

GÍLLIAN NUNES PINTO

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS EM CIANOBACTÉRIAS
MORFOLOGICAMENTE DISTINTAS**

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
2016

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

T

P659c
2016
Pinto, Gíllian Nunes, 1987-
Caracterização taxonômica e respostas fisiológicas em
cianobactérias morfologicamente distintas / Gíllian Nunes
Pinto. - Viçosa, MG, 2016.
vii, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Wagner Luiz Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.50-54.

1. Cianobactérias - Taxonomia. 2. Filogenia.
3. Fisiologia. 4. Metabolismo. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 579.39

GÍLLIAN NUNES PINTO

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS EM CIANOBACTÉRIAS
MORFOLOGICAMENTE DISTINTAS**

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: 28 de julho de 2016.

Diego Bonaldo Genuário

Dimas Mendes Ribeiro

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Wagner L. Araújo
(Orientador)

“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de *todas as conseqüências.*”

Osho

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, de todo coração, ao meu pai, Cléo Moreira Pinto, pela presença constante e por estar presente na decisão mais complexa e determinante em minha vida. À minha mãe Ilda Helena Dornelles Nunes pela sua força, coragem, determinação e por estar sempre presente.

Aos meus irmãos mais novos, por sempre acreditarem em mim e terem na minha pessoa a responsabilidade de ser uma referência positiva em suas vidas. Sinto-me extremamente grato, mas com uma responsabilidade muito grande.

Agradeço a todos meus familiares que de alguma forma acreditaram nesse sonho e me apoiaram para seguir em frente. Em especial a Yuri Cabreira, meu primo e Irmão de coração, por tantas dificuldades compartilhadas nessa vida.

Aos meus amigos do “PTG Rancho da Amizade”, por tornarem minhas férias sempre mais divertidas e peço desculpa por não poder citar todos.

À minha querida amiga, Mariana Ceretta De Gregori, minha inspiração de vida, por sua alegria, apoio e confiança.

Aos meus amigos da Universidade Federal do Pampa-RS, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando para que meus sonhos se tornassem realidade. Em especial aos colegas Gian Carlo Ribeiro Billo, Suiane Oleques, Rosana Paim, Darlionei Andreis, Daniela Shimitz e a tantos outros que já peço perdão, pois não será possível citar.

Às pessoas que conheci aqui, *distante de meu “pago”*, e que hoje considero grandes amigos, pois me fizeram dar boas gargalhadas mesmo nos momentos difíceis de saudade e insegurança, João Antônio Siqueira e Jéssica Barros, os quais levarei esta amizade pelos caminhos onde andareis.

Grato de coração ao Professor Wagner L. Araújo, pela orientação e confiança, dedicação, tanto na parte profissional indiscutivelmente qualificado, quanto na grande ajuda na construção dessa dissertação e também pela pessoa que és, sempre expressando suas preocupações com o bem estar de seus orientandos.

Ao Dr. Antônio Batista Pereira que, durante minha graduação, abriu as portas de seu laboratório e acreditou em meu trabalho e dedicação, proporcionando-me uma das maiores experiências científicas de minha vida.

Não poderia deixar de agradecer aqui ao Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, não somente pelos ensinamentos, mas também pelo fato de sua sensibilidade ao entender as dificuldades, mas sempre disposto a ajudar e sanar dúvidas.

Ao nosso “pequeno grande” grupo de “cianobacteriólogos” da UFV, Doutoranda Luna Viggiano e aos bolsistas de iniciação científica, Allan e Naira, pela dedicação e motivação com os trabalhos realizados.

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

Aos amigos do “PES” agradeço muito. Em especial ao “irmão” José Augusto Minussi pelas boas conversas e discussões políticas.

E para finalizar, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos para que obtivesse as condições mínimas de manter minha estadia durante o Mestrado em Viçosa-MG.

ÍNDICE

Resumo	VIII
Abstract	IX
Introdução geral	1
CAPITULO I	
1-Introdução	3
2-Materiais e Método	7
2.1-Obtenção e seleção de linhagens de cianobactérias.....	8
2.2-Characterização morfológica e morfométrica.....	9
2.3-Characterização molecular.....	10
3-Resultados	13
3.1-Characterização morfológica das linhagens.....	14
3.2-Characterização molecular baseada no rRNA 16S.....	18
4-Discussão	22
CAPITULO II	
1-Introdução	24
2-Materiais e Método	27
2.1-Obtenção e seleção de linhagens de cianobactérias.....	27
2.2-Condições de cultivo do pré-inóculo.....	27
2.3-Montagem dos experimentos.....	28
2.4-Determinação de massa seca.....	29
2.5-Curvas de crescimento.....	29
2.6-Ensaio bioquímico.....	30
2.7-Pigmento fotossintetizante.....	30
2.8-Proteínas totais.....	31
2.9-Aminoácidos totais.....	32
2.10-Delineamento experimental e análises estatísticas.....	32
3-Resultados	33
4-Discussão	42
Conclusão Geral	
5-Referências bibliográficas	50

RESUMO

PINTO, Gíllian Nunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Caracterização taxonômica e respostas fisiológicas em cianobactérias morfológicamente distintas.** Orientador: Wagner L. Araújo.

