra “B”) foi realizada, semelhantemente, em placa de Elisa, utilizando-se 50 µL de meio de reação contendo Tricina (0,3 M)/KOH pH 9, Na₂EDTA (12 mM), fenazina metafulfato (PMS 0,3 mM), MTT (1,8 mM), glicose-6-fosfato (9 mM) e desidrogenase da glicose-6-fosfato (9 unidades /mL), 50 µL de água destilada e 50 µL de extrato “A” ou “B”. As leituras da absorvância ocorreram como descrito anteriormente.

2.5.2.7 Lipídios totais

Os lipídios totais foram extraídos da biomassa fresca ([Bligh & Dyer, 1959](#)). Para tanto, 40 mL de cultura foram centrifugados a 11.000 g com tempo variável para cada cepa. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de água destilada e centrifugado novamente. A esse precipitado obtido adicionou-se 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio, mantendo o mesmo em gelo e, a posteriori, levado para o sonicador (amplitude 40% com pulsos de 5 s intercalados por intervalos de 2 s) durante 20 minutos. Após esse período adicionou-se ao extrato 1 mL de clorofórmio colocando o mesmo novamente no sonicador por 10 minutos. Terminada essa etapa, adicionou-se ao extrato 1,8 mL de água, e após agitação procedeu-se a centrifugação a 11.000 g por 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta do tipo Paster retirou-se com cuidado a fase inferior transferindo-a para um tubo de 2 mL. Com o intuito de se remover possíveis fragmentos celulares presentes no extrato, este tubo foi centrifugado a 13.000 g por 5 minutos, sendo o extrato transferido para um novo tubo de mesmo volume e com peso aferido anteriormente (antes de ter seu peso aferido o tubo foi seco em estufa por 48 h). O extrato foi mantido a 55° C para evaporação do clorofórmio e à biomassa resultante da extração adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1 mL de água, procedendo-se a agitação e posterior centrifugação a 11.000 g por 10 minutos. A fase inferior foi novamente removida e transferida para um tubo de 2 mL, sendo centrifugada a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante combinado ao tubo que estava a 55 °C, sendo mantido nessa temperatura até total evaporação do clorofórmio. Por fim, os tubos foram deixados em estufa a 60° C aferindo-se seus pesos após 48, 72 e 96 h, de modo a obter peso constante. Para expressar os resultados em proporção de lipídios por miligrama de

massa seca, o volume obtido foi determinado, ficando entre 5 a 10 mL de cultura, que foram centrifugadas em um tubo com peso aferido a priori. O precipitado foi seco em estufa a 60° C, sendo aferido seu peso nos mesmos intervalos descritos anteriormente.

2.6 Ensaio enzimáticos

A atividade enzimática da 2-OGDC e da SSADH foram avaliadas por meio da determinação da atividade acoplada conjunta das enzimas na conversão de 2-oxoglutarato em succinato, de acordo com protocolo utilizado previamente em cianobactérias ([Zhang & Bryant, 2011](#)). Para obtenção do extrato de células lisadas, 10 mL de cultura foram centrifugados a 11.000 g por 10 minutos. O precipitado obtido foi ressuspenso em 300 µL do reagente para extração de proteínas BugBuster™ Master Mix (Novagen) e mantido sob agitação lenta durante 20 minutos, a 25° C. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 30 minutos e armazenado em gelo. Para a determinação das atividades enzimáticas em placa de Elisa, foram utilizados: 150 µL de meio de reação contendo tiamina pirofosfato (TPP 0,3 mM), DL-Ditiotreitol (DTT 1 mM), tampão fosfato de potássio 50 mM/ MgCl₂ 1 mM, pH 7,0, NADP⁺ 2 mM e 150 µL do extrato de células lisadas. A absorvância da reação foi determinada continuamente a 340 nm em intervalos de 40 s e quando essa atingiu a estabilidade aplicou-se 40 µL de 2-oxoglutarato 2 mM a cada amostra.

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi instalado e analisado segundo o delineamento em blocos casualizados (DBC), em que cada bloco era composto pelas 18 cepas com três repetições. Os dados obtidos para os parâmetros fisiológicos e metabólicos foram submetidos a análise de variância (ANOVA, $P < 0,05$), e as médias foram comparadas entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todas essas análises foram realizadas no software R versão 3.0.0. Por fim, os resultados obtidos foram submetidos a análises multivariadas, com o intuito de se avaliar como as diferentes cepas se relacionam, tomando como base os parâmetros ora determinados. A análise de componentes principais e a matriz de correlação foram realizadas no software TMEV ([Saeed et al., 2006](#)).

3. RESULTADOS

Com o intuito de se obter uma melhor visualização dos dados as 18 cepas selecionadas foram divididas em três grupos (Tabela 1; Figura 1), tomando como base

os caracteres morfológicos: (i) unicelular, composto por cepas com células solitárias representantes da ordem Chroococcales (Tabela 1; Figura 1); (ii) filamentoso homocitado, composto por cepas pertencentes a ordem Oscillatoriales, que apresentam filamentos ou tricomas contendo apenas células vegetativas (Tabela 1; Figura 1); (iii) filamentoso heterocitado, composto por cepas das ordens Nostocales e Stigonematales, caracterizadas por apresentar células vegetativas que podem se diferenciar em heterócitos e acinetos, como também exibir ramificações falsas ou verdadeiras (Tabela 1; Figura 1).

3.1 Crescimento e produção de biomassa

As cepas selecionadas exibiram padrões de crescimento distintos, refletindo diretamente no tempo de duração total das curvas de crescimento (Figura Suplementar 1). A taxa de crescimento relativo (TCR) das cepas representantes unicelulares foi estatisticamente semelhante, e bastante similar principalmente entre as cepas UFV-039 e PCC 6803, pertencentes ao gênero *Synechocystis* (Tabela 2). As cepas filamentosas homocitadas apresentaram as maiores TCR, com exceção da cepa UFV-047 (Tabela 2). As cepas UFV-036 e UFV-027, pertencentes ao mesmo gênero (*Phormidium*), apresentaram taxas de crescimento muito próximas. A cepa UFV-007 apresentou a maior taxa de crescimento entre as 18 cepas selecionadas (0,72 célula dia⁻¹) (Tabela 2).

Tabela 2: Variação natural no padrão de crescimento entre as diferentes cepas de cianobactérias utilizadas

	TCR* (número de células dia ⁻¹)	Biomassa (mg mL ⁻¹).
Unicelular		
UFV-039	0,46 ± 0,02 cde	0,43 ± 0,03 b
PCC 6803	0,47 ± 0,04 cde	0,42 ± 0,06 bc
PCC 7942	0,56 ± 0,01 bcd	0,30 ± 0,06 bcde
Filamentoso homocitado		
UFV-007	0,72 ± 0,03 a	0,17 ± 0,05 h
UFV-024	0,58 ± 0,05 abc	0,27 ± 0,06 defgh
UFV-027	0,63 ± 0,05 ab	0,26 ± 0,07 defgh
UFV-036	0,66 ± 0,03 ab	0,27 ± 0,05 defgh
UFV-047	0,30 ± 0,03 fg	0,17 ± 0,04 h
Filamentoso heterocitado		

UFV-006	0,45 ± 0,11	cdef	0,66 ± 0,07	a
UFV-037	0,51 ± 0,01	bcde	0,34 ± 0,07	bcde
UFV-016	0,55 ± 0,08	bcd	0,30 ± 0,10	defg
UFV-035	0,44 ± 0,02	cdef	0,23 ± 0,03	efgh
UFV-020	0,43 ± 0,07	cdef	0,26 ± 0,03	defgh
PCC 7120	0,45 ± 0,04	cdef	0,21 ± 0,03	fgh
UFV-030	0,41 ± 0,08	defg	0,31 ± 0,05	cdef
UFV-033	0,26 ± 0,05	g	0,22 ± 0,08	fgh
ANT-040	0,37 ± 0,03	efg	0,24 ± 0,03	efgh
UFV-E1	0,26 ± 0,01	g	0,36 ± 0,05	bcd

*Taxa de Crescimento Relativo (TCR). Valores representam a média ± desvio padrão ($n=6$). Médias seguidas por uma mesma letra dentro de cada linha não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

O grupo composto pelas cepas filamentosas heterocitadas, de maior diversidade morfológica entre os grupos descritos anteriormente, apresentou variação nas taxas de crescimento, principalmente quando comparadas cepas ramificadas e não ramificadas. Cepas com maiores similaridades morfológicas apresentaram taxas de crescimento estatisticamente semelhantes (Tabela 2).

Em termos de biomassa, as cepas unicelulares apresentaram valores similares. As cepas filamentosas homocitadas UFV-024, UFV-027 e UFV-036 não diferiram para esse parâmetro, sendo os menores acúmulos de biomassa também observados para esse grupo (0,17 mg.mL⁻¹, UFV-007 e UFV-047) (Tabela 2). O maior acúmulo de biomassa foi observado na cepa UFV-006 pertencente ao grupo composto por organismos filamentosos heterocitados, embora não tenham sido observados valores elevados de acúmulo biomassa para esse grupo. Nesse sentido, as elevadas TCR observadas em cepas unicelulares foram acompanhadas de uma maior produção de biomassa desse grupo (Tabela 2). Registre-se também que o tamanho médio das células correlacionou-se negativamente com o número máximo de células alcançado por cada cepa (Figura Suplementar 2). Nesse contexto, cepas unicelulares, por possuírem células menores, apresentaram, em média, um maior número de células ao fim das curvas de crescimento (3,08x10⁸ células), o que refletiu diretamente em uma maior produção de biomassa (Tabela 2).

3.2 Irradiâncias de compensação e saturação

A irradiância de compensação (I_c) foi bastante semelhante entre as cepas unicelulares, comportamento também observado nos organismos homocitados (Tabela 3), com maiores valores para esse último grupo. Avaliando-se as cepas heterocitadas, verificou-se que a I_c foi semelhante entre cepas de mesmo padrão morfológico, destacando-se ANT-040 e UFV-E1 como as cepas com maiores valores de I_c (51,96 e 42,70 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, respectivamente; Tabela 3). De forma distinta do observado para a I_c a irradiância de saturação (I_s) teve maior variação entre cepas de mesmo padrão morfológico (Tabela 3). Assim, embora as cepas UFV-039 e PCC 6803 pertençam ao mesmo gênero, a I_s foi bastante diferente. Entre as cepas homocitadas, apenas as cepas UFV-027 e UFV-036, apresentaram valores de I_s próximos (Tabela 3). Os organismos heterocitados apresentaram a maior variação nos valores I_s (entre 52,79 e 228,09 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$). Cumpre mencionar que as cepas que apresentaram os maiores valores de I_c (ANT-040 e UFV-E1) também apresentaram os maiores valores de I_s (Tabela 3).

Tabela 3: Variações na I_c e I_s entre as diferentes cepas de cianobactérias utilizadas

	I_c^*		I_s^*	
	$\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$			
Unicelular				
UFV-039	12,3	7 ± 2,37	c	52,21 ± 8,93 fg
PCC 6803	13,8	5 ± 3,5	c	110,48 ± 6 cd
PCC 7942	15,9	1 ± 4,02	c	58,90 ± 3 efg
Filamentoso homocitado				
UFV-007	20,9	9 ± 7,09	b	61,82 ± 5 efg
UFV-024	17,3	7 ± 4,91	b	119,72 ± 3 c
UFV-027	21,6	1 ± 3,88	b	100,6 ± 14,6 cde

UFV-036	20,9 0 ± 2,89	b c	96,18 ± 7	15,8 cde
UFV-047	20,4 1 ± 2,4	b c	43,93 ± 3,00	g
Filamentoso heterocitado				
UFV-006	13,4 0 ± 3,26	c	106,2 ± 4	27,7 3 bc
UFV-037	15,9 8 ± 4,55	c	115,10 ± 23,11	bc
UFV-016	28,8 9 ± 5,60	b	121,6 ± 5	22,1 3 bc
UFV-035	13,8 1 ± 3,49	c	92,15 ± 7	13,4 cdef
UFV-020	22,1 8 ± 7,20	b c	116,74 ± 6	25,7 c
PCC 7120	17,9 4 ± 1,25	b c	68,86 ± 11,91	def g
UFV-030	17,7 7 ± 4,61	b c	115,95 ± 2	29,6 bc
UFV-033	20,9 5 ± 0,60	b c	52,79 ± 1,12	fg
ANT-040	51,9 6 ± 5,70	a	228,0 ± 9	23,7 8 a
UFV-E1	42,7 0 ± 7	a	168,8 ± 9	24,2 2 b

* Irradiância de compensação (I_c) e Irradiância de saturação (I_s). Estatísticas conforme descrito na Tabela 2.

3.3 Parâmetros fotossintéticos e de fluorescência

A fotossíntese líquida (A) foi bastante similar, principalmente entre cepas com maior semelhança morfológica (Figura 2A). As cepas unicelulares UFV-039 e PCC 6803 exibiram A muito próximos; fato similar foi também observado para algumas cepas (UFV-027 e UFV-036) homocitadas (Figura 2A). Essa ordem também apresentou, em média, a maior A comparada aos demais grupos. Não obstante, a cepa UFV-024, também homocitada, exibiu a maior A . De forma interessante, as cepas heterocitadas apresentaram uma menor variação entre as cepas, particularmente quando comparado

aos organismos homocitados, sendo possível observar que cepas com maior semelhança morfológica apresentaram valores similares de A (Figura 2A). De forma oposta a observada para A , as cepas estudadas apresentaram maior variação em termos de respiração no escuro (R_d). Esta variação foi observada mesmo entre cepas morfológicamente semelhantes. Assim, embora as cepas unicelulares apresentassem R_d bastante semelhante, as cepas homocitadas e heterocitadas apresentaram uma maior variação (Figura 2B). Registre-se também que as cepas heterocitadas apresentaram as maiores taxas respiratórias, destacando-se a cepa ANT-040 que apresentou a maior R_d (Figura 2B).

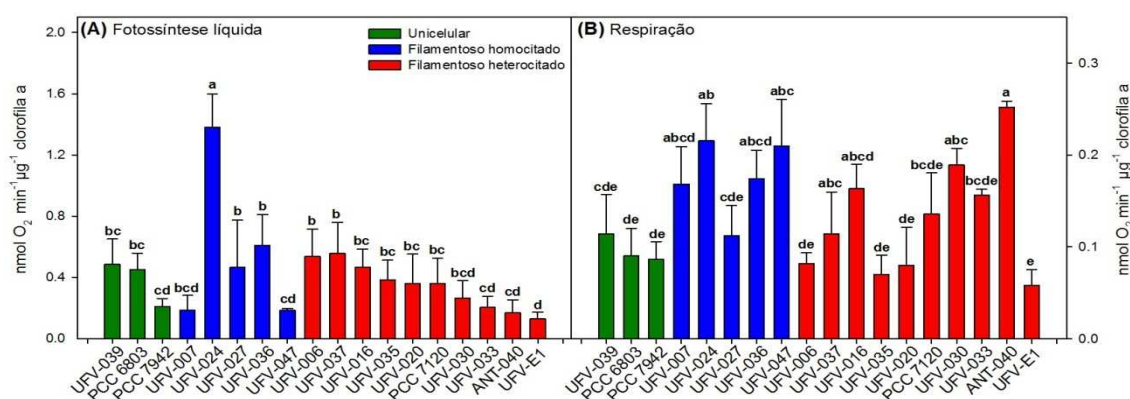


Figura 2: Caracterização fisiológica de cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) Variações nas taxas de fotossíntese líquida (A) e (B) respiração no escuro (R_d) observadas nas diferentes cepas utilizadas. Valores representam a média \pm desvio padrão ($n=6$). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Com o intuito de compreender as razões pelas quais grandes variações em A foram observadas, parâmetros de fluorescência foram determinados. Pequenas variações em F_v/F_m entre as cepas unicelulares (0,73 a 0,77) e homocitadas (0,64 a 0,78) foram observadas; ademais, as cepas unicelulares apresentaram, em média, os maiores valores de F_v/F_m . Por outro lado, o grupo composto por organismos heterocitados apresentou uma maior oscilação desse parâmetro (0,24 a 0,77), com destaque para as cepas que possuem filamentos ramificados (UFV-033, ANT-040 e UFV-E1) que apresentaram os menores valores de F_v/F_m (Figura 3A). A Φ PSII se mostrou relativamente elevada nas cepas unicelulares (Figura 3B). Os maiores valores de Φ PSII foram observados nas cepas UFV-047 e UFV-007 (0,64 e 0,66, respectivamente), ambas homocitadas (Figura 3B). As cepas heterocitadas apresentaram os menores valores de Φ PSII, com destaque para as cepas com filamentos ramificados (Figura 3B). Em geral, as cepas não

ramificadas apresentaram maiores valores de Φ PSII (Figura 3B, Figura Suplementar 3). A *NO* apresentou-se semelhante entre as cepas unicelulares (Figura 3C). As cepas UFV-047 e UFV-007, ambas homocitadas, apresentaram os menores valores de *NO* (Figura 3C). Interessantemente, o grupo composto por cepas heterocitadas apresentou os maiores valores de *NO*, observados principalmente nas cepas com filamentos ramificados (Figura 3C, Figura Suplementar 4). De forma semelhante à observada para a Φ PSII, os valores de ETR apresentaram os maiores valores para as cepas homocitadas e os menores, principalmente, nas cepas heterocitadas ramificadas (Figura 3D, Figura Suplementar 5).