As cianobactérias são micro-organismos aeróbicos fotoautotróficos simples cujos processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é o principal modo de obtenção de energia para o metabolismo desses micro-organismos, cuja origem foi estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos pela descoberta de fósseis na Austrália. Os objetivos desse estudo permeiam a caracterização taxonômica de três linhagens baseando-se em dados morfológicos, moleculares e ecológicos (taxonomia polifásica) e a sua caracterização fisiológica e metabólica em condições de cultivo padrão. Os resultados filogenéticos aqui obtidos indicam classificações de gêneros inéditos para Coleção de Cianobactérias e Microalgas (CCM-UFV) do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Viçosa-MG, demonstrando, assim, a eficiência da abordagem taxonômica polifásica. A caracterização dos parâmetros fisiológicos, metabólicos e de crescimento nas linhagens de cianobactérias sugere que o maior crescimento observado para algumas linhagens está associado, aparentemente, à manutenção do pH do meio e a uma rápida adaptação explicada, ao menos parcialmente, pela morfologia distinta entre as linhagens. Assim, foi possível verificar também o grande potencial da linhagem unicelular *Synechococcus* sp. PCC7942 para a produção de massa seca e proteínas totais. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram também a importância e a necessidade de caracterizações fisiológicas mais detalhadas dos organismos desse filo. Isso se faz necessário não somente com o objetivo de se entender as diferentes morfologias usualmente observadas entre as linhagens, como também para um melhor entendimento das relações metabólicas e moleculares existentes nesse grupo, possibilitando assim a seleção de linhagens com alto potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Cianobactérias, filogenia, fisiologia, metabolismo.

ABSTRACT

PINTO, Gíllian Nunes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Taxonomic characterization and physiological responses in morphologically distinct cyanobacteria.** Adviser: Wagner L. Araújo.

Cyanobacteria are photoautotrophic aerobic micro-organisms. The vital processes of those organisms require only water, carbon dioxide, and inorganic light. Photosynthesis is their primary mode of obtaining energy for metabolism of these prokaryotes micro-organisms. Their origin was estimated at about 3.5 billion years by the discovery of fossils in Australia. Here, we performed a taxonomic characterization of three strains based on morphological data, molecular and ecological (polyphasic taxonomy) coupled with a physiological and metabolic characterization of these selected strains under standard growth conditions. The phylogenetic analysis obtained here demonstrated the efficiency of the polyphasic taxonomic approach and indicated the classification of unprecedented genus available at the Collection of Cyanobacteria and microalgae from the Laboratory of Phycology, Plant Biology Department at the Universidade Federal de Viçosa (UFV). By further performing characterization for growth, physiological, and metabolic traits in three cyanobacterial strains our results suggests that the increased growth of some strains appears to be associated with pH maintainance and rapid adaptation to the medium that is explained, at least partially, by the distinct morphology of the strains. Thus, it was possible to infer the great potential of the unicellular strain *Synechococcus* sp. PCC7942 for dry matter yield and total protein content. The results obtained here also demonstrated the importance and the need of a deep and extensive physiological characterization of organisms of this phylum. This is required not only to further understand the different morphologies usually observed between the strains, but also to obtain a better understanding of the metabolic and molecular relationships exist in this group, thus enabling a more adequate selection of strains for biotechnological potential.

Keywords: Cyanobacteria, phylogeny, physiology, metabolism

INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias (domínio Bacteria, filo Cyanobacteria) são micro-organismos procariotos, gram-negativos, fotoautotróficos oxigênicos e que surgiram na Terra há pelo menos 3,5 bilhões de anos (Schopf, 1993; Altermann; Kazmierczak, 2003). O surgimento destes organismos propiciou um aumento na concentração de O₂ na atmosfera (Buick, 1992). A maquinaria fotossintética presente em cianobactérias é semelhante à das plantas (Stajjier e Cohen-Bazire, 1977), apresentando como produtos finais deste processo basicamente açúcares e O₂. Entretanto, diferentemente das plantas, esses micro-organismos apresentam uma cadeia transportadora de elétrons mista, com a presença de complexos proteicos associados à fotossíntese e à respiração (Lea-Smith et al., 2015).

As cianobactérias possuem clorofila a e os fotossistemas I e II realizando, assim, a fotossíntese em presença de oxigênio. São também as únicas a possuírem ficobilissomos, com os pigmentos acessórios ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina (Reviere, 2006).

Atualmente, a taxonomia destes organismos fundamenta-se na chamada abordagem polifásica, isto é, a identificação taxonômica de acordo com características de múltiplas áreas de pesquisa, tais como morfologia, ecologia, fisiologia, ultraestrutura e biologia molecular (Komárek 2005).

A principal reserva de carboidratos nesses organismos é o glicogênio, um polissacarídeo formado por resíduos de glicose unidos via ligações glicosídicas α -1,4 e ramificações α -1,6. Estes polímeros são de especial interesse, pois podem ser também usados pela indústria para produção de biocombustíveis, incluindo biodiesel e bioetanol (Alam et al., 2012).

Estudos utilizando cianobactérias são particularmente atraentes uma vez que, quando comparados com plantas terrestres, esses organismos apresentam maiores taxas fotossintéticas e ganhos de biomassa em relação ao aproveitamento da energia luminosa. No entanto, pouco ainda se conhece acerca da grande diversidade metabólica e fisiológica do filo Cyanobacteria. Assim, pesquisas são ainda necessárias para se compreender melhor o metabolismo e potencialidades das cianobactérias (Dismukes et al., 2008).

Em função da grande diversidade apresentada pelas cianobactérias, resultando em numerosos tipos morfológicos e genótipos ecologicamente especializados (Anagnostidis e Komárek, 1985), pouco ainda se conhece acerca do seu potencial metabólico, fisiológico e de produção de compostos de interesse. Assim, a caracterização taxonômica das linhagens e de metabólitos primários faz-se altamente pertinente e, em última instância, pode permitir a seleção de micro-organismos úteis do ponto de vista de ciência básica e biotecnológico. Embora seja um grupo filogeneticamente coerente (Kozlikova-Zapomelova et al., 2016), a sistemática das cianobactérias vem sendo constantemente revisada.

Diante dos fatos expostos, o objetivo desse estudo foi caracterizar taxonomica, metabólica e fisiologicamente três linhagens distintas de cianobactérias em condições de cultivo padrão com o intuito de se verificar o crescimento diferencial dessas linhagens. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que as linhagens CCM-UFV034 e CCM-UFV017 estavam previamente classificadas em gêneros distintos aos aqui encontrados. Adicionalmente, vale mencionar que para cada padrão morfológico analisado observaram-se diferenças na fisiologia, metabolismo e crescimento.

CAPITULO I

CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE LINHAGENS DE CIANOBACTÉRIAS MORFOLOGICAMENTE DISTINTAS

1-INTRODUÇÃO

As cianobactérias (domínio Bacteria, filo Cyanobacteria) são micro-organismos procariotos gram-negativos (Feng e Doolittle, 1987). As cianobactérias são fotoautotróficas, ou seja, são capazes de realizar fotossíntese oxigênica, de forma similar aos fotoautotróficos eucarióticos. A fotossíntese oxigênica, além de sua principal função na produção de O₂ permite a fixação do CO₂ e produção de açúcares e outros compostos de interesse. No entanto, alguns grupos de cianobactérias apresentam metabolismo heterotrófico sendo, assim, designados mixotróficos (Govindjee, 2011). Ademais, algumas espécies de cianobactérias são também capazes de realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (Tripp et al., 2010).

Estudos fósseis e moleculares sugerem que esses micro-organismos existam há aproximadamente 2,7 bilhões de anos (Mangan e Brenner, 2014). Estes micro-organismos são amplamente distribuídos em termos geográficos e apresentam adaptações várias que os permitem colonizar diversos habitats (Herdman et al., 2001). Não obstante, as cianobactérias destacam-se por serem produtores primários bem como os primeiros organismos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (Govindjee, 2011). As cianobactérias apresentam papel fundamental no processo da evolução da vida na Terra, pois, além da produção de O₂ via fotossíntese, também participam como agentes nos ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio (Flores e Herrero, 2010).

Com efeito, a fotossíntese requer primeiramente a hidrólise da água, ou seja a quebra da molécula para extração de elétrons, além de uma ação coordenada dos dois fotossistemas (PSI e PSII) gerando, por fim, um gradiente de prótons para produção de energia para células na forma de ATP. No caso específico das cianobactérias, a cadeia transportador de elétrons caracteriza-se por ser mista (CTE MISTA), abrigando em um mesmo trecho de membrana componentes das cadeias fotossintética e respiratória (Tripp et al., 2010). Sendo assim, além do oxigênio, produto da fotossíntese, pode ocorrer a formação de água, como produto da respiração, nas proximidades dessa CTE MISTA. Tendo esta característica em vista, a oxidase terminal pode receber elétrons oriundos do PSII prevenindo, assim, uma redução excessiva dos intermediários da cadeia transportadora de elétrons presente nas membranas dos tilacóides, particularmente em condições de estresse (Barber e Archer 2001).