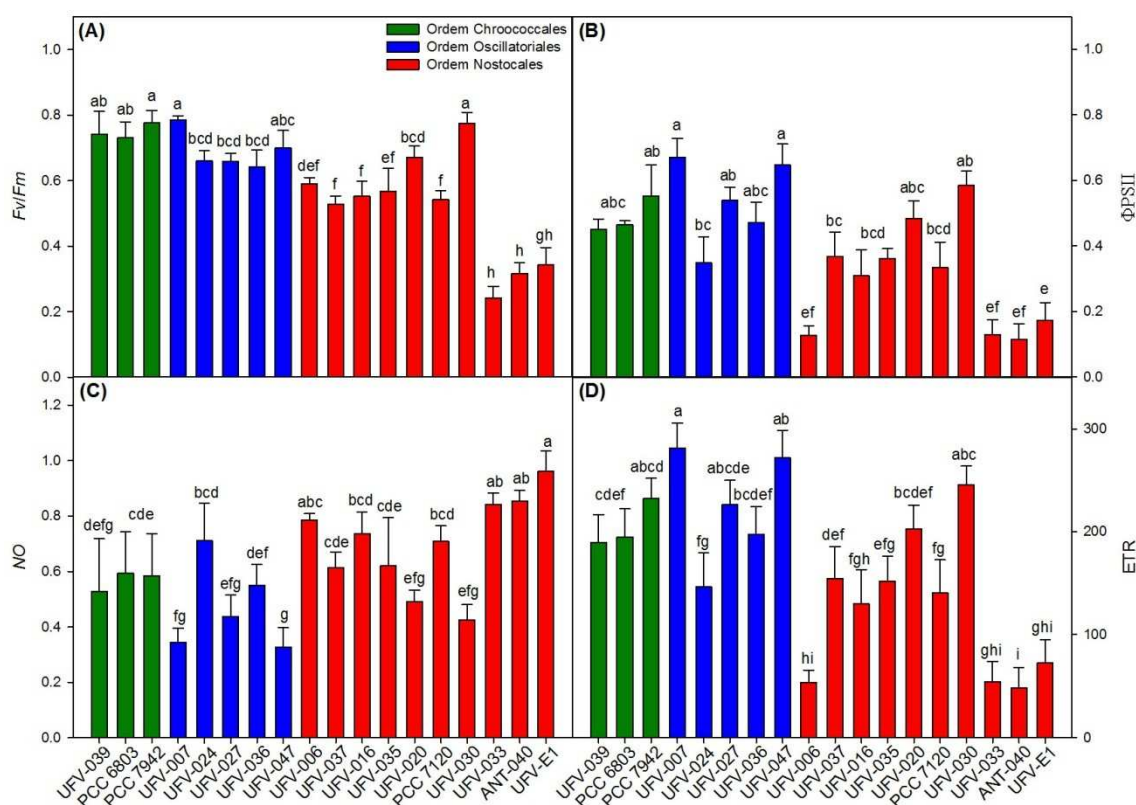


Figura 3: Caracterização dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) Rendimento máximo do fotossistema II (F_v/F_m); (B) Eficiência fotoquímica do fotossistema II adaptado a luz (Φ PSII); (C) Dissipação de energia por fluorescência e calor (*NO*); (D) Taxa de transporte de elétrons (ETR). Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

3.4 Alterações metabólicas em resposta a variações morfológicas em cepas de cianobactérias

Em função dos resultados observados para as análises de trocas gasosas (Figura 2) e parâmetros de fluorescência (Figura 3), uma extensiva análise metabólica foi realizada e é descrita a seguir.

3.4.1 Pigmentos

As concentrações de clorofila *a* se mostraram bastante similares entre as cepas unicelulares (Figura 4A). Em contra partida observou-se diferenças nas concentrações de clorofila *a* entre as cepas homocitadas. Destaca-se que a cepa UFV-024 apresentou a menor concentração de clorofila *a* entre as cepas selecionadas (Figura 4A). Entre as cepas heterocitadas os valores se mostraram semelhantes, principalmente entre cepas com maior similaridade morfológica (Figura 4A). Assim, as cepas UFV-035 e PCC 7120 apresentaram as maiores concentrações de clorofila entre as cepas selecionadas (Figura 4A).

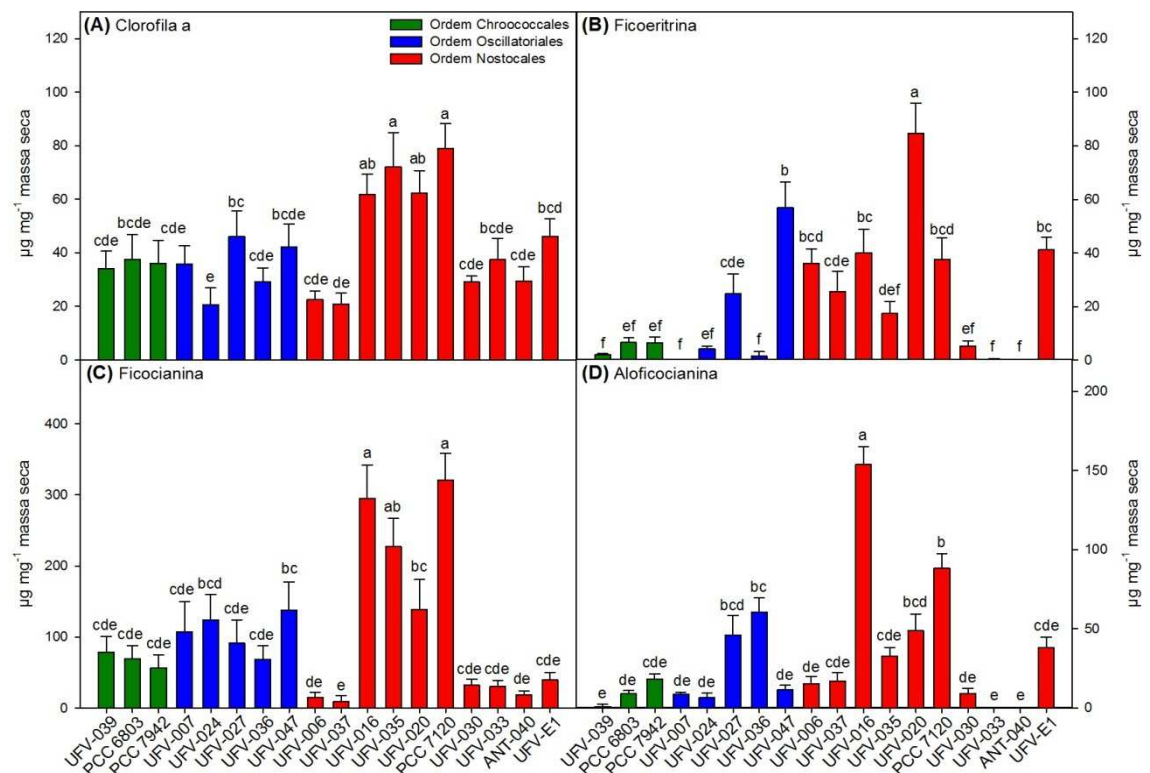


Figura 4: Caracterização das concentrações de pigmentos de cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) Clorofila *a*; (B) ficoeritrina; (C) ficocianina; (D) aloficocianina. Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

Dentre as ficobiliproteínas, a ficoeritrina apresentou as menores concentrações para grande parte das cepas (Figura 4B). Nesse contexto, baixas concentrações de ficoeritrina foram detectadas nas cepas unicelulares, quando comparado às cepas filamentosas (Figura 4B). Nas cepas homocitadas foi observada uma grande variação nas concentrações desse pigmento, mesmo em cepas pertencentes ao mesmo gênero (UFV-027 e UFV-036; Figura 4B). Registre-se também que a ficoeritrina não foi detectada na cepa UFV-007. Entre as cepas heterocitadas também se observou grande

variação na concentração desse pigmento (Figura 4B). Assim, embora a cepa UFV-020 apresentou a maior concentração, nas cepas UFV-033 e ANT-040 não foram detectadas concentrações significativas de ficoeritrina. De forma interessante, a ficoeritrina se apresentou como o pigmento de maior concentração nas cepas UFV-006 e UFV-037 (Figura 4B). A ficocianina foi o pigmento de maior abundância em grande parte das cepas (Figura 4C). Registre-se também que os valores de ficocianina se mostram bastante semelhantes entre as cepas dentro de cada grupo, para as unicelulares e homocitadas. Nesses grupos as cepas de mesmo gênero (UFV-039 e PCC 6803; UFV-027 e UFV-036, respectivamente) apresentaram valores muito próximos de ficocianina (Figura 4C). Por outro lado, grandes variações para a concentração de ficocianina foram observadas entre as cepas heterocitadas, observando-se as maiores concentrações (UFV-016 e PCC 7120), como também a menor (UFV-006). Cumpre mencionar também que a concentração de ficocianina se mostrou semelhante entre cepas com maior similaridade morfológica (Figura 4C). Baixas concentrações de aloficocianina foram detectadas nos representantes unicelulares (Figura 4D), sendo que sua concentração pouco variou entre as cepas. De forma oposta, dentre as cepas homocitadas uma grande variação nas concentrações de aloficocianina foi observada (Figura 4D). Semelhantemente, grande variação na concentração de aloficocianina pôde também ser observada entre as cepas heterocitadas (Figura 4D). Salienta-se assim, que embora a maior concentração de aloficocianina tenha sido observada na cepa UFV-016, não foram detectadas concentrações significativas desse pigmento nas cepas UFV-033 e ANT-040, ambas cepas heterocitadas ramificadas (Figura 4D). Não obstante, as cepas heterocitadas apresentaram, em média, as maiores concentrações desses pigmentos (Figura 4).

3.4.2 Proteínas e aminoácidos totais

De forma geral, verificou-se que as concentrações de proteínas apresentaram uma pequena variação entre as cepas analisadas, afirmativa essa particularmente válida para as cepas unicelulares e homocitadas (Figura 5A). Comparativamente, as cepas heterocitadas apresentaram uma maior variação nas concentrações de proteínas, mesmo em cepas com maior semelhança morfológica (Figura 5A). Registre-se que embora a maior concentração de proteínas tenha sido observada na cepa UFV-024 e a menor na cepa UFV-E1 (Figura 5A), essa diferença foi sobretudo pequena (pouco mais de 3 vezes).

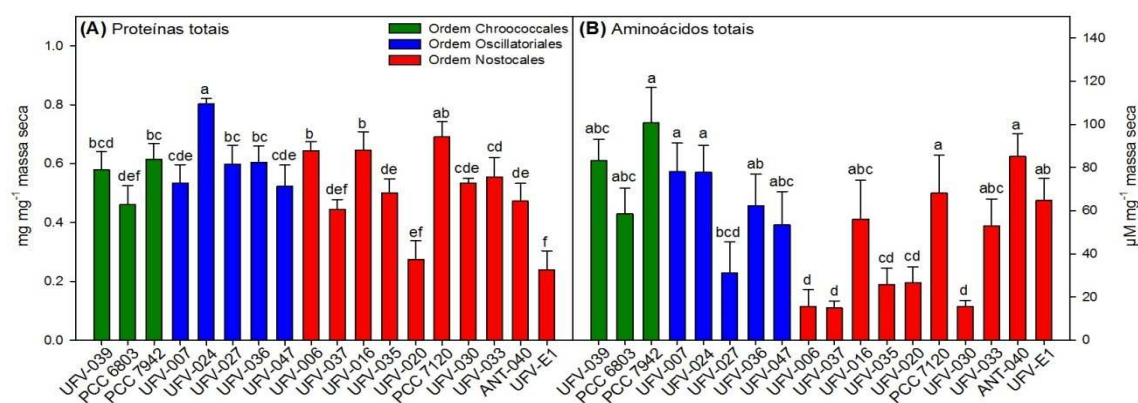


Figura 5: Caracterização das concentrações de proteínas e aminoácidos em cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) Proteínas totais e (B) aminoácidos totais. Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

De forma interessante, as concentrações de aminoácidos apresentaram uma maior variação quando comparado às proteínas totais (Figura 5B). Nesse contexto, embora as cepas unicelulares e homocitadas apresentem valores relativamente similares de aminoácidos totais, entre as cepas heterocitadas uma maior oscilação nas concentrações de aminoácidos foi verificada. Saliente-se também que as menores concentrações de aminoácidos totais foram observadas em cepas desse grupo (UFV-006, UFV037 e UFV-030) (Figura 5B). Em geral, as cepas homocitadas apresentaram as maiores concentrações de proteínas totais e as unicelulares de aminoácidos totais.

3.4.3 Carboidratos solúveis totais e glicogênio

As concentrações de carboidratos solúveis totais variaram, em geral, pouco entre as cepas selecionadas (Figura 6A). Assim, concentrações semelhantes para esses carboidratos foram observados para as cepas unicelulares e homocitadas (Figura 6A). Cumpre mencionar que neste último grupo foi observado, na cepa UFV-024, a menor concentração de carboidratos (Figura 6A). Registre-se também que a maior variação observada nas cepas heterocitadas pode ser atribuída, em grande parte, as elevadas concentrações encontrada nas cepas UFV-E1 e UFV-020 (Figura 6A).

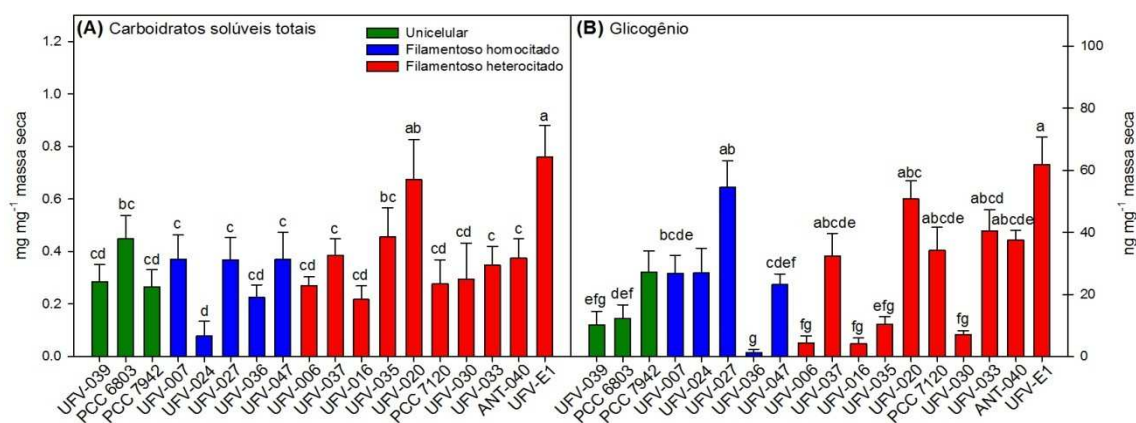


Figura 6: Caracterização das concentrações de carboidratos solúveis totais e glicogênio em cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) Carboidratos solúveis totais e (B) glicogênio. Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

De forma oposta à observada anteriormente, as concentrações de glicogênio apresentaram uma maior variação entre as cepas (Figura 6B) e, assim, variações nas concentrações foram observadas nos três grupos. Entre as unicelulares, embora as concentrações encontradas nas cepas do gênero *Synechocystis* (UFV-039 e PCC 6803) foram semelhantes, diferiram significativamente do observado para a cepa PCC 7942 (Figura 6B). De maneira interessante, nas cepas homocitadas, enquanto a cepa UFV-036 apresentou a menor concentração de glicogênio, uma elevada concentração desse carboidrato de reserva foi observada para a cepa UFV-027, pertencente ao mesmo gênero (Figura 6B), as demais cepas desse grupo apresentaram concentrações semelhantes estatisticamente (Figura 6B). Adicionalmente, as cepas heterocitadas apresentaram grande oscilação nos teores de glicogênio (Figura 6B), embora tenha sido possível identificar similaridades entre algumas cepas com maior semelhança morfológica, como observado para as cepas ramificadas UFV-033 e ANT-040, e para as não ramificadas UFV-016 e UFV-035. Como observado para os carboidratos solúveis totais, a cepa UFV-E1 apresentou a maior concentração de glicogênio entre as demais cepas (Figura 6B).