Ao longo dos últimos anos, as cianobactérias têm sido alvo de vários estudos fisiológicos, metabólicos e de engenharia genética; porém, pouco ainda se sabe acerca da sua diversidade tanto fisiológica quanto taxonômica. Embora seja um grupo filogeneticamente coerente (Kozlikova-Zapomelova et al., 2016), sua sistemática vem sendo constantemente revisada. Inicialmente, a caracterização de linhagens de cianobactérias foi conduzida baseando-se em critérios morfológicos e dados de amostras ambientais, priorizando, assim, informações morfométricas e ecológicas. Cabe ressaltar que se verificou, posteriormente, que essas informações não são muito estáveis (Anagnostidis e Komárek, 1985), fato devido, principalmente, ao ambiente onde tais organismos podiam encontrar-se. Portanto, além dos critérios morfológicos e ecológicos, a incorporação da filogenia molecular (baseada no rRNA 16S, por exemplo) e da análise da ultraestrutura dos tilacóides, como parâmetros para

um correto posicionamento taxonômico das linhagens em estudo faz-se necessária. Adicionalmente, critérios bacteriológicos, como isolamento e manutenção de culturas (Herdman et al., 2001) como, por exemplo, a Coleção de Cianobactérias e Microalgas da Universidade Federal de Viçosa (CCM-UFV), mantida para estudos fisiológicos e moleculares, vêm sendo amplamente difundidos, para que o acesso às linhagens e às informações produzidas seja cada vez mais amplo.

Trabalhos em sistemática, o estudo da classificação biológica, buscam, mais especificamente, descobrir e descrever todos os organismos (Senna e Magrin 1999). Tais estudos são de suma importância para o conhecimento da real diversidade, tanto de organismos cultiváveis quanto de não cultiváveis. Isso não é diferente no caso das cianobactérias, uma vez que esses organismos apresentam numerosos tipos morfológicos e genótipos ecologicamente especializados (Anagnostidis e Komárek, 1985), merecendo, portanto, estudos ainda mais aprofundados. Para identificação taxonômica mais adequada, além dos caracteres morfológicos e de ciclo de vida, com auxílio de bibliografia especializada, seguindo as chaves de classificação previamente descritas (Komárek e Anagnostidis, 2005) e artigos nos quais novos gêneros de cianobactérias vêm sendo descritos, critérios bacteriológicos, como descritos acima, passam a ter fundamental importância. Nesse contexto, a abordagem polifásica tem sido amplamente recomendada para a caracterização taxonômica das linhagens, levando-se em consideração aspectos morfológicos, filogenéticos, ultraestruturais, fisiológicos e ambientais/ecológicos (Hoffmann et al., 2005).

Cabe mencionar a existência de uma grande diversidade morfológica e evolutiva dentro do grupo das cianobactérias, como por exemplo, morfotipos unicelulares (solitárias ou coloniais) e filamentosos (homocitados ou heterocitados

com ramificações verdadeiras ou falsas). Dentre as cianobactérias, apenas a ordem Nostocales apresenta células diferenciadas, denominadas heterócitos e acinetos (Hoffmann et al., 2005). Os heterócitos são células morfológica e fisiologicamente diferenciadas, responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio (FBN); por outro lado, os acinetos são semelhantes a esporos e se caracterizam pela alta resistência a fatores ambientais extremos (células de resistência) (Rajaniemi et al., 2005).

Dessa forma, o principal objetivo deste capítulo foi caracterizar taxonomicamente duas linhagens de cianobactérias, baseando-se em dados morfológicos, moleculares e ecológicos. As análises morfológicas foram obtidas por estudo de morfometria e do ciclo de vida; os dados moleculares foram baseadas no sequenciamento e análise filogenética do gene que codifica para o rRNA 16S; e os ecológicos foram baseados nos dados de coleta das linhagens como dados geográficos, substrato e temperatura.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Obtenção e seleção de linhagens de cianobactérias

Três linhagens de cianobactérias mantidas na Coleção de Cianobactérias e Microalgas (CCM-UFV) do Laboratório de Ficologia, Unidade de Crescimento de Plantas, da Universidade Federal de Viçosa, foram utilizadas nesse trabalho. O sistema de classificação proposto para a classificação de cianobactérias (Hoffmann, et al., 2005) foi utilizado conforme as ordens propostas na Figura 1. A seleção dessas linhagens foi baseada em caracteres morfológicos contrastantes e, assim, foram utilizadas: *Synechococcus* sp. PCC7942, linhagem unicelular isolada a partir de amostras de água doce (Califórnia, EUA, 1973) e gentilmente cedida pelo “Pasteur Culture Collection”, Paris, França; Phormidiaceae CCM-UFV034, linhagem filamentosa homocitada isolada em 2007, a partir de crescimento cianobacterial em balde de descarte de material contaminado com arsênio, presente na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP-UFV), Viçosa, MG, Brasil; Nostocaceae CCM-UFV017, linhagem filamentosa heterocitada isolada a partir de amostras de água doce, coletada no Córrego do Funil (Ouro Preto-MG, Brasil, 2007).