3.4.4 Lipídios totais

As concentrações de lipídios totais foram estatisticamente semelhantes entre as cepas unicelulares (Figura 7). Em adição, as cepas homocitadas também apresentaram valores similares, exceção feita à cepa UFV-027, na qual a menor concentração de lipídios totais foi observada. Nas cepas heterocitadas semelhanças estatísticas entre grande parte das cepas avaliadas foi observada, principalmente entre aquelas com

maiores similaridades morfológicas (Figura 7). Saliente-se aqui, que esse grupo também apresentou, em média, os maiores concentrações de lipídios totais com a cepa ANT-040 apresentando o maior teor de lipídios totais (Figura 7).

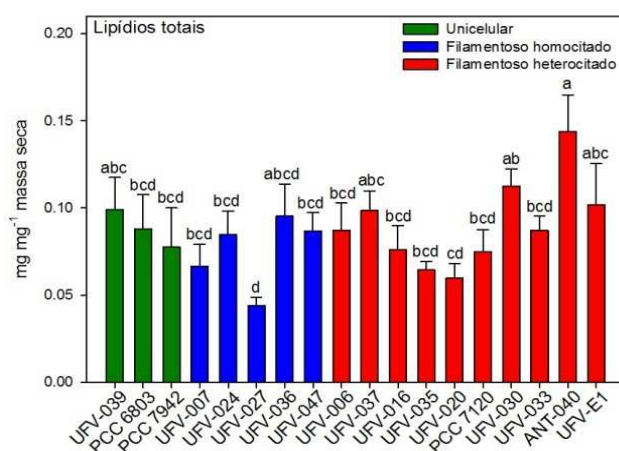


Figura 7: Caracterização das concentrações de lipídios totais em cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

3.4.5 Produtividade diária

Os valores de produtividade diária foram obtidos dividindo as concentrações de biomassa total, carboidratos totais, proteínas totais e lipídios totais (Figura 5, Figura 6, Figura 7) pelo número de dias de cultivo necessário para que cada cepa atingisse metade do período de duração da fase log (Tabela Suplementar 1). Ao se analisara produtividade diária de biomassa as cepas unicelulares apresentaram, em média, a maior produtividade diária, com pouca, ou nenhuma, diferença estatística entre as cepas dentro desse grupo (Figura 8A). Já entre as cepas homocitadas foi observada uma maior variação na produtividade diária de biomassa. Adicionalmente, grande parte das cepas heterocitadas apresentaram uma produtividade diária de biomassa semelhante e, assim, a cepa UFV-006 apresentou a maior produtividade diária ao passo que as cepas ramificadas (UFV-033, ANT-040 e UFV-E1) se destacaram pela menor produtividade diária de biomassa (Figura 8A). A produtividade diária de carboidratos solúveis totais apresentou uma pequena variação entre as cepas unicelulares, sendo também observado, em média, a maior produtividade em cepas desse grupo (Figura 8B). Entre as cepas homocitadas também foi observada uma pequena variação, principalmente devido à baixa produtividade observada na cepa UFV-024. Nas cepas heterocitadas verificou-se maior produtividade com a cepa UFV-020 (Figura 8B). Cumpre registrar que variações

mesmo entre cepas com maior semelhança morfológica foram observadas, entretanto, as cepas ramificadas apresentaram produtividade estatisticamente semelhante (Figura 8B).

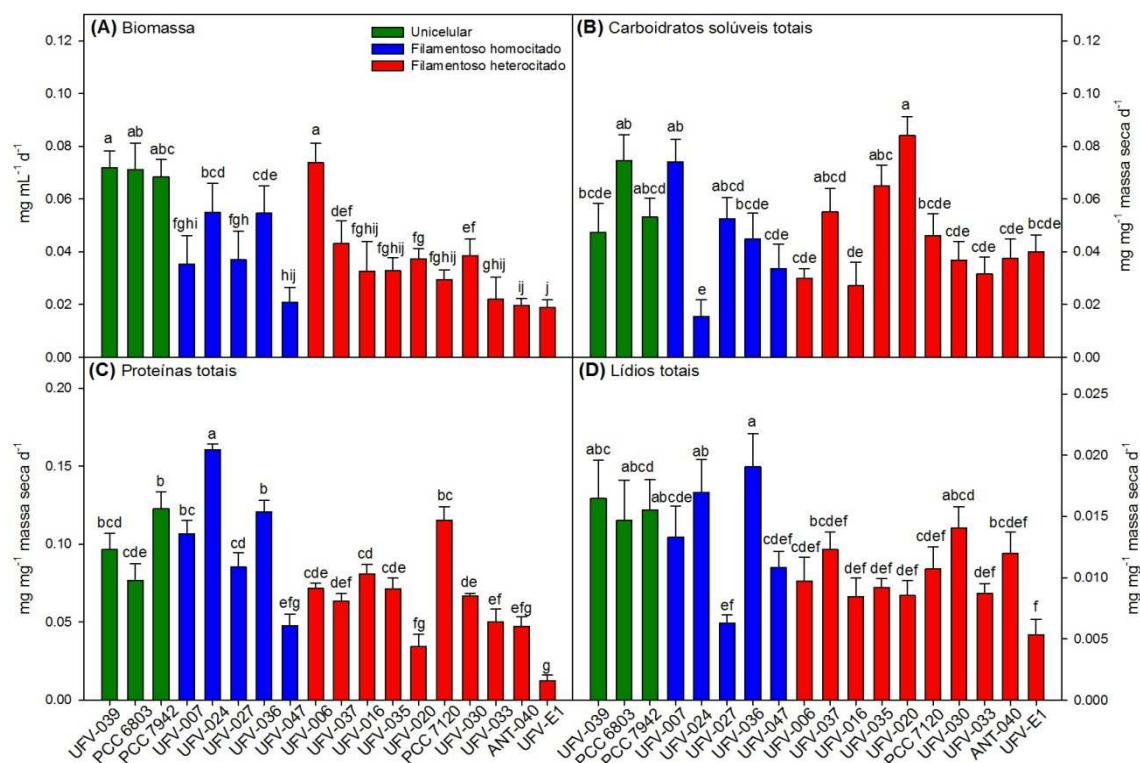


Figura 8: Caracterização das produtividades diárias em cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) Produtividade diária de biomassa; (B) produtividade diária de carboidratos solúveis totais; (C) produtividade diária de proteínas totais; (D) produtividade diária de lipídios totais. Os valores foram obtidos dividindo a concentração total pelo número de dias de cultivo de cada cepa. Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

A produtividade diária de proteínas totais foi variável entre as cepas analisadas (Figura 8C). As cepas unicelulares apresentaram uma pequena variação, principalmente pela maior produtividade observada em PCC 7942 (Figura 8C). As cepas homocitadas apresentaram, em média, a maior produtividade diária de proteínas. Ademais, dentro desse grupo as concentrações variaram entre as cepas, sendo observada para a cepa UFV-024 a maior produtividade (Figura 8C). A produtividade diária de proteínas nas cepas heterocitadas se mostrou bastante semelhante, principalmente entre as cepas com maior similaridade morfológica. A menor produtividade entre todas as cepas selecionadas foi observada na cepa UFV-E1 (Figura 8C). As cepas unicelulares apresentaram também, em média, a maior produtividade de lipídios, sendo os valores estatisticamente semelhantes entre as três cepas selecionadas (Figura 8D). No grupo das

cepas homocitadas, embora algumas cepas apresentaram valores semelhantes de produtividade de lipídios, verificou-se que a cepa UFV-036 apresentou a maior produtividade, e a UFV-027, pertencente ao mesmo gênero, baixa produtividade diária de lipídios (Figura 8D). Para o grupo das cepas heterocitadas não foram observadas diferenças entre a maioria das cepas, sendo a menor produtividade diária de lipídios na cepa UFV-E1 (Figura 8D).

3.4.6 Concentrações de nucleotídeos de piridina

Para todas as cepas analisadas, as concentrações de nucleotídeos de piridina oxidados (NAD^+ e NADP^+) foram maiores que as de reduzidos (NADH e NADPH ; Figura 9). As concentrações de NAD^+ apresentaram pequenas variações entre as cepas unicelulares e homocitadas (Figura 9A). Cumpre mencionar, no entanto, que as cepas homocitadas UFV-024 e UFV-047, juntamente com as cepas heterocitadas PCC 7120 e ANT-040, apresentaram as maiores concentrações de NAD^+ (Figura 9A). Entre as demais cepas heterocitadas pequenas diferenças foram observadas, principalmente entre cepas de menor similaridade morfológica (Figura 9A). A cepa UFV-E1 apresentou a menor concentração de NAD^+ entre as demais cepas selecionadas (Figura 9A). Em relação às concentrações de NADH , as cepas unicelulares apresentaram valores estatisticamente distintos e assim, a cepa UFV-039 apresentou também a menor concentração de NADH entre as cepas selecionadas (Figura 9B). Por outro lado, as concentrações de NADH nas cepas homocitadas foram estatisticamente similares (Figura 9B). Em adição, para as cepas heterocitadas os valores oscilaram entre as cepas, sendo observado para a cepa PCC 7120 a maior concentração de NADH (Figura 9B).

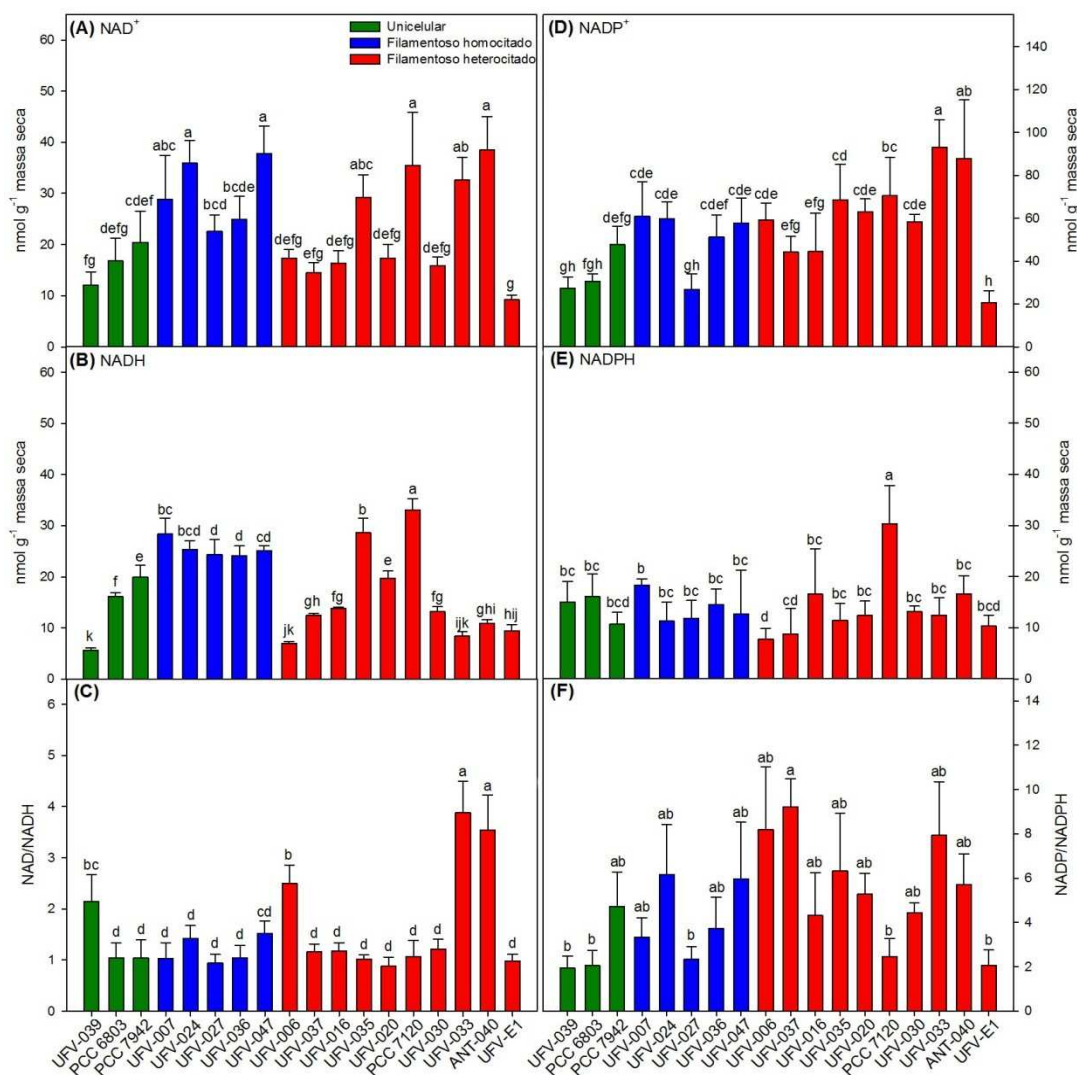


Figura 9: Caracterização das concentrações de nucleotídeos de piridina em cepas de cianobactérias pertencentes a diferentes grupos morfológicos. (A) NAD^+ ; (B) NADH ; (C) NADP^+ ; (D) NADPH . Variações nas diferentes cepas utilizadas. Estatísticas conforme descrito na Figura 2.

De forma bem interessante os valores da razão NAD^+/NADH apresentaram uma pequena variação entre todas as 18 cepas, sendo observado para grande parte dessas cepas valores próximos a 1. Por outro lado os maiores valores ($\text{NAD}^+/\text{NADH} \approx 4$) foram observados nas cepas ramificadas UFV-033 e ANT-040 (Figura 9C). Dentre as quatro nucleotídeos quantificadas as maiores concentrações foram observadas para NADP^+ (Figure 9D). Ademais, as cepas unicelulares apresentaram valores semelhantes, principalmente entre as cepas UFV-039 e PCC 6803. As cepas homocitadas também apresentaram semelhança entre as cepas, exceto para a cepa UFV-027 (Figura 9D). As cepas heterocitadas, por outro lado, apresentaram maiores variações quando comparado aos outros dois grupos. Assim, os maiores valores de NADP^+ foram observados nas

cepas ramificadas UFV-033 e ANT-040 e o menor na cepa UFV-E1 (Figura 9D). As concentrações de NADPH pouco variaram entre as 18 cepas, sendo observada a maior concentração para a cepa PCC 7120 e a menor para a UFV-006, ambas heterocitadas (Figura 9E). A razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ apresentou uma maior oscilação entre cepas de mesmo grupo quando comparado a razão NAD^+/NADH , oscilação essa observada principalmente nas cepas filamentosas. As elevadas concentrações de NADP^+ resultaram em valores elevados da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, com médias entre 1,93 e 9,22 (Figura 9F).

3.5 Atividade enzimática acoplada conjunta da OGDC e SSADH

Em função da natureza única do ciclo TCA em cianobactérias, procedeu-se a avaliação da reação completa da conversão de 2-oxoglutarato em succinato (Tabela 4), que se mostrou bastante variável entre as cepas utilizadas.

Tabela 4: Variação na atividade acoplada conjunta da 2-OGDC e da SSADH (conversão de 2-oxoglutarato em succinato) nas diferentes cepas selecionadas.

	Atividade enzimática*	
Unicelular	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	
	0,9	
UFV-039	5 ± 0,31	f
	0,9	
PCC 6803	8 ± 0,28	f
	1,3	
PCC 7942	7 ± 0,43	def
Filamentoso homocitado		
	3,3	
UFV-007	2 ± 1,08	b
	2,6	
UFV-024	4 ± 0,91	bcd
	1,5	
UFV-027	1 ± 0,32	cdef
	1,0	
UFV-036	9 ± 0,33	f
	0,9	
UFV-047	5 ± 0,22	f

Filamentoso heterocitado

UFV-006	0,1 8 ± 0,22	f
UFV-037	0,4 0 ± 0,04	f
UFV-016	3,7 7 ± 1,19	b
UFV-035	2,8 2 ± 0,88	bc
UFV-020	2,5 0 ± 0,41	bcd e
PCC 7120	5,2 2 ± 0,95	a
UFV-030	0,6 2 ± 0,20	f
UFV-033	2,6 9 ± 1,07	bcd
ANT-040	3,8 5 ± 0,69	b
UFV-E1	1,2 2 ± 0,38	ef

*Atividade enzimática. Estatísticas conforme descrito na Tabela 2.