A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 é amplamente caracterizada em termos morfológicos e moleculares e é considerada a linhagem de referência para o gênero *Synechococcus* (Herdman et al., 2001). No entanto, para fins de conferência do material estudado, essa linhagem também foi aqui registrada e teve sua morfometria reanalisada. Dessa forma, apenas as linhagens CCM-UFV017 e CCM-UFV034 foram molecularmente caracterizadas.

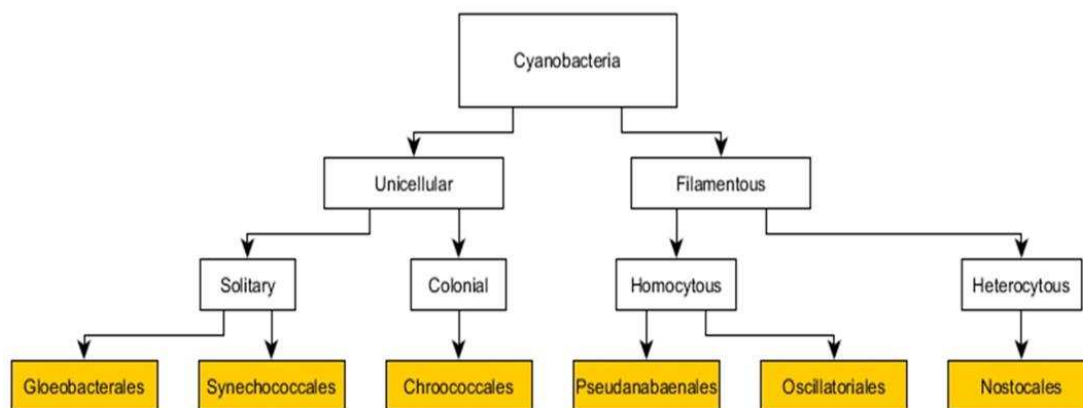


Figura 1. Esquema das seis ordens (caixa em amarelo) propostas para classificação de cianobactérias.

2.2- Caracterização morfológica e morfométrica

A caracterização morfométrica, o registro de imagens e os dados microscópicos foram obtidos com o auxílio de um microscópio Olympus IX50. As medições celulares (morfometria) foram realizadas de acordo com o esquema apresentado na Figura 2. Os registros fotográficos e as medições foram realizados com o auxílio do programa Q Capture Pro7 e para a montagem das pranchas foi utilizado o programa online Pixrl.

Para a linhagem CCM-UFV017, que apresenta células diferenciadas (Figura 2 A), foram analisadas a largura e comprimento de heterócitos (20 células); acinetos (25 células) e células vegetativas em tricomas íntegros (medição de pelo menos 5 células por tricomas em pelos menos 14 tricomas). Na linhagem CCM-UFV034, filamentosa homocitada (Figura 2B), foram medidas células em 15 tricomas, com no mínimo cinco células vegetativas por tricoma. Por fim, para a linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 foram medidas 30 células individualizadas (Figura 2C).

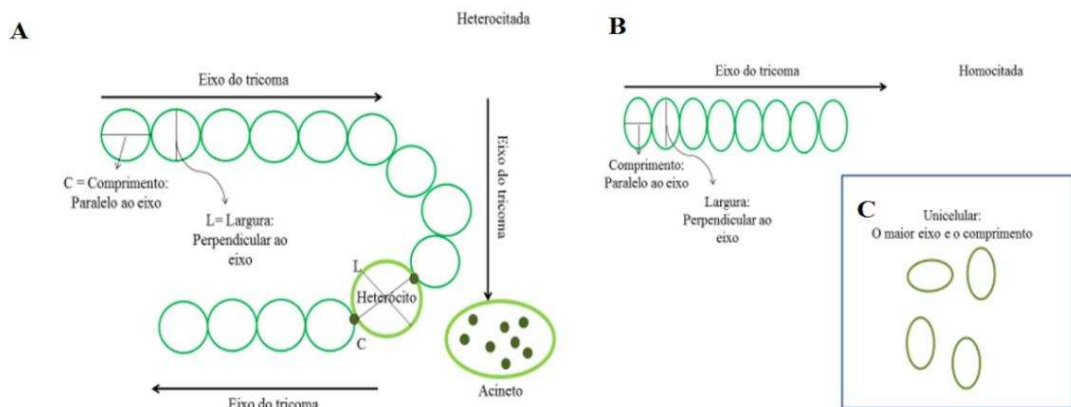


Figura 2. Esquema das análises morfológicas: **(A)** Para linhagens filamentosas heterocitadas; **(B)** Filamentosas homocitadas; **(C)** Linhagens unicelulares.