Ao se analisar as cepas unicelulares observou-se que as mesmas apresentaram valores de atividade enzimáticas semelhantes, principalmente nas cepas do gênero *Synechocystis*, UFV-039 e PCC 6803 (Tabela 4). Apesar disso, nas cepas homocitadas verificou-se uma maior variação nos valores de atividade enzimática (Tabela 4). Entre as cepas heterocitadas nota-se que cepas com morfologias similares apresentaram valores de atividades enzimáticas estatisticamente semelhantes, sendo que a maior atividade entre as demais cepas selecionadas foi observado em PCC 7120 (Tabela 4). Ressalta-se que as cepas heterocitadas destacaram-se por exibir, em média, a maior atividade das enzimas do ciclo TCA.

3.6 Análises Multivariadas

3.6.1 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais revelou que os dois primeiros componentes explicaram aproximadamente 80% das variações apresentadas pelas cepas. Observou-se também que grande parte das cepas apresentou um agrupamento semelhante com o que se observa para as ordens taxonômicas (Figura 10).

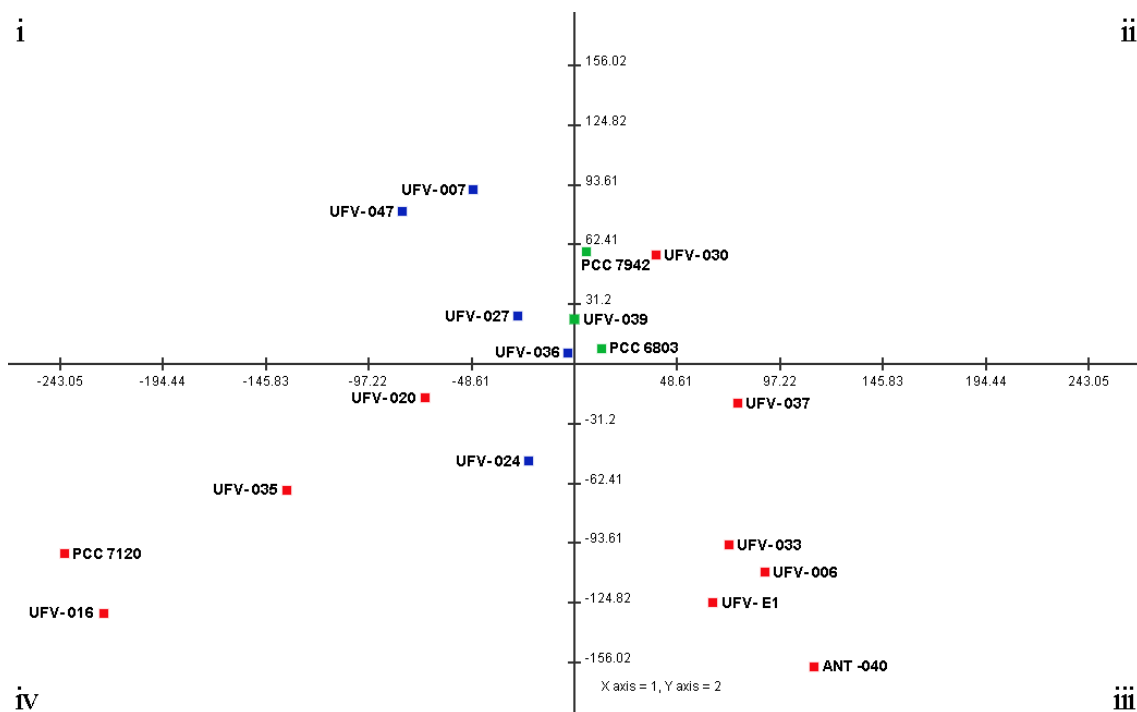


Figura 10: Agrupamento das diferentes cepas selecionadas após avaliação dos parâmetros fisiológicos, metabólicos e de crescimento por meio da análise de componentes principais realizada no software TMEV. Cepas unicelulares (quadrados verdes), cepas filamentosas homocitadas (quadrados azuis) e cepas filamentosas heterocitadas (quadrados vermelhos).

Assim, as cepas unicelulares se posicionaram juntas, e com uma relativa maior proximidade entre as cepas do gênero *Synechocystis* (UFV-039 e PCC 6803) quando comparado à cepa PCC 7942, pertencente ao gênero *Synechococcus* (Figura 10). Quatro cepas filamentosas homocitadas se posicionaram em conjunto (UFV-007, UFV-027, UFV-036 e UFV-047) e, embora a cepa UFV-024 tenha se posicionado em outro quadrante (“iii”), esta se manteve relativamente próxima das demais (Figura 10). Como observado anteriormente para as cepas do gênero *Synechocystis*, as cepas UFV-027 e UFV-036, pertencentes ao gênero *Phormidium*, apresentaram maior proximidade quando comparado às outras cepas homocitadas (Figura 10). As cepas heterocitadas que foram selecionadas para esse trabalho apresentam uma maior diversidade em termos de morfologia, quando comparado aos outros dois grupos (Figura 1). Nesse contexto, foi possível observar a separação das cepas em dois grandes grupos, cada um ocupando um

quadrante diferente. As cepas não ramificadas com heterócitos intercalares (UFV-016, UFV-035 e UFV-020 e PCC 7120) ficaram localizadas no quadrante “iv”, com exceção da cepa UFV-030 que se posicionou no quadrante “ii”, bem distante das outras quatro. Não obstante, as cepas com filamentos ramificados (UFV-033, ANT-040 e UFV-E1) ou com filamentos contendo apenas um heterócito basal (UFV-006 e UFV-037) ficaram localizadas no quadrante “iii” (Figura 10). Embora não necessariamente nessa ordem de importância, as variáveis I_c , A , os parâmetros de fluorescência F_v/F_m e NO , as ficobiliproteínas ficoeritrina e aloficocianina, glicogênio, os nucleotídeos NAD^+ e $NADH$ e a atividade acoplada conjunta das enzimas do ciclo TCA foram as que mais contribuíram para a separação das cepas em diferentes quadrantes (Figura Suplementar 6). Cumpre ressaltar que as variáveis relacionadas com produção de biomassa, TCR, R_d , os pigmentos clorofila a e ficocianina, proteínas totais, aminoácidos totais, carboidratos solúveis totais e as concentrações de $NADP^+$ e $NADPH$ também contribuíram, mas em uma menor proporção para o agrupamento das cepas (Figura Suplementar 6). Em adição, as variáveis I_s , ETR, conteúdo de lipídios totais e a produtividade diária de biomassa, carboidratos, proteínas e lipídios pouco, ou nada, influenciaram no agrupamento das cepas nos diferentes quadrantes (Figura Suplementar 6).

3.6.2 Correlação entre as variáveis analisadas

A partir da geração de uma matriz de correlação foi possível observar como cada um dos parâmetros obtidos se correlacionou com os demais (Figura 11). Com relação aos parâmetros de crescimento, a TCR se correlacionou positivamente com algumas variáveis, como número máximo de células que cada cepa atingiu ao fim das curvas de crescimento, A , F_v/F_m , ETR e com o acúmulo diário de lipídios (Figura 11). Por outro lado, apresentou uma correlação negativa com I_c , NO e com o conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios totais (Figura 11). Já a produtividade diária de biomassa correlacionou-se negativamente com I_c , R_d , clorofila, carboidratos solúveis totais, glicogênio, NAD^+ , $NADH$ e com a atividade das enzimas do ciclo TCA (Figura 11).

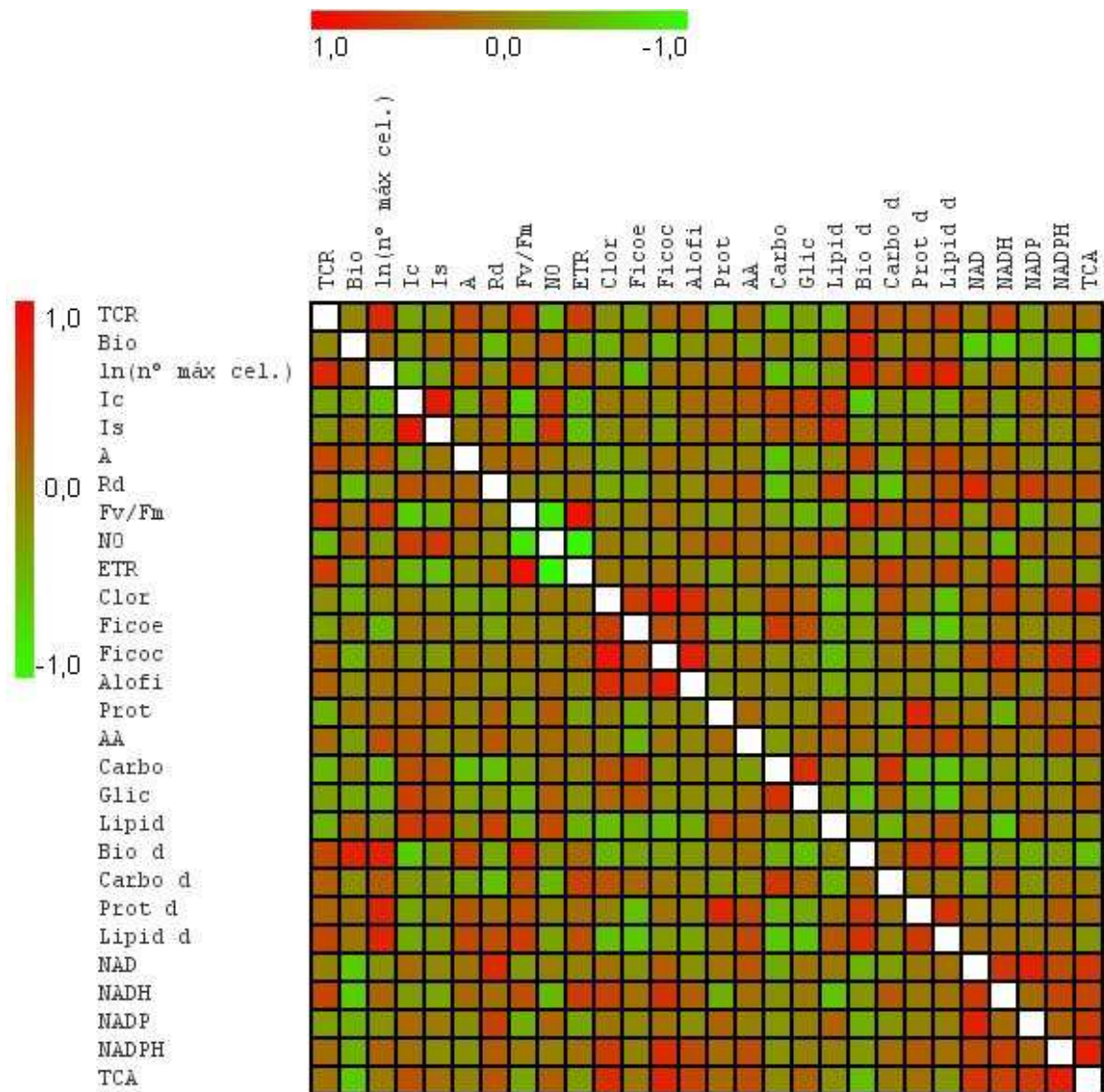


Figura 11: Matriz de correlação obtida a partir dos parâmetros fotossintéticos, metabólicos e de crescimento determinados nas diferentes cepas selecionadas. Vermelho: correlação positiva; Verde: correlação negativa. Abreviaturas: TCR – Taxa de crescimento relativo; Bio – Biomassa total; ln(n° máx cel.) - Número máximo de células que cada cepa atingiu ao fim das curvas de crescimento; I_c – Irradiância de compensação; I_s – Irradiância de saturação; A – Fotossíntese líquida; R_d – Respiração no escuro; F_v/F_m - Rendimento quântico máximo do fotossistema II; NO - Dissipação de energia por fluorescência e calor; ETR - Taxa de transporte de elétrons; Clor – Clorofila a ; Ficoe – Ficoeritrina; Ficoc - Ficocianina; Alofi – Aloficocianina; Prot - Proteínas totais; AA – Aminoácidos totais; Carbo – Carboidratos solúveis totais; Glic – Glicogênio; Lipid – Lipídios; Bio d – Produtividade diária de biomassa; Carbo d – Produtividade diária de carboidratos solúveis totais; Prot d – Produtividade diária de proteínas; Lipid d – Produtividade diária de lipídios; TCA - atividade acoplada conjunta das enzimas 2-OGDC e SSADH.

Em adição, a produtividade diária de biomassa apresentou correlação positiva com A , F_v/F_m e com a produtividade diária de proteínas e lipídios (Figura 11).

Surpreendentemente não foi observada correlação significativa entre A e os parâmetros de fluorescência (Figura 11). Por outro lado, A exibiu correlação positiva com a produtividade diária de biomassa e lipídios, e correlação negativa com a I_c e com o acúmulo de carboidratos solúveis totais (Figura 11). R_d exibiu correlação negativa com a biomassa total e com o conteúdo de carboidratos solúveis totais (Figura 11). Por outro lado R_d apresentou correlação positiva com o conteúdo de lipídios e com a concentração de NAD^+ e $NADP^+$ (Figura 11). Destaca-se, portanto, a relação de A e R_d sobre a produtividade diária de biomassa, tendo A uma correlação positiva e R_d negativa (Figura 11, Figura Suplementar 7). Os pigmentos fotossintetizantes (clorofila a e ficobiliproteínas) se correlacionaram positivamente entre si (Figura 11). De forma interessante, o conteúdo de carboidratos solúveis totais apresentou uma elevada correlação com o conteúdo de glicogênio, e uma correlação negativa com a produtividade diária de proteínas, lipídios e biomassa (Figura 11). As concentrações de nucleotídeos (NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ e $NADPH$) se mostraram muito correlacionadas entre si em com a atividade das enzimas do ciclo TCA (Figura 11). Em suma, observa-se que parâmetros relacionados a um mesmo processo fisiológico tendem a ser mais associados entre si, como observado entre I_c , parâmetros de fluorescência e A , como também entre R_d e os nucleotídeos oxidados (NAD^+ e $NADP^+$), e desses últimos com a atividade das enzimas do ciclo TCA (Figura 11).

4. DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro a explorar como a variação natural, em termos de morfologia, pode estar relacionada a alterações no crescimento, fisiologia e metabolismo em cianobactérias. Os resultados ora obtidos permitem inferir sobre: (i) como as interações entre as concentrações de pigmentos e os parâmetros de fluorescência podem ter influenciado os valores de A ; (ii) o papel da R_d e da fixação de nitrogênio como drenos dos fotoassimilados produzidos a partir de A e (iii) o balanço coordenados desses processos metabólicos sobre a produtividade diária de biomassa, proteínas, carboidratos solúveis e lipídios. Tomados em conjunto, os resultados apresentados demonstram como a variação morfológica natural observada em cianobactérias pode ser utilizada em aplicações biotecnológicas a partir de informações de metabólitos-chave, parâmetros fisiológicos e de crescimento. Adicionalmente, ao final da discussão, possíveis cepas candidatas para diferentes aplicações serão indicadas. Em adição, utilizando os dados de componentes principais, discute-se acerca das semelhanças e diferenças observadas entre as cepas por meio dos padrões morfológicos

previamente descritos na literatura e através de uma nova abordagem utilizando parâmetros fisiológicos, metabólicos e de crescimento ora avaliados.

4.1 Fisiologia e metabolismo: aspectos associados ao crescimento e produção diária de biomassa

A luz, fonte mais importante de energia para a produção de biomassa, regula de forma significativa o crescimento em todos os organismos fotoautotróficos pela interação com sistema antena e fotossistemas ([Kwon et al., 2013](#)). Os resultados ora apresentados demonstram que cepas unicelulares apresentam, em geral, uma menor demanda por luz, particularmente ao se comparar às cepas filamentosas heterocitadas (Tabela 3). Assim, as diferentes taxas de crescimento observadas entre as cepas analisadas são possivelmente devido à diferenças na eficiência na absorção de energia luminosa e possivelmente na conversão em energia química (Tabela 3, Figura 4). Neste contexto, a coleta de luz pelas células depende da concentração de pigmentos e da secção transversal de absorção da clorofila ([MacIntyre et al., 2002](#)), esse último estando relacionado, em grande parte, com o empacotamento apresentado pelos pigmentos no complexo antena ([Tilzer, 1987](#); [MacIntyre et al., 2002](#)). Assim, quanto maior for esse empacotamento, maior será o sombreamento, reduzindo assim a eficiência de absorção de luz. Desse modo, células solitárias e pequenas tendem a coletar a luz de maneira mais eficiente do que as espécies formadoras de colônias ([Tilzer, 1987](#); [Geider et al., 1997](#); [MacIntyre et al., 2002](#)). Registre-se também que a análise detalhada dos efeitos de diferentes intensidades luminosas e qualidade da luz sobre culturas de cianobactérias sugere que o aumento da densidade celular durante o crescimento resulta em uma redução da penetração de luz na cultura, indicando uma dependência mútua entre o fornecimento de luz e densidade da cultura ([Posten, 2009](#)). Nesse contexto, pode-se inferir que a maior concentração de pigmentos observada em algumas cepas heterocitadas (Figura 4) seja uma alternativa para otimizar a absorção de luz e a produção de NADH e NADPH, o que corrobora com a correlação positiva entre os nucleotídeos reduzidos e os pigmentos clorofila e a ficocianina, visto que é comum, em algumas espécies desse grupo, a ocorrência de auto sombreamento entre os filamentos ([Helbling et al., 2006](#); [Kumar et al., 2011](#); [Page et al., 2012](#); [Kwon et al., 2013](#)). Por outro lado, em cepas unicelulares, o menor tamanho e empacotamento celular observado resulta em uma maior eficiência na absorção de luz (Tabela 3), justificando assim elevadas TCR e produtividade diária de biomassa exibidas pelas cepas desse grupo (Tabela 3, Figura 8A).

Em adição à eficiência na absorção de luz, a capacidade das cepas em utilizar eficientemente esse recurso demonstra-se como um fator de grande importância para o crescimento e produtividade, conforme verificado pelos parâmetros de fluorescência (Figura 3, Figura Suplementar 3-5), que fornecem informações acerca da eficiência da utilização da luz na fase fotoquímica e também na dissipação por calor. Desse modo, é possível observar o percentual de energia luminosa que está sendo utilizado para prover energia e poder redutor para a assimilação de CO₂ ([Baker, 2008](#); [Murchie & Lawson, 2013](#)). Importante mencionar que os menores valores de fluorescência do fotossistema II (PSII) observados em cepas heterocitadas podem estar associados à presença de heterócitos. Registre-se também que em resposta a ausência de nitrogênio no meio, com exceção das cepas que apresentam apenas um heterócito por filamento (e.g. UFV-006 e UFV-037), 5 a 10% das células do filamento se diferenciam em heterócitos, de modo a otimizar o processo de fixação de nitrogênio ([Cardona & Magnuson, 2010](#)). Nesses heterócitos diferenciados após a limitação de nitrogênio, o PSII é inativado e a quantidade relativa de fotossistema I (PSI) se torna muito maior ([Meeks et al., 2002](#); [Walsby, 2007](#); [Ow et al., 2008](#); [Cardona et al., 2009](#)). Por outro lado, observa-se também uma alteração no tamanho e composição dos ficobilissomos dessas células, acarretando uma alteração no espectro de absorção ([Black & Osborne, 2004](#)). Como um todo, esses resultados sugerem que, devido a esses fatores, os heterócitos tendem a emitir uma menor intensidade de fluorescência quando comparado às células vegetativas ([Ow et al., 2008](#); [Cardona et al., 2009](#)), justificando assim os menores valores de F_v/F_m , Φ_{PSII} e ETR e o maior NO observados nas cepas heterocitadas (Figura 3, Figura Suplementar 3-5). Desse modo, menor eficiência na utilização de luz exibida pelas cepas heterocitadas, corrobora com os menores valores de A observados nas cepas desse grupo (Figura 2), justificando assim as menores TCR e produtividade diária de biomassa observadas nessas cepas (Tabela 2, Figura 8A). Tomados em conjunto, os dados acima descritos demonstram que as cepas unicelulares e homocitadas apresentam maiores eficiência tanto na absorção quanto na utilização da luz (Tabela 3, Figura 3, Figura Suplementar 3-5), quando comparado às cepas heterocitadas. Com efeito, uma menor demanda por luz nessas cepas, como observado pelas menores I_c (Tabela 3) associada ao maior incremento nos parâmetros de fluorescência (Figura 3, Figura Suplementar 3-5) indicam um maior aproveitamento dessa energia para a promoção do crescimento e produtividade diária de biomassa. Concomitante, esses resultados, juntamente com os de crescimento (Tabela 2), sugerem que a variação em termos de crescimento e biomassa em cepas de cianobactérias não são unicamente

resultantes das diferenças morfológicas, mas, sim, fundamentalmente de limitações fotoquímicas associadas a uma baixa capacidade efetiva na absorção e utilização a luz.

As maiores concentrações de ficoeritrina, comparado aos demais pigmentos, nas cepas UFV-006 e UFV-037 (Figura 4), estão associados a alterações na eficiência de absorção e uso da luz nessas cepas, quando comparado às demais cepas heterocitadas (Tabela 3, Figura 3, Figura Suplementar 3-5), refletindo em maiores valores de A e produtividade diária de biomassa (Figura 2, Figura 8A). Nesse contexto, maiores concentrações de ficoeritrina, pigmento que absorve a energia luminosa na faixa do verde (565 nm) ([de Marsac & Houmard, 1988](#)), um espectro de maior energia que o vermelho, se traduz em uma menor demanda por luz nessas cepas (I_c) (Tabela 3). Por outro lado, principalmente a cepa UFV-006, exibiu valores reduzidos de Φ PSII e ETR associados a elevado NO (Figura 3, Figura Suplementar 3-5). Desse modo, a maior disponibilidade de energia acarretou em uma maior A e produtividade diária de biomassa nessas cepas, quando comparado as demais heterocitadas (Figura 2, Figura 8A), mesmo estas apresentando maior NO e menor Φ PSII e ETR (Figura 3, Figura Suplementar 3-5).

Os valores de A estão em acordo com o observado para os parâmetros de fluorescência. Assim, cepas unicelulares e homocitadas, que apresentaram maior eficiência na absorção e utilização de luz (Tabela 3, Figura 3), também exibiram as maiores A (Figura 2). Entretanto, ao se analisar R_d as cepas filamentosas homocitadas e heterocitadas apresentaram, em média, os maiores valores (Figura 2). Nesses grupos também foi possível observar maiores concentrações de nucleotídeos oxidados (NAD^+ e $NADP^+$) (Figura 9) e maior atividade das enzimas do ciclo TCA (Tabela 4), o que explicaria, ao menos parcialmente, maiores taxas respiratórias. Assim, uma vez que a fotossíntese é limitada tanto pela capacidade dos pigmentos antena em coletar a luz, como pelo rendimento quântico da fase fotoquímica ([Tilzer, 1987](#); [MacIntyre et al., 2002](#); [Bailey et al., 2008](#); [Eberhard et al., 2008](#); [Murchie & Lawson, 2013](#)) e ao passo que a produtividade diária de biomassa depende tanto da taxa de fixação de carbono por meio da fotossíntese, como também das perdas associadas à respiração dos fotoassimilados (Figura Suplementar 7), as diferenças no que respeita as TCR e a produtividade diária de biomassa entre as espécies seriam fundamentalmente dependentes da eficiência de crescimento líquido ou das razões entre fotossíntese bruta e respiração ([Tilzer, 1987](#); [MacIntyre et al., 2002](#); [Zhu et al., 2008](#); [Nogales et al., 2012](#)). Desse modo, a maior produtividade diária de biomassa e das demais reservas

observada, de modo geral, nas cepas unicelulares, está associada a maior A observada nessas cepas, assim como a uma menor demanda da R_d por energia (Figura 2).

A elevada R_d observada nas cepas filamentosas não se refletiu em um menor TCR e produtividade diária de biomassa para todas essas cepas, relação essa obtida apenas nas cepas filamentosas heterocitadas (Tabela 2, Figura 2 e Figura 8A). Saliente-se também que esse grupo se caracteriza por apresentar heterócitos, célula diferenciada exclusivamente para a fixação de nitrogênio (Figura 1) ([Berman-Frank et al., 2003](#); [Cardona & Magnuson, 2010](#)). Assim, em espécies de cianobactérias fixadoras de nitrogênio esse processo pode afetar sobretudo a eficiência de A devido a fatores como: (i) competição entre a fixação de nitrogênio e a assimilação de CO_2 por poder redutor, diminuindo assim a taxa de incorporação de carbono fotossintético ([Tilzer, 1987](#); [Scherer et al., 1988](#)); (ii) inativação do PSII em heterócitos, reduzindo a produção de poder redutor por restringir a fotossíntese oxigênica apenas às células vegetativas ([Ow et al., 2008](#)) e (iii) elevada taxa respiratória observada em heterócitos, propiciando um microambiente anaeróbico para a ação da nitrogenase ([Cardona et al., 2009](#)). Desse modo, pode-se inferir que a menor A observada nas cepas heterocitadas pode estar relacionada às maiores demandas de energia para a R_d e fixação de nitrogênio (Figura 2), principalmente devido fisiologia diferencial apresentada pelo heterócito, refletindo assim em uma menor TCR e produtividade diária de biomassa e das demais reservas (Tabela 2, Figura 8). De acordo com esses dados, mutantes de *Anabaena flos-aquae* com ausência de heterócitos apresentaram taxas de crescimento 50% maiores e um menor requerimento por luz, quando comparado aos filamentos heterocitados de cepas selvagens ([Zevenboom et al., 1981](#)). Por outro lado, o maior ganho diário de biomassa observado para as cepas unicelulares e filamentosas homocitadas é resultado de uma maior eficiência na absorção e uso da luz, somada a uma menor demanda de energia para a respiração e fixação de nitrogênio (Tabela 3, Figura 3, Figura 8A), principalmente nas cepas UFV-039 e PCC 6803, incapazes de fixar nitrogênio ([Böhme, 1998](#); [Li et al., 2001](#)). Salienta-se, porém que tanto a atividade quanto a expressão da nitrogenase não foram avaliadas e, embora apenas as cepas heterocitadas tenham sido cultivadas em meio de cultivo com total ausência de nitrogênio, esses resultados precisam ser interpretados com cautela e sugerem que trabalhos futuros devem também considerar esse importante aspecto metabólico.

4.2 Produção de reservas e suas possíveis aplicações biotecnológicas

Os diferentes padrões de crescimento apresentados pelas cepas resultaram em diferenças nos tempos de cultivo. Assim, ao passo que para as cepas heterocitadas entre 7 a 19 dias foram necessários para que metade do período de duração da fase log fosse alcançada, as cepas unicelulares e homocitadas atingiram essa fase em no máximo 7 e 9 dias, respectivamente (Figura Suplementar 1, Tabela Suplementar 1). Nesse contexto, os valores de produtividade diária para biomassa, carboidratos, proteínas e lipídios fornecem uma informação mais precisa sobre produtividade de cada cepa (Figura 8), do que apenas valores finais. Desse modo, ao analisar-se a produtividade diária, as cepas unicelulares apresentaram, em média, uma maior produtividade de biomassa, carboidratos e lipídios, embora maior produtividade de proteínas tenha sido observada nas cepas homocitadas (Figura 8). É importante mencionar também que as cepas heterocitadas apenas não apresentaram, em média, a menor produção diária de carboidratos (Figura 8). Concomitantemente, esses dados indicam que cepas unicelulares seriam mais indicadas para aplicações envolvendo, portanto, o uso de carboidratos e lipídeos, como discutido anteriormente. Essa relevante indicação pode ser justificada devido a menor demanda e maior aproveitamento de luz apresentada por essas cepas (Tabela 3, Figura 3), refletindo em maiores A , TCR, produtividade de biomassa e das reservas acima citadas (Tabela 2, Figura 2, Figura 8). Em adição, as cepas unicelulares e homocitadas por apresentarem uma maior eficiência na absorção e utilização de luz (Tabela 3, Figura 3, Figura 4) e uma menor demanda metabólica de energia (R_d e fixação de nitrogênio), exibiram também uma maior produtividade diária em relação às cepas heterocitadas (Figura 8). Essa maior produtividade apresentada pelas cepas unicelulares e homocitadas, somada a elevada TCR faz dessas cepas candidatos comercialmente promissores para aplicações biotecnológicas voltadas para a produção de biocombustíveis e suplementos alimentares ([Govindjee & Shevela, 2011](#); [Beck et al., 2012](#); [Jones & Mayfield, 2012](#); [Steinhauser et al., 2012](#); [Gupta et al., 2013](#); [Schwarz et al., 2013](#)), visto que a elevada capacidade fotossintética apresentada pelas cianobactérias possibilita que essas culturas possam provavelmente apresentar produtividade superior quando comparado as matérias-primas obtidas de vegetais terrestres ([Jones & Mayfield, 2012](#)).

As proteínas constituem uma grande fração da biomassa de cianobactérias ([González López et al., 2010](#)), e assim, das 18 cepas utilizadas nesse trabalho, 16 apresentaram uma maior teor de proteínas por miligrama biomassa seca, quando

comparado as reservas de carboidratos e lipídios (Figura 5, Figura 8, Tabela Suplementar 2). De maneira interessante, as cepas homocitadas apresentaram maior produtividade diária de proteínas (Figura 8C), demonstrando elevado potencial dessas cepas para a produção de proteínas, o que pode ser importante, particularmente em áreas com limitada capacidade de produção vegetal ou com problemas de má nutrição, como em algumas regiões da África ([Habib et al., 2008](#)). Salienta-se que as proteínas obtidas a partir de biomassa de cianobactérias constituem uma fonte alternativa de proteínas para consumo humano ou de animais ([Becker, 2007](#)), e que quando comparado à proteína de origem animal, apresentam como vantagem além do baixo custo de obtenção o grande valor nutricional, haja vista que contêm todos os aminoácidos, com exceção da cisteína e metionina, em concentrações adequadas ([Takenaka et al., 1998](#); [Becker, 2007](#)). Nesse contexto e considerando as exigências hídricas das culturas de interesse agrônomico é importante ressaltar que em culturas de cianobactérias a única perda significativa de água observada ocorre por evaporação ([Ducat et al., 2011](#)). Desse modo, embora para a produção de 1 quilograma (Kg) de proteína em *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) possa ocorrer uma perda de até 2.000 litros de água, esse valor corresponde a apenas, 25%, 17% ou 2% do que seria necessário para produzir 1 kg de proteína a partir de soja, milho ou carne, respectivamente ([Habib et al., 2008](#); [Ducat et al., 2011](#); [Parmar et al., 2011](#)). Por outro lado, outro fator de destaque do potencial das cepas homocitadas para a produção de proteínas seria a maior facilidade para colheita de sua biomassa, quando comparado às cepas unicelulares. Os custos da colheita de biomassa de cianobactérias podem ser elevados ([Danquah et al., 2009](#)), principalmente para células pequenas (cianobactérias unicelulares) ([Molina Grima et al., 2003](#)). Desse modo, a maior adesão observada entre os filamentos das cepas homocitadas e destes com a superfície do recipiente no qual estão sendo cultivadas poderia maximizar tal processo.

Cumprir mencionar que em função de sua maior produtividade diária e TCR (Tabela 2, Figura 8B) as cepas unicelulares apresentam-se como possíveis candidatas para a produção de carboidratos solúveis. Tais compostos produzidas por cianobactérias podem ser transformados em etanol, por meio de fermentação sob condições de anoxia e escuro ([Stal & Moezelaar, 1997](#)), assim como podem ser utilizados na digestão anaeróbica, para conversão em biometano ([Sialve et al., 2009](#); [Quintana et al., 2011](#)). Salienta-se aqui a vantagem competitiva das cianobactérias sobre as culturas energéticas tradicionais na produção de etanol no que respeita sua capacidade natural de realizar fermentação, sem a necessidade da adição de culturas de leveduras ([Gonzalez-Fernandez et al., 2012](#)). Essa característica torna as cianobactérias promissoras

candidatas para a produção de etanol, haja vista que, em muitos casos, essa produção pode ser maximizada por meio da manipulação das condições de crescimento ([Palinska & Krumbein, 2000](#)) assim como pela manipulação genética do metabolismo ([Parmar et al., 2011](#)). Assim, utilizando-se *Synechococcus* sp. PCC 7942 foi demonstrado o estabelecimento de uma via de síntese de etanol funcional durante a fotossíntese aeróbica, não sendo necessárias condições especiais, como um ambiente anaeróbico ([Deng & Coleman, 1999](#)). Nesse contexto, o potencial de cepas utilizadas nesse trabalho (e.g., *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Synechococcus elongatus* PCC 7942), para manipulação genética visando aumentos na produção de bioetanol ([Angermayr et al., 2009](#); [Atsumi et al., 2009](#); [Lu, 2010](#); [Zhou & Li, 2010](#); [Parmar et al., 2011](#); [Quintana et al., 2011](#); [Tan et al., 2011](#); [Wang et al., 2012](#)) parece ser ainda mais evidente. Em conjunto, esses dados indicam que algumas dessas cepas precisam ser melhor investigadas com vista a se obter uma completa imagem de aspectos metabólicos responsáveis pela produção de compostos de interesse. Esses intrigantes aspectos devem ser alvos de pesquisas futuras com vistas a identificação de fatores, sejam metabólicos ou moleculares, associadas a características de tamanho interesse econômico.