2.3- Caracterização molecular

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit “UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit”, MO BIO (Carlsbad, CA, EUA), utilizando-se 3 mL de células a partir de culturas-estoque com 10-14 dias de cultivo. Para análise de integridade e estimativa da concentração dos DNAs extraídos ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), foram utilizados 5 μL , aos quais acrescentaram-se 3 μL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25 %, glicerol 30 % e Gel-Red[®] 0,1 % – Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O volume resultante – 8 μL – foi aplicado em gel de agarose 1,2 % e submetido à corrida eletroforética (70 V, por 30 – 35 min) em tampão 1 X TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM pH 8,0). A estimativa de concentração foi feita por comparação com o marcador de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

O fragmento do gene RNAr 16S e a região intergênica 16-23S ITS (aproximadamente 2000 pb) foram amplificados em um produto único utilizado o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F1 (5’-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3’) e 23S30R (5’-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3’), previamente descritos

(Taton et al., 2003). A reação ocorreu em solução contendo tampão para a reação em cadeia da polimerase (PCR) 1 X (20 mM Tris HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl); 0,1 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Brasil); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore[®]) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A ciclagem utilizada foi de acordo com Genuário et al. (2013). As reações foram realizadas em termociclador “ProFlexTM – PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies). Em seguida, a análise do tamanho, concentração e integridade dos produtos de PCR obtidos foi realizada conforme descrito anteriormente para a extração de DNA genômico.

A clonagem dos fragmentos obtidos após as PCRs foi realizada utilizando-se o kit “pGEM[®]-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA). O vetor utilizado possui 3.015 pb e é oferecido linearizado com a enzima de restrição EcoR V e com a adição de 3' terminal timidina nas extremidades. Esse vetor contém sítio de resistência a ampicilina, sítio para múltipla clonagem e um fragmento LacZ. Os procedimentos para a clonagem foram realizados conforme as instruções do fabricante.

O vetor contendo o inserto de interesse foi introduzido em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por meio de transformação por choque térmico. Aliquotas de 10 µL do produto da reação de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes foram adicionadas em microtubos esterilizados, misturadas gentilmente e incubadas em banho de gelo durante 30 min. Após esse período, o microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42 °C e mantido por 40 s sendo, em seguida, resfriado em gelo por 2 min. Posteriormente, foram adicionados ao microtubo 250 µL de meio Luria-Bertani (LB) líquido à temperatura ambiente e a

mistura foi incubada a 36,8 °C durante 1h30min. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (Himedia, Mumbai, Índia), em uma concentração de 25 g·L⁻¹, solidificadas em ágar 1,5 %, e suplementado com ampicilina (100 µg·mL⁻¹) (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (50 µg·mL⁻¹) (Invitrogen Life Technologies). As placas foram incubadas por 14-16 h, em estufa a temperatura constante de 36,8 °C.

Após a incubação das placas, cerca de cinco colônias brancas foram selecionadas e individualmente transferidas para tubos do tipo Falcon (15 mL de volume), contendo 4 mL de meio LB líquido suplementados com ampicilina (100 µg·mL⁻¹). Os tubos foram incubados por 14-16 h em estufa a 36,8 °C, propiciando o crescimento das células transformadas.

Para a confirmação da presença do fragmento do gene 16-23S foi utilizado o conjunto de iniciadores específicos para região V3-V4 do RNAr 16S de cianobactéria, CYA359F (5`-GGGGAATTTTCCGCAATGGG-3`), CYA781aR (5`-GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT-3`) e CYA781bR (5`-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3`), cujo produto sabe-se ter aproximadamente 420 pb (Nübel; Garcia-pichel; Muyzer, 1997). A amplificação foi realizada em solução contendo tampão para PCR 1X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,8; KCl 500 mM; Triton X-100 1 %); 0,2 mM de cada dNTP; 1,0 mM MgCl₂; 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Sinapse Inc.); 0,4 µM de cada iniciador; água ultrapura (Millipore®) esterilizada para um volume final de 12,5 µL. Um total de 1,0 µL da cultura de células de E. coli DH5α foi adicionado a 11,5 µL de PCR, em substituição ao DNA. A reação foi realizada em termociclador “ProFlex™ – PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies).

As extrações de DNA plasmidial foram realizadas com o kit “UltraClean[®] Standard Mini Plasmid Prep Kit”, conforme recomendações do fabricante. Os DNAs plasmidiais extraídos foram visualizados em gel de agarose e quantificados utilizando como referência o marcador de tamanho molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

A PCR para o sequenciamento foi realizada com o uso do kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, EUA). As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) e assentadas em contigs por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (Ewing; Hillier; Wendl, 1998) em sistema operacional Linux. Posteriormente, essas sequências foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Karlin; Altschul, 1990).