A maior produtividade diária de lipídios observada nas cepas unicelulares e em algumas cepas homocitadas (Figura 8 D), somada a maior TCR e *A* (Tabela 2, Figura 2) demonstram o potencial dessas para produção de biodiesel. Não obstante, as maiores taxas de crescimento e fotossíntese apresentadas pelas cianobactérias, quando comparado a algas e plantas terrestres ([Jones & Mayfield, 2012](#)), e a possibilidade em utilizar terras não aráveis para o seu cultivo, permitem que esses organismos não entrem em concorrência direta com a produção de alimentos ([Machado & Atsumi, 2012](#)). Em adição, as cianobactérias possuem uma base genética relativamente simples e de fácil manipulação, quando comparado a plantas e microalgas ([Koksharova & Wolk, 2002](#); [Work et al., 2012](#)). Concomitantemente, essas informações sugerem que esses micro-organismos possam fornecer mais biodiesel utilizando simultaneamente menos água e espaço ([Gupta et al., 2013](#)). Outra grande vantagem das cianobactérias está associada aos mais de 35 genomas já sequenciados apresentando seus transcriptomas/metabolomas também caracterizados, o que fornece assim maior suporte para manipulação genética desses organismos ([Lu, 2010](#)). Nesse contexto, as características aqui citadas, somadas ao elevado potencial energético dos lipídios sintetizados por cianobactérias ([Ducat et al., 2011](#)), evidenciam o potencial desses micro-organismos, em particular de cepas unicelulares e algumas homocitadas, para a

produção de biocombustíveis de uma forma economicamente eficiente e ambientalmente sustentável ([Li et al., 2008](#)).

O maior conteúdo total de lipídios observado na cepa ANT-040 (Figura 7), coletada no continente Antártico (Tabela 1), corrobora com dados obtidos em outras cepas dessa região ([Pushparaj et al., 2008](#)). Em conjunto, esses dados indicam um grande potencial de cepas oriundas desse ambiente para a produção de lipídios. Registre-se, no entanto, que é ainda necessária a caracterização detalhada de um maior número de cepas, de modo a selecionar não somente organismos com um elevado conteúdo de lipídios, mas também elevadas taxas de crescimento.

A menor produtividade diária de biomassa apresentada por algumas cepas heterocitadas, como resultado das maiores demandas metabólicas, pode mascarar o elevado potencial que essas cepas apresentam para produção de gás hidrogênio (H₂). Por apresentarem células especializadas na fixação de nitrogênio, cianobactérias pertencentes a gêneros particulares, tais como *Anabaena*, *Arthrospira/Spirulina*, *Nostoc*, produzem grandes quantidades de H₂ ([Esper et al., 2006](#) 223). Cumpre mencionar que o H₂ é considerado uma alternativa futura de energia por ser renovável, sua queima não resultar em gases de efeito estufa e liberar grandes quantidades de energia por unidade de peso, quando em combustão ([Esper et al., 2006](#); [Ducat et al., 2011](#); [Wijffels et al., 2013](#)). Nesse sentido, se faz necessário a seleção de cepas heterocitadas com maior produtividade desse gás, como também uma análise mais aprofundada do metabolismo do nitrogênio e das condições de cultivo voltadas especificamente para sua produção, de modo maximizar a produção de H₂ em escala industrial.

4.3 Aspectos fisiológicos e metabólicos em cepas de cianobactérias e suas implicações moleculares e morfológicas

A classificação das cianobactérias tem se baseado tradicionalmente em caracteres morfológicos, tais como largura dos tricomas, tamanho celular, forma, disposição, planos de divisão, coloração e presença de caracteres como aerótopos e bainha mucilaginosa ([Anagnostidis & Komarek, 1985](#)). Entretanto, a diversidade de morfologias observadas dentro do Phylum Cyanophyta é usualmente acompanhada por uma grande plasticidade fenotípica, que pode ser variável em função das condições ambientais e de cultivo ([Lyra et al., 2001](#); [Maayke Stomp et al., 2008](#)). Desse modo, outros caracteres, como as informações moleculares e metabólicas, representam um importante complemento na identificação e classificação das cianobactérias ([Komárek](#)

[& Kastovský, 2003](#)). Nesse contexto, a utilização de parâmetros fisiológicos e metabólicos parece ser uma alternativa promissora para um melhor entendimento das relações entre diferentes cepas de cianobactérias. Neste trabalho, utilizando-se uma combinação de parâmetros fisiológicos e metabólicos, foi possível demonstrar que as relações morfológicas e moleculares previamente observadas são mantidas para grande parte das cepas utilizadas (Figura 10).

Os resultados apresentados indicam uma maior contribuição de I_c , parâmetros de fluorescência e pigmentos no agrupamento das cepas (Figura Suplementar 6), o que se justifica pela importância desses parâmetros sobre A (Figura 11). Por outro lado, a contribuição dos nucleotídeos NAD^+ e $NADH$, bem como a atividade das enzimas do ciclo TCA, 2-OGDC e SSADH (Figura Suplementar 6), se explicaria pela intrínseca relação dessas variáveis com R_d (Figura 11). Em adição, os resultados aqui obtidos indicam que A e R_d atuam em sentido oposto sob o crescimento e a produtividade diária de biomassa (Figura 11). Salienta-se aqui que, em conjunto com A , o glicogênio atua como reserva de carbono e energia ([Ehira & Ohmori, 2011](#)), propiciando, assim, maior produtividade diária de biomassa e lipídios (Figura 11). Desse modo, o agrupamento conjunto de cepas unicelulares e homocitadas, caracterizadas nesse trabalho por apresentarem maior A e uma menor demanda relativa de energia para a respiração (Figura 2), culminando assim em uma maior disponibilidade de fotoassimilados para a promoção do crescimento e produtividade de biomassa (Tabela 2, Figura 8A). Por outro lado, as cepas heterocitadas, que apresentaram comportamento contrário, foram agrupadas separadamente (Figura 10).

As cepas unicelulares selecionadas, pertencentes aos gêneros *Synechocystis* (UFV-039 e PCC 6803) e *Synechococcus* (PCC 7942), são morfológicamente distintas (Figura 1). Saliente-se aqui que o gênero *Synechocystis* é característico por apresentar células esféricas e solitárias, ao passo que o gênero *Synechococcus* possui células ovaladas ou cilíndricas que podem se encontrar solitárias ou em grupos ([Komárek & Anagnostidis, 1999](#)) (Figura 1). Não obstante essas diferenças morfológicas, a disposição dessas cepas após a análise multivariada permite inferir que os dados fisiológicos, metabólicos e de crescimento corroboram os dados de morfologia. Registre-se também que as cepas UFV-039 e PCC 6803, pertencentes ao gênero *Synechocystis*, mesmo possuindo origens geográficas distintas, mostraram maior semelhança fisiológica e metabólica, quando comparado a PCC 7942, pertencente ao gênero *Synechococcus* (Tabela 1, Figura 10). Tomados em conjunto esses resultados indicam que a similaridade em aspectos fisiológicos e metabólicos parece estar

associada a relações morfológicas e moleculares e que, em última instância, podem estar mais conectadas a aspectos morfológicos do que a origem geográfica *per se* em cianobactérias. Cumpre registrar, no entanto, que ao se utilizar número semelhante de variáveis preditoras (28) e de cepas (18) essas conclusões precisam ser tomadas com cautela para evitar extrapolações espúrias.

Dentre as cepas filamentosas homocitadas, que se agruparam de maneira próxima (Figura 10), destacam-se as representantes do gênero *Phormidium* (UFV-027 e UFV-036). No entanto, a distância encontrada entre essas cepas foi maior que a observada para as cepas unicelulares (Figura 10). Cumpre mencionar que essa maior dispersão pode ser justificada, ao menos parcialmente, pelo fato de, embora a ordem Oscillatoriales seja caracterizada por apresentar apenas cianobactérias filamentosas homocitadas, grandes variações em termos de tamanho, largura, disposição e cor dos filamentos, presença ou não de bainha mucilaginosa, necrídeos e granulações, são comumente observadas nessa ordem ([Anagnostidis & Komárek, 1988](#)). Em adição, essas variações não se restringem apenas a morfologia e assim, caracteres moleculares demonstraram, por meio de análises da sequência do RNA ribossomal 16S, que essa ordem apresenta provavelmente uma origem polifilética ([Litvaitis, 2002](#); [Valério et al., 2009](#)).

Baseado nas análises utilizadas nesse trabalho as cepas filamentosas heterocitadas se dividiram em dois pequenos grupos (Figura 10). As cepas filamentosas, heterocitadas e não ramificadas (Figura 1), com exceção da UFV-030 foram agrupadas em conjunto ao passo que as cepas que apresentam ramificações verdadeiras (UFV-033 e ANT-040), falsas (UFV-E1) ou filamentos heteropolares (UFV-006 e UFV-037, Figura 1) formaram outro grupo (Figura 10). É importante ressaltar que as cepas com filamentos heteropolares podem formar falsas ramificações durante a divisão dos tricomas (Figura Suplementar 8) ([Komárek & Hauer, 2013](#)). De forma interessante esses agrupamentos por meio de parâmetros fisiológicos, metabólicos e de crescimento, realizados pela primeira vez em cianobactérias, foram similares, ao menos em parte, aos previamente observados para caracteres moleculares e morfológicos ([Anagnostidis & Komarek, 1985](#); [Gugger & Hoffmann, 2004](#)). Neste contexto, dados moleculares utilizando sequências de RNA ribossomal 16S e do gene *nifD* evidenciaram que todas as cianobactérias heterocitadas, ramificadas ou não, formam um grupo monofilético único ([Lyra et al., 2001](#); [Henson et al., 2004](#)), que pode ser separado em dois subgrupos menores. Assim, o primeiro subgrupo seria formado por cianobactérias filamentosas, heterocitadas, unisseriadas e sem ramificações verdadeiras (Ordem Nostocales)

([Komárek & Anagnostidis, 1989](#)), ao passo que o segundo por cianobactérias filamentosas, heterocitadas, multisseriadas e com ramificações verdadeiras (Ordem Stigonematales) ([Anagnostidis & Komárek, 1990](#)), semelhantemente ao observado no presente trabalho (Figura 11) ([Gugger & Hoffmann, 2004](#)). Apesar dessas similaridades, os resultados ora obtidos para as cepas aqui utilizadas, evidenciam que cepas com falsas ramificações ou filamentos heteropolares se mostraram fisiológica e metabolicamente mais relacionadas às cepas com ramificações verdadeiras (Figura 10), diferentemente do observado para dados morfológicos e moleculares ([Anagnostidis & Komarek, 1985](#); [Komárek & Kastovský, 2003](#); [Gugger & Hoffmann, 2004](#)).

5. CONCLUSÕES

A caracterização dos parâmetros fisiológicos, metabólicos e de crescimento de uma coleção de cepas de cianobactérias realizada nesse trabalho sugere que o maior crescimento de algumas cepas está associado a: (i) alta eficiência na absorção e utilização de luz, que refletiu diretamente em incrementos em A ; (ii) menores demandas energéticas associadas a R_d e fixação de nitrogênio e (iii) balanço adequado entre A , R_d e fixação de nitrogênio influenciado TCR, produtividade diária de biomassa e acúmulo de demais reservas. Em adição, foi possível verificar o grande potencial das cepas unicelulares para a produção de biomassa, carboidratos solúveis e lipídios, ao passo que as cepas homocitadas mostraram-se promissoras produtoras de proteínas. Apesar de as cepas heterocitadas não terem apresentado maior produtividade de nenhuma das reservas avaliadas, é importante salientar que tais cepas demonstram potencial para a produção de hidrogênio, uma vez que apresentam morfologia e fisiologia especializada e capaz de maximizar esse processo. Cumpre mencionar também, que o agrupamento resultante das comparações fisiológicas, metabólicas e de crescimento se mostrou coerente ao observado por meio de comparações morfológicas prévias. Assim, em cada um dos quadrantes foi possível observar um padrão morfológico distinto, o que permite inferir que as variações morfológicas apresentadas pelas cepas aqui utilizadas acarretaram em alterações na fisiologia, metabolismo e crescimento. Registre-se também que essas alterações são particularmente semelhantes dentro um mesmo grupo morfológico. Tomados em conjunto, os resultados obtidos demonstram a importância da caracterização fisiológica dos organismos desse phylum, não somente com o intuito de se entender as diferentes relações casuais usualmente observadas entre essas cepas, como também para um melhor entendimento das relações metabólicas existentes nesse

grupo, e possibilitando, em última instância, a seleção de cepas com potencial para aplicações biotecnológicas várias.

REFERÊNCIAS

- Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K** (2009) Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 1-12
- Anagnostidis K, Komárek J** (1985) Modern approach to the classification-system of cyanophytes . 1- introduction. *Archiv für Hydrobiologie*: 1-73
- Anagnostidis K, Komárek J** (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - oscillatoriales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **50-53**: 327-472
- Anagnostidis K, Komárek J** (1990) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5 - stigonematales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **59**: 1-73
- Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, Teixeira de Mattos MJ** (2009) Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **20**: 257-263
- Atsumi S, Higashide W, Liao JC** (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nature Biotechnology* **27**: 1177-1180
- Badger MR, Price GD, Long BM, Woodger FJ** (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany* **57**: 249-265
- Bailey S, Melis A, Mackey KRM, Cardol P, Finazzi G, van Dijken G, Berg GM, Arrigo K, Shrager J, Grossman A** (2008) Alternative photosynthetic electron flow to oxygen in marine synechococcus. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1777**: 269-276
- Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 89-113
- Beck C, Knoop H, Axmann IM, Steuer R** (2012) The diversity of cyanobacterial metabolism: Genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics* **13**
- Becker EW** (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* **25**: 207-210
- Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P** (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* **154**: 157-164
- Black K, Osborne B** (2004) An assessment of photosynthetic downregulation in cyanobacteria from the *Gunnera–Nostoc* symbiosis. *New Phytologist* **162**: 125-132
- Blankenship RE** (2010) Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiology* **154**: 434-438
- Bligh EG, Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**: 911-917
- Böhme H** (1998) Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends in Plant Science* **3**: 346-351

- Bosak T, Liang B, Sim MS, Petroff AP** (2009) Morphological record of oxygenic photosynthesis in conical stromatolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 10939-10943
- Cardona T, Battchikova N, Zhang P, Stensjö K, Aro E-M, Lindblad P, Magnuson A** (2009) Electron transfer protein complexes in the thylakoid membranes of heterocysts from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1787**: 252-263
- Cardona T, Magnuson A** (2010) Excitation energy transfer to photosystem I in filaments and heterocysts of *Nostoc Punctiforme*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1797**: 425-433
- Choi G-G, Bae M-S, Ahn C-Y, Oh H-M** (2008) Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Biotechnology Letters* **30**: 87-92
- Danquah MK, Ang L, Uduman N, Moheimani N, Forde GM** (2009) Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: Exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **84**: 1078-1083
- de Marsac NT, Houmard J** (1988) Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *In* ANG Lester Packer, ed, *Methods in enzymology*, Vol Volume 167. Academic Press, pp 318-328
- Deng MD, Coleman JR** (1999) Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 523-528
- Ducat DC, Way JC, Silver PA** (2011) Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology* **29**: 95-103
- Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya S** (2005) Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Cell Factories* **4**: 36
- Eberhard S, Finazzi G, Wollman F-A** (2008) The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics* **42**: 463-515
- Ehira S, Ohmori M** (2011) Nrra, a nitrogen-regulated response regulator protein, controls glycogen catabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 38109-38114
- Ernst A, Kirschenlohr H, Diez J, Boger P** (1984) Glycogen-content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Archives of Microbiology* **140**: 120-125
- Esper B, Badura A, Rögner M** (2006) Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production. *Trends in Plant Science* **11**: 543-549
- Geider RJ, MacIntyre HL, Kana TM** (1997) Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: Responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a:carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. *Marine Ecology Progress Series* **148**: 187-200
- Gnansounou E, Dauriat A, Villegas J, Panichelli L** (2009) Life cycle assessment of biofuels: Energy and greenhouse gas balances. *Bioresource Technology* **100**: 4919-4930
- Gonzalez-Fernandez C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP** (2012) Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology* **110**: 610-616
- González López CV, García MdCC, Fernández FGA, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JMF** (2010) Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology* **101**: 7587-7591
- Govindjee, Shevela D** (2011) Adventures with cyanobacteria: A personal perspective. *Frontiers in Plant Science* **2**: 28