3-RESULTADOS

3.1- Caracterização morfológica das linhagens

A linhagem CCM-UFV034 caracteriza-se por ser filamentosa homocitada, ou seja, sem células com diferenciação morfológica como heterócitos e acinetos (Figura 3A, 3B e 3C). As células são em geral quadráticas ou mais largas que longas. Esta linhagem, em função do tipo de tricoma, forma e tamanho celular deve, a princípio, ser incluída dentro da família Phormidiaceae. As células vegetativas da linhagem CCM-UFV034 apresentaram comprimento máximo de 3,15 μm e largura de até 5,03 μm ; já os valores mínimos foram 1,02 μm para comprimento e 3,22 μm largura (Tabela 1).

Tabela 1: Dados morfométricos das linhagens analisadas neste trabalho.

CCM-UFV017	C. Máx	C. Min	L. Máx	L. Min	Média C	Média L	Varição L	Varição C
Cél. Vegetativa	5,82*	3,60	4,90	3,61	4,44	4,34	1,29	0,84
Heterócito	7,49	5,12	5,72	3,65	6,51	4,78	2,07	2,37
Acineto	11,80	7,88	7,91	5,11	10,23	6,41	2,80	3,92
CCM-UFV034								
Cél. Vegetativa	3,15	1,02	5,03	3,22	2,10	4,08	1,81	2,13
PCC7942								
Cél. Vegetativa	2,74	1,51	2,61	1,22	1,90	1,79	1,39	1,23

*Os valores apresentados nesta tabela encontram-se em μm . **C:** comprimento; **L:** largura; **Máx:** valores máximos obtidos em cada medição; **Min:** valores mínimos obtidos em cada medição.

Os resultados morfométricos obtidos para a linhagem CCM-UFV017 mostraram-se bastante interessantes, pois, trata-se de uma linhagem filamentosa heterocitada, com três diferenciações celulares: células vegetativas, heterócitos e acinetos (Figura 3D, 3E e 3F). Essa linhagem apresentou células vegetativas com máximo de 5,82 μm de comprimento e 4,90 μm de largura, ao passo que os heterócitos apresentaram máximos comprimento de 7,49 μm e largura de 5,72 μm .

Ao se avaliar os acinetos, valores máximos de 11,80 μm de comprimento e 7,91 μm de largura foram obtidos (Tabela 1). Os tricomas dessa linhagem são retos ou levemente curvados, apresentando produção de conteúdo mucilaginoso extracelular. Em estágios avançados do cultivo, há intensa presença de acinetos, os quais se diferenciam em cadeia (Figura 3D), com posterior individualização. Os heterócitos intercalares são predominantes sendo rara a observação de heterócitos terminais (Figura 3F). As células vegetativas apresentam, em sua maioria, forma de barril, variando de levemente quadráticas a mais longas do que largas e com constrição bastante evidente.

A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentou valores máximos de 2,74 μm de comprimento e 2,61 μm de largura, compatível com a morfologia em cocos ou levemente bacilar (Tabela 1), correspondendo ao comumente registrado na literatura (Jezberová e Komárková 2007). Células individualizadas foram predominantes (Figura 3G, 3H e 3I), com formação esporádica de pseudofilamentos.

Na linhagem CCM-UFV017 foi possível, com os resultados de microscopia, observar que as células diferenciais da linhagem filamentosa heterocitada apresentaram tricomas com colorações distintas. Esse fato encontra-se associado diretamente a quantidade de pigmentos fotossintetizantes (Figura 4A). Nas imagens microscópicas foram observadas células diferenciando-se em acineto, (Figura 4B) e com um tamanho superior em relação às células vegetativas e ainda com acúmulo visível de grânulos de reserva (Figura 4D). Heterócitos, que são células especializadas na fixação do nitrogênio atmosférico, também foram observados (Figura 4C).

Em algumas etapas do ciclo de vida foram observados pequenos tricomas semelhantes a hormogônios (Figura 4E). No entanto, a aparente ausência de

vesículas gasosas e de motilidade por deslizamento não permitem a caracterização destes pequenos tricomas como hormogônios. Uma possibilidade é se tratar de tricomas recém-germinados a partir de acinetos desdiferenciados.

A linhagem CCM-UFV034 (filamentosa homocitada) apresenta características muito semelhantes às encontradas no gênero *Phormidium*, tais como presença de bainha e células apicais com morfologia distinta das demais células vegetativas. Na linhagem CCM-UFV034 foi observado uma grande variação morfológica entre as células, principalmente nas células apicais da linhagem. Estas, geralmente, eram mais amareladas e maiores que as demais células. . As células terminais são arredondadas na extremidade, diferentemente das demais células vegetativas (Figura 4F, 4G e 4H). Em algumas situações percebeu-se que os tricomas encontravam-se paralelamente uns aos outros, como na Figura 4I.