- Gugger MF, Hoffmann L** (2004) Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 349-357
- Gupta V, Ratha SK, Sood A, Chaudhary V, Prasanna R** (2013) New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. *Algal Research* **2**: 79-97
- Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR** (2008) A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals. (FAO Fisheries and Aquaculture Circular. No. 1034). **Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations**
- Hagemann M, Effmert U, Kerstan T, Schoor A, Erdmann N** (2001) Biochemical characterization of glucosylglycerol-phosphate synthase of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Comparison of crude, purified, and recombinant enzymes. *Current Microbiology* **43**: 278-283
- Heidorn T, Camsund D, Huang H-H, Lindberg P, Oliveira P, Stensjo K, Lindblad P** (2011) Synthetic biology in cyanobacteria: Engineering and analyzing novel functions. In C Voigt, ed, *Methods in Enzymology*, vol 497: Synthetic biology, methods for part/device characterization and chassis engineering, pp 539-579
- Helbling EW, Gao K, Ai H, Ma Z, Villafañe V** (2006) Differential responses of *Nostoc sphaeroides* and *Arthrospira platensis* to solar ultraviolet radiation exposure. *Journal of Applied Phycology* **18**: 57-66
- Hendrickson L, Furbank R, Chow W** (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* **82**: 73-81
- Henson BJ, Hesselbrock SM, Watson LE, Barnum SR** (2004) Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections iv and v) based on nifd. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 493-497
- Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE** (2011) Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 515-548
- Jeon YC, Cho CW, Yun YS** (2005) Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal* **27**: 127-131
- Jones CS, Mayfield SP** (2012) Algae biofuels: Versatility for the future of bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 346-351
- Koksharova O, Wolk C** (2002) Genetic tools for cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 123-137
- Komárek J, Anagnostidis K** (1999) Cyanoprokaryota, 1st Part: Chroococcales: 1-548
- Komárek J, Hauer T** (2013) Cyanodb.Cz - on-line database of cyanobacterial genera. Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>
- Komárek J, Kastovský J** (2003) Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies* **109**: 305-325
- Komárek J, Anagnostidis K** (1989) Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 - nostocales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **56**: 247-345
- Kumar K, Dasgupta CN, Nayak B, Lindblad P, Das D** (2011) Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* **102**: 4945-4953
- Kump LR** (2008) The rise of atmospheric oxygen. *Nature* **451**: 277-278
- Kwon J-H, Bernát G, Wagner H, Rögner M, Rexroth S** (2013) Reduced light-harvesting antenna: Consequences on cyanobacterial metabolism and photosynthetic productivity. *Algal Research* **2**: 188-195

- Li H, Sherman D, Bao S, Sherman L** (2001) Pattern of cyanophycin accumulation in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing cyanobacteria. *Archives of Microbiology* **176**: 9-18
- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N** (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress* **24**: 815-820
- Litvaitis MK** (2002) A molecular test of cyanobacterial phylogeny: Inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* **468**: 135-145
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Lu X** (2010) A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnology Advances* **28**: 742-746
- Lyra C, Suomalainen S, Gugger M, Vezie C, Sundman P, Paulin L, Sivonen K** (2001) Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 513-526
- Maayke Stomp, Dijk Mark Av, Overzee Harriët MJv, Meike T. Wortel, Corrien A. M. Sigon, Martijn Egas, Hans Hoogveld, Herman J. Gons, Jef Huisman** (2008) The timescale of phenotypic plasticity and its impact on competition in fluctuating environments. *The American Naturalist* **172**: E169-E185
- Machado IMP, Atsumi S** (2012) Cyanobacterial biofuel production. *Journal of Biotechnology* **162**: 50-56
- MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ** (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* **38**: 17-38
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S-I, Lee YC** (2005) Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* **339**: 69-72
- Meeks J, Campbell E, Summers M, Wong F** (2002) Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology* **178**: 395-403
- Molina Grima E, Belarbi EH, Ación Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y** (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances* **20**: 491-515
- Mouget J-L, Tremblin G** (2002) Suitability of the fluorescence monitoring system (fms, hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquatic Botany* **74**: 219-231
- Mulkidjanian AY, Koonin EV, Makarova KS, Mekhedov SL, Sorokin A, Wolf YI, Dufresne A, Partensky F, Burd H, Kaznadzey D, Haselkorn R, Galperin MY** (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 13126-13131
- Murchie EH, Lawson T** (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* **64**: 3983-3998
- Nogales J, Gudmundsson S, Knight EM, Palsson BO, Thiele I** (2012) Detailing the optimality of photosynthesis in cyanobacteria through systems biology analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 2678-2683
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* **50**: 1093-1106
- Ow SY, Noirel J, Cardona T, Taton A, Lindblad P, Stensjö K, Wright PC** (2008) Quantitative overview of N₂ fixation in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

- through cellular enrichments and itraq shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research* **8**: 187-198
- Page LE, Liberton M, Pakrasi HB** (2012) Reduction of photoautotrophic productivity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain pcc 6803 by phycobilisome antenna truncation. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6349-6351
- Palinska KA, Krumbein WE** (2000) Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria. *Journal of Phycology* **36**: 139-145
- Parmar A, Singh NK, Pandey A, Gnansounou E, Madamwar D** (2011) Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology* **102**: 10163-10172
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) 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. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **975**: 384-394
- Posten C** (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* **9**: 165-177
- Pushparaj B, Buccioni A, Paperi R, Piccardi R, Ena A, Carlozzi P, Sili C** (2008) Fatty acid composition of antarctic cyanobacteria. *Phycologia* **47**: 430-434
- Quintana N, Van der Kooy F, Van de Rhee MD, Voshol GP, Verpoorte R** (2011) Renewable energy from cyanobacteria: Energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 471-490
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**: 1-61
- Ruffing AM** (2011) Engineered cyanobacteria: Teaching an old bug new tricks. *Bioengineered Bugs* **2**: 136-149
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J** (2006) Tm4 microarray software suite. In K Alan, O Brian, eds, *Methods in enzymology*, Vol Volume 411. Academic Press, pp 134-193
- Scherer S, Almon H, Böger P** (1988) Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* **15**: 95-114
- Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (2008) The arabidopsis onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* **20**: 2909-2925
- Schwarz D, Orf I, Kopka J, Hagemann M** (2013) Recent applications of metabolomics toward cyanobacteria. *Metabolites* **3**: 72-100
- Sialve B, Bernet N, Bernard O** (2009) Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* **27**: 409-416
- Sienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR** (2008) 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* **147**: 115-127
- Stal LJ, Moezelaar R** (1997) Fermentation in cyanobacteria1. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 179-211
- Steinhauser D, Fernie AR, Araújo WL** (2012) Unusual cyanobacterial TCA cycles: Not broken just different. *Trends in Plant Science* **17**: 503-509

- Takenaka H, Yamaguchi Y, Sakaki S, Watarai K, Tanaka N, Hori M, Seki H, Tsuchida M, Yamada A, Nishimori T, Morinaga T** (1998) Safety evaluation of *Nostoc flagelliforme* (Nostocales, Cyanophyceae) as a potential food. *Food and Chemical Toxicology* **36**: 1073-1077
- Tan X, Yao L, Gao Q, Wang W, Qi F, Lu X** (2011) Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metabolic Engineering* **13**: 169-176
- Tilzer MM** (1987) Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: Implications for their dominance in eutrophic lakes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **21**: 401-412
- Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM, Ohno T** (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 5442-5447
- Torzillo G, Bernardini P, Masojidek J** (1998) 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* **34**: 504-510
- Valério E, Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P, Tenreiro R** (2009) Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* **155**: 642-656
- Walsby AE** (2007) Cyanobacterial heterocysts: Terminal pores proposed as sites of gas exchange. *Trends in Microbiology* **15**: 340-349
- Wang B, Wang J, Zhang W, Meldrum DR** (2012) Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. *Frontiers in Microbiology* **3**
- Wijffels RH, Kruse O, Hellingwerf KJ** (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* **24**: 405-413
- Wilde A, Dienst D** (2011) Tools for genetic manipulation of cyanobacteria bioenergetic processes of cyanobacteria. In GA Peschek, C Obinger, G Renger, eds. Springer Netherlands, pp 685-703
- Work VH, D'Adamo S, Radakovits R, Jinkerson RE, Posewitz MC** (2012) Improving photosynthesis and metabolic networks for the competitive production of phototroph-derived biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 290-297
- Zevenboom W, van der Does J, Bruning K, Mur LR** (1981) A non-heterocystous mutant of *Aphanizomenon flos-aquae*, selected by competition in light-limited continuous culture. *FEMS Microbiology Letters* **10**: 11-16
- Zhang S, Bryant DA** (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* **334**: 1551-1553
- Zhou J, Li Y** (2010) Engineering cyanobacteria for fuels and chemicals production. *Protein & Cell* **1**: 207-210
- Zhu X-G, Long SP, Ort DR** (2008) What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 153-159

DADOS SUPLEMENTARES

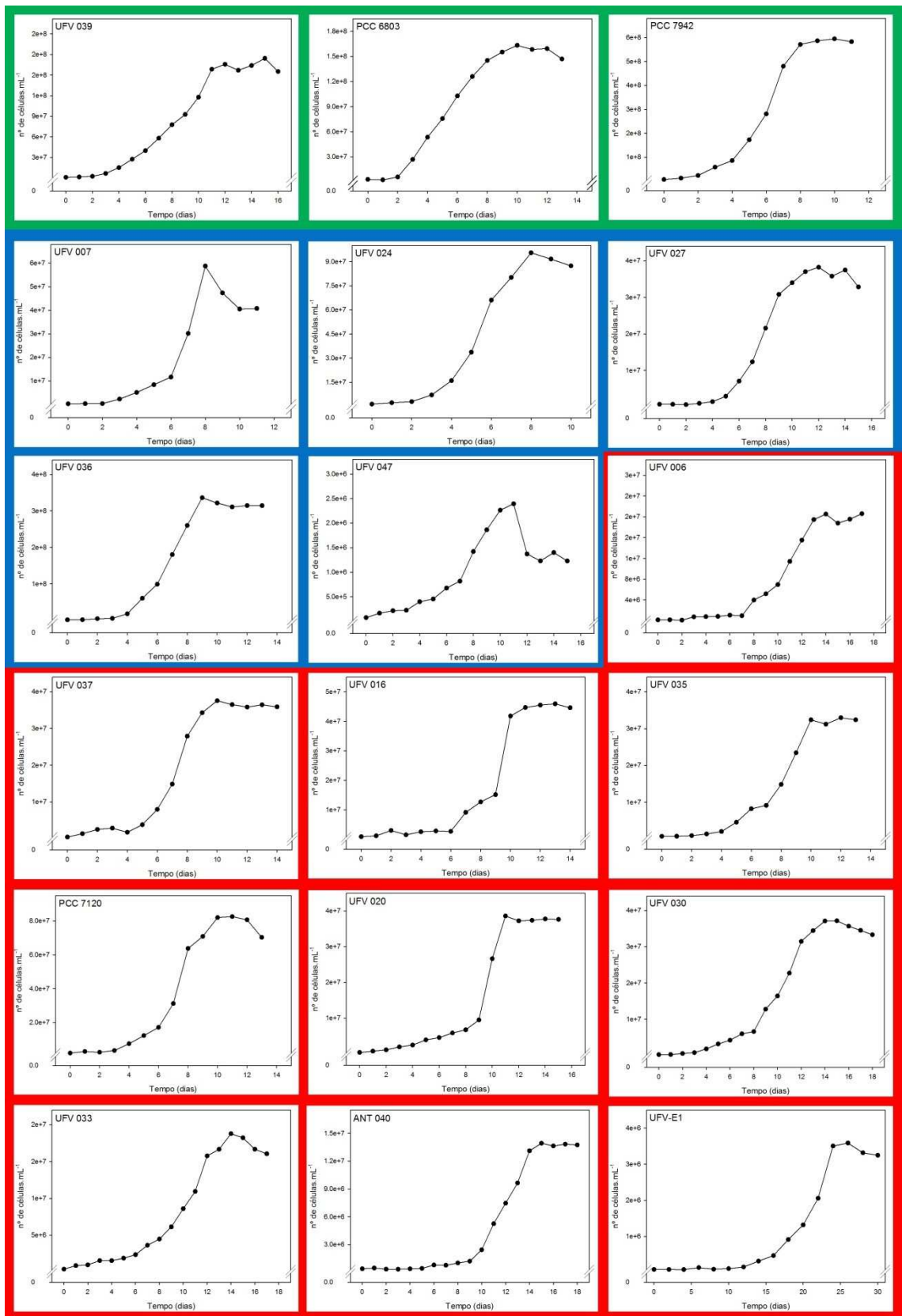


Figura Suplementar 1: Comparação entre as curvas de crescimento das diferentes cepas selecionadas.

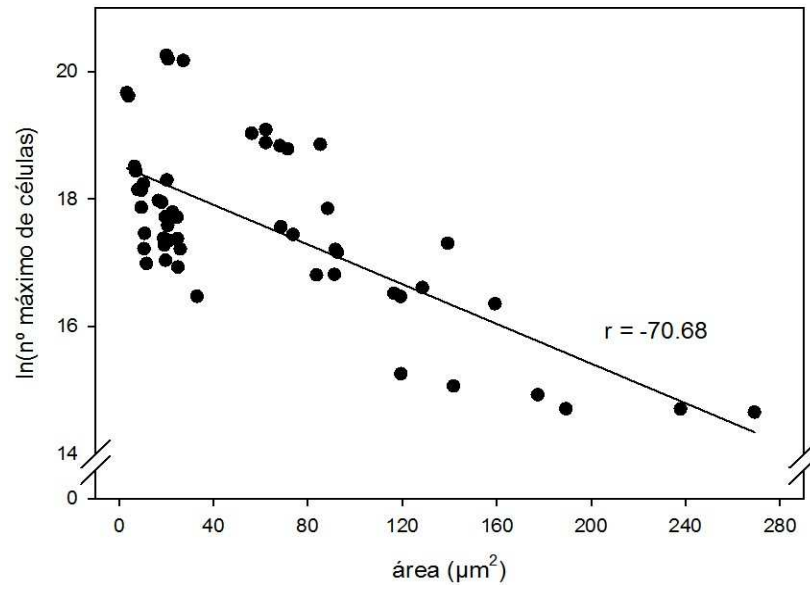


Figura Suplementar 2: Correlação negativa observada entre o número máximo de células que cada cepa atingiu ao fim das curvas de crescimento e a área celular de cada cepa.

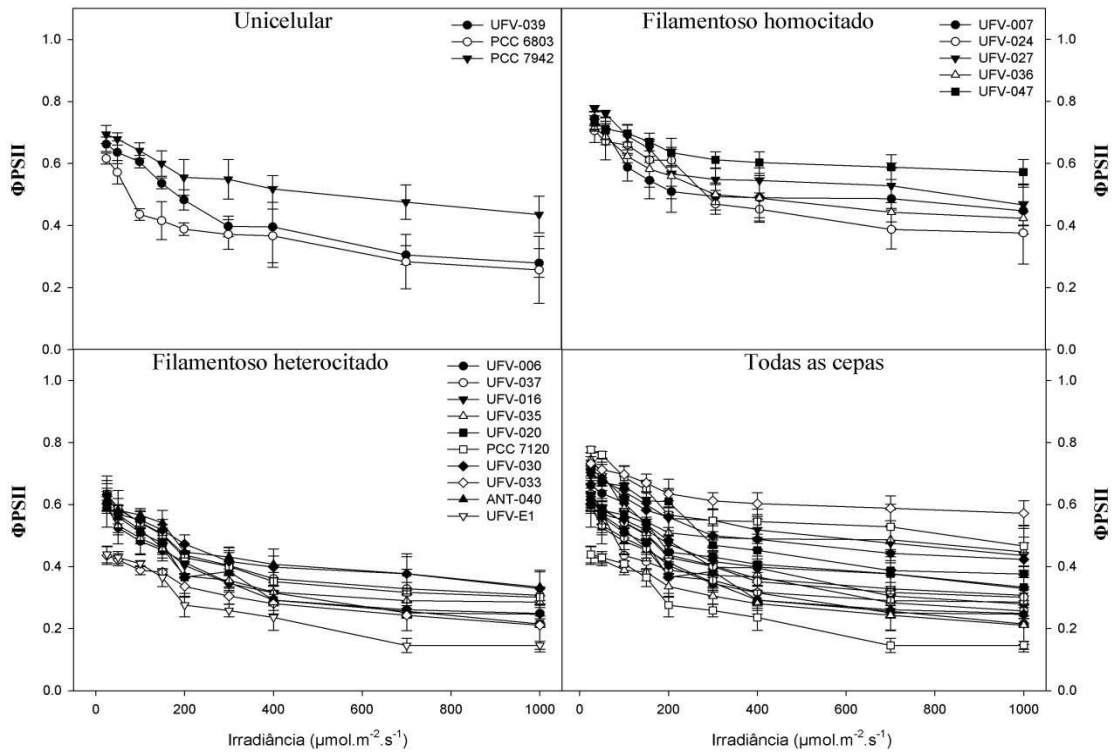


Figura Suplementar 3: Curvas de fluorescência – Alteração da Φ_{PSII} (eficiência fotoquímica do fotossistema II) nas diferentes cepas selecionadas em resposta ao aumento da irradiância.

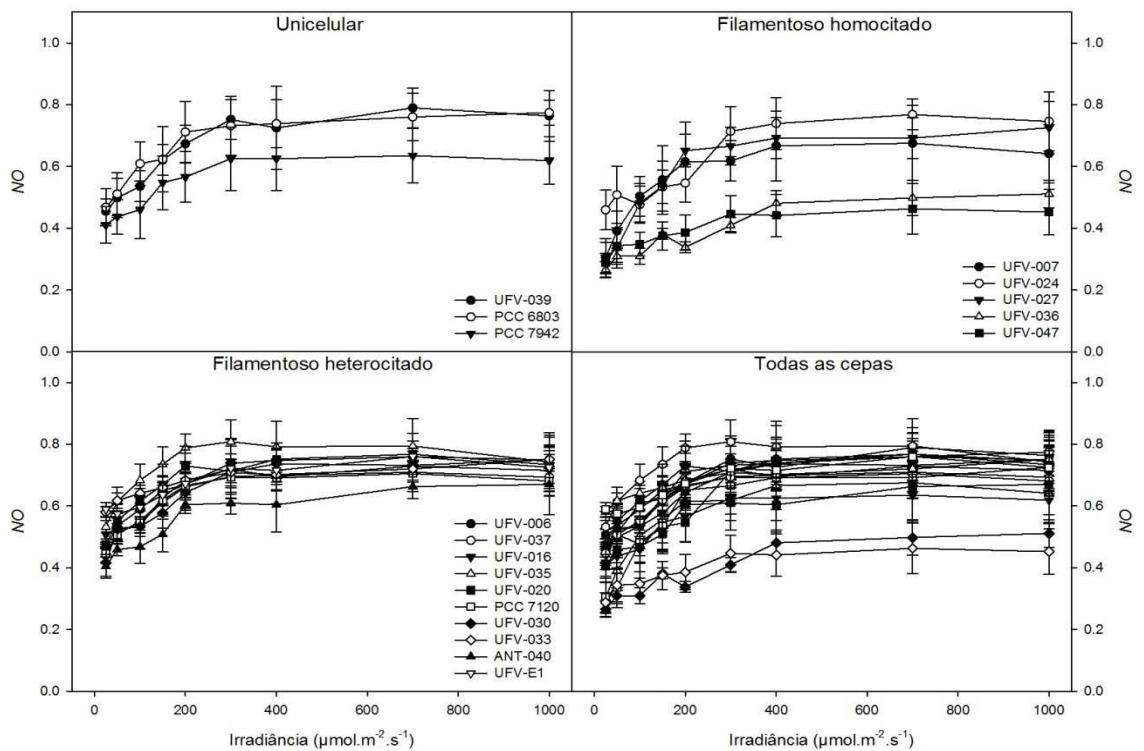


Figura Suplementar 4: Curvas de fluorescência – Alteração da NO (dissipação de energia por fluorescência e calor) nas diferentes cepas selecionadas em resposta ao

aumento da irradiância.

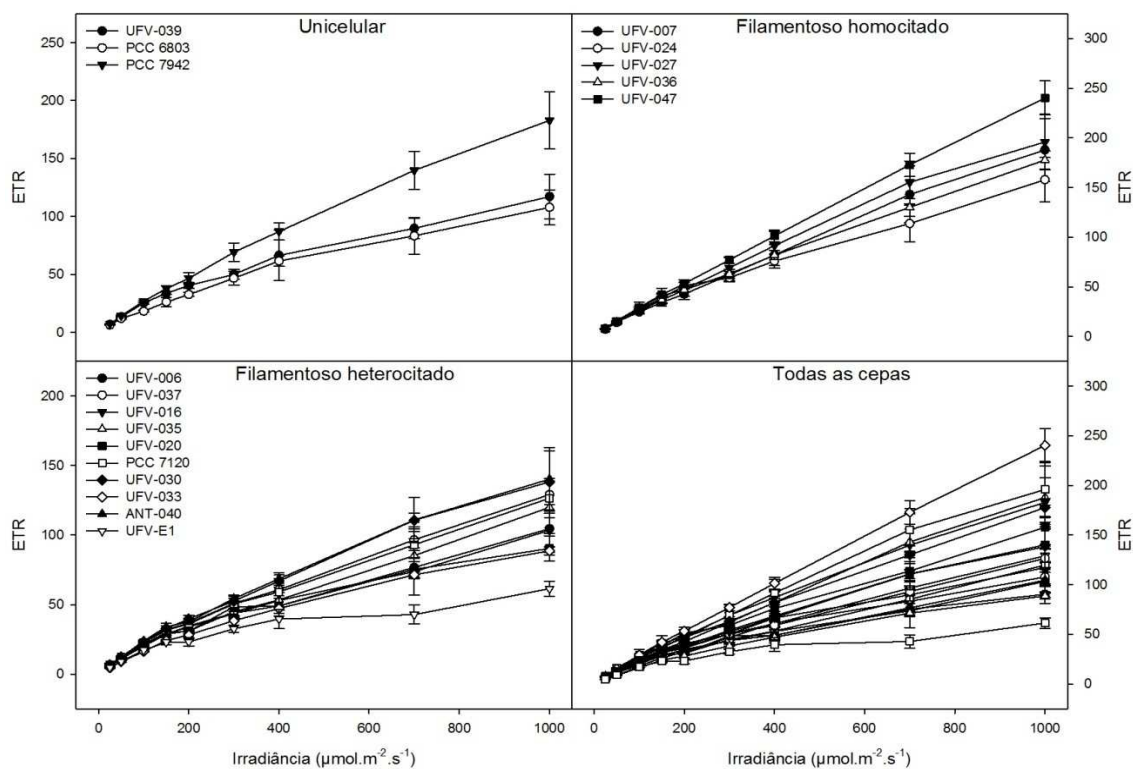


Figura Suplementar 5: Curvas de fluorescência – Alteração da ETR (taxa de transporte de elétrons no fotossistema II) nas diferentes cepas selecionadas em resposta ao aumento da irradiância.

Tabela Suplementar 1: Número de dias que cada cepa foi cultivada até atingir metade do período de duração da fase log.

Unicelular	Dias de cultivo
UFV-039	6
PCC 6803	6
PCC 7942	5
Filamentoso homocitado	
UFV-007	5
UFV-024	5
UFV-027	7

UFV-036	5
UFV-047	9
Filamentoso heterocitado	
UFV-006	9
UFV-037	7
UFV-016	8
UFV-035	7
UFV-020	8
PCC 7120	6
UFV-030	8
UFV-033	11
ANT-040	10
UFV-E1	19

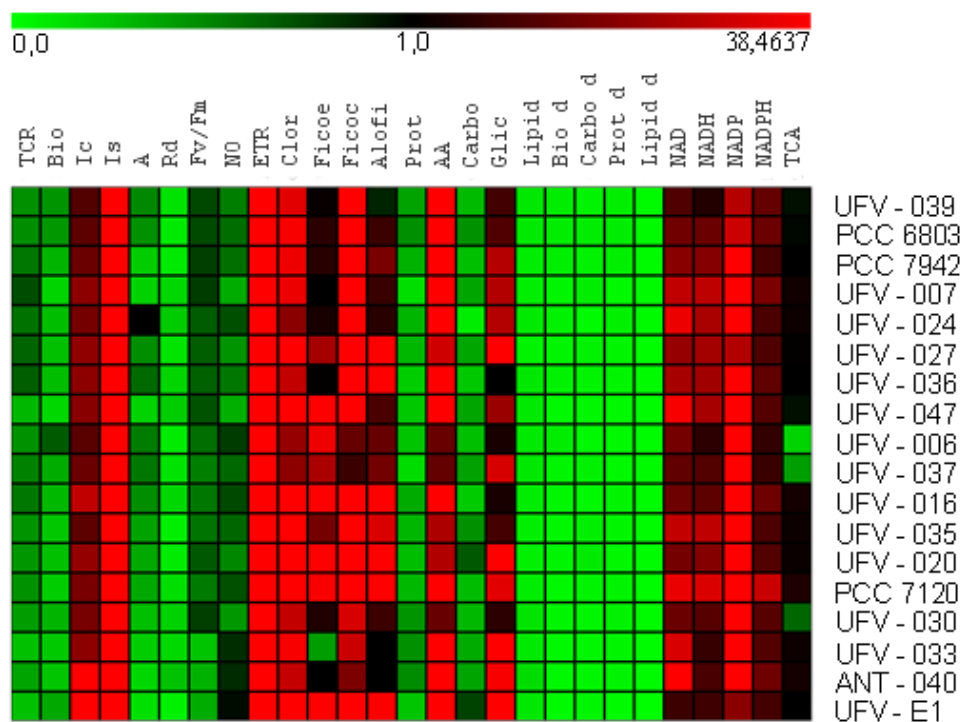


Figura Suplementar 6: Contribuição de cada variável para o agrupamento das cepas selecionadas em diferentes quadrantes por meio da análise de componentes principais. Siglas: TCR – Taxa de crescimento relativo; Bio – Biomassa total; $\ln(n^{\circ}$ máx cel.) - Número máximo de células que cada cepa atingiu ao fim das curvas de crescimento; I_c – Irradiância de compensação; I_s – Irradiância de saturação; A – Fotossíntese líquida; R_d – Respiração no escuro; F_v/F_m - Rendimento quântico máximo do fotossistema II; NO - Dissipação de energia por fluorescência e calor; ETR - Taxa de transporte de elétrons; Clor – Clorofila a ; Ficoe – Ficoeritrina; Ficoc - Ficocianina; Alofi – Aloficocianina; Prot - Proteínas totais; AA – Aminoácidos totais; Carbo – Carboidratos solúveis totais; Glic – Glicogênio; Lipid – Lipídios; Bio d – Produtividade diária de biomassa; Carbo d – Produtividade diária de carboidratos solúveis totais; Prot d – Produtividade diária de proteínas; Lipid d – Produtividade diária de lipídios; TCA - atividade acoplada conjunta das enzimas 2-OGDC e SSADH.

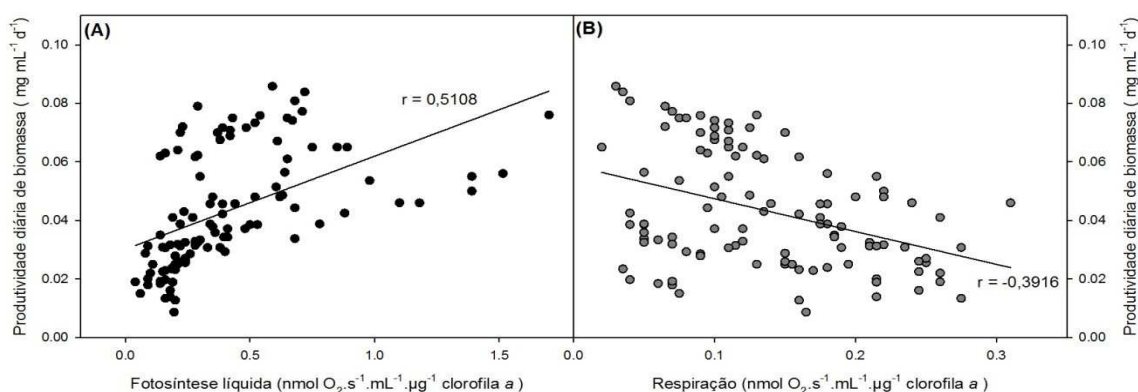


Figura Suplementar 7: Correlações observadas entre a fotossíntese líquida e a produtividade diária de biomassa (A) e entre a respiração e a produtividade diária de biomassa (B) nas diferentes cepas selecionadas.

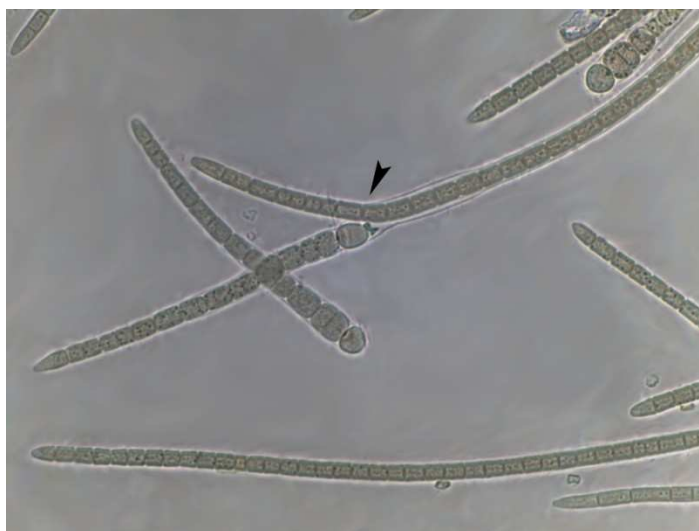


Figura Suplementar 8: Seta evidenciando ramificação falsa na cepa UFV-037.

Tabela Suplementar 2: Variação natural do percentual de reservas entre as diferentes cepas de cianobactérias utilizadas

	Carboidratos	Lipídio	Protein	Total
Unicelular			%	
UFV-039	28.5 ± 6.6	9.9 ± 1.9	57.9 ± 6.3	96.3 ± 4.9
PCC 6803	44.8 ± 8.9	8.8 ± 2.0	46.0 ± 6.5	99.6 ± 5.8
PCC 7942	26.6 ± 6.6	7.8 ± 2.2	61.4 ± 5.4	95.8 ± 4.7
Filamentoso homocitado				
UFV-007	37.1 ± 9.2	6.7 ± 1.3	53.4 ± 6.2	97.1 ± 5.6
UFV-024	7.8 ± 5.6	8.5 ± 1.4	80.3 ± 1.9	96.6 ± 3.0
UFV-027	36.7 ± 8.6	4.4 ± 0.5	59.8 ± 6.4	100.9 ± 5.1
UFV-036	22.4 ± 4.9	9.5 ± 1.8	60.4 ± 5.6	92.4 ± 4.1
UFV-047	37.0 ± 10.3	8.7 ± 1.1	52.4 ± 7.1	98.1 ± 6.2
Filamentoso heterocitado				
UFV-006	27.0 ± 3.4	8.7 ± 1.6	64.4 ± 3.0	100.1 ± 2.7

UFV-037	38.6 ± 6.2	9.9 ± 1.1	44.5 ± 3.3	93.0 ± 3.5
UFV-016	21.7 ± 5.2	7.6 ± 1.4	64.7 ± 6.2	94.0 ± 4.3
UFV-035	45.5 ± 11.1	6.5 ± 0.5	50.0 ± 4.9	102.0 ± 5.5
UFV-020	67.3 ± 15.3	6.0 ± 0.8	27.4 ± 6.3	100.7 ± 7.5
PCC 7120	27.6 ± 9.3	7.5 ± 1.3	69.2 ± 5.2	104.3 ± 5.2
UFV-030	29.3 ± 13.8	11.3 ± 1.0	53.4 ± 1.5	94.1 ± 5.4
UFV-033	34.7 ± 7.3	8.7 ± 0.8	55.4 ± 6.8	98.8 ± 4.9
ANT-040	37.4 ± 7.5	14.4 ± 2.1	47.2 ± 6.1	99.0 ± 5.2
UFV-E1	76.0 ± 12.1	10.2 ± 2.4	23.9 ± 6.5	110.0 ± 7.0