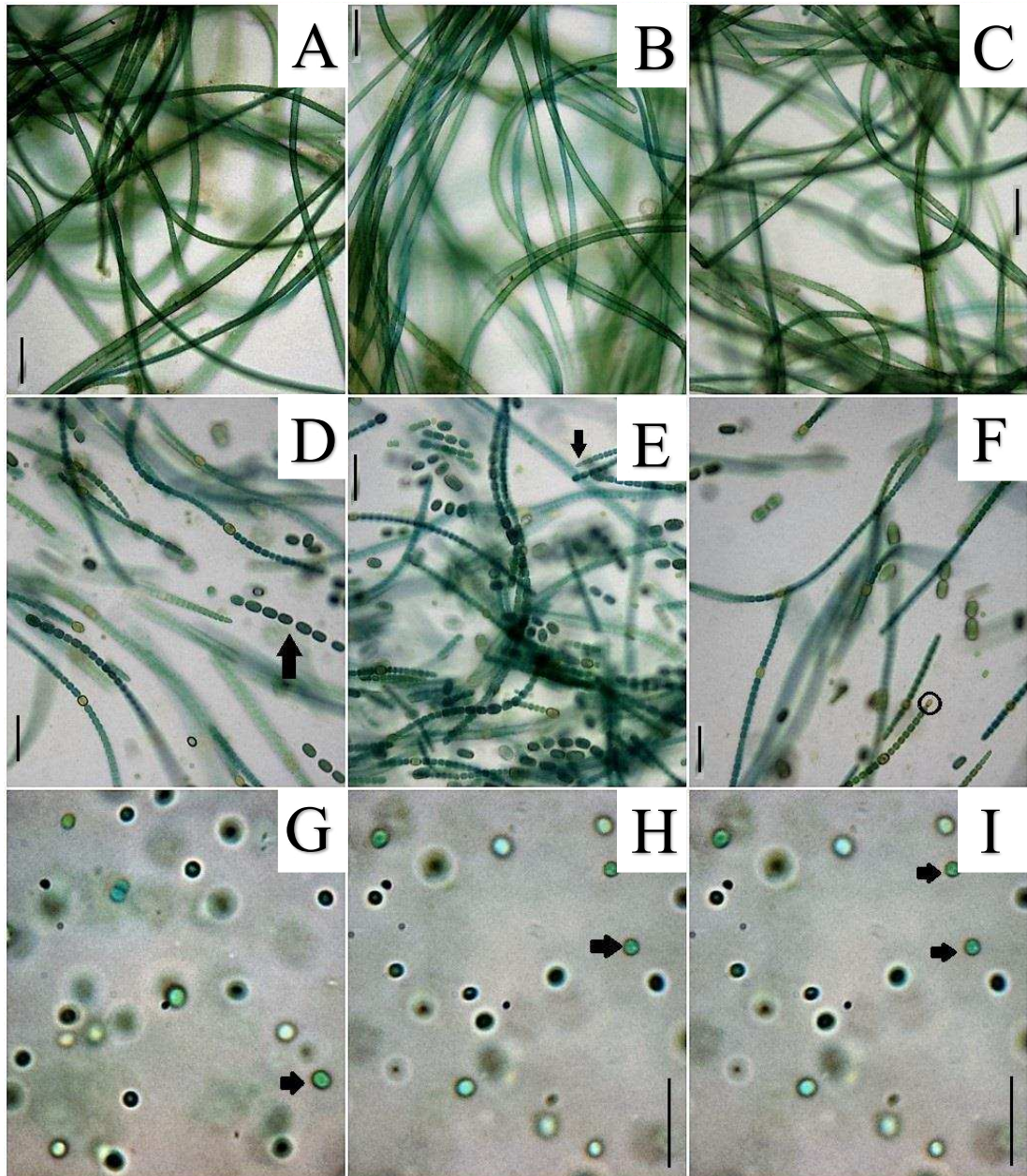


Figura 3. Micrografias das linhagens em estudo. (A), (B) e (C) Tricomas da linhagem CCM-UFV034; (D), (E) e (F) Tricomas da linhagem CCM-UFV017; (G), (H) e (I) Células da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942; (D) Seta aponta para acinetos em cadeia; (E) Seta aponta a morfologia diferenciada de uma célula terminal; (F) Círculo ressaltando possível heterócito terminal; (G), (H) e (I) Setas apontam células isoladas; As imagens (A), (B), (C), (D), (E) e (F) estão em escala de 20 μm ; (G), (H) e (I) estão em escala de 10 μm .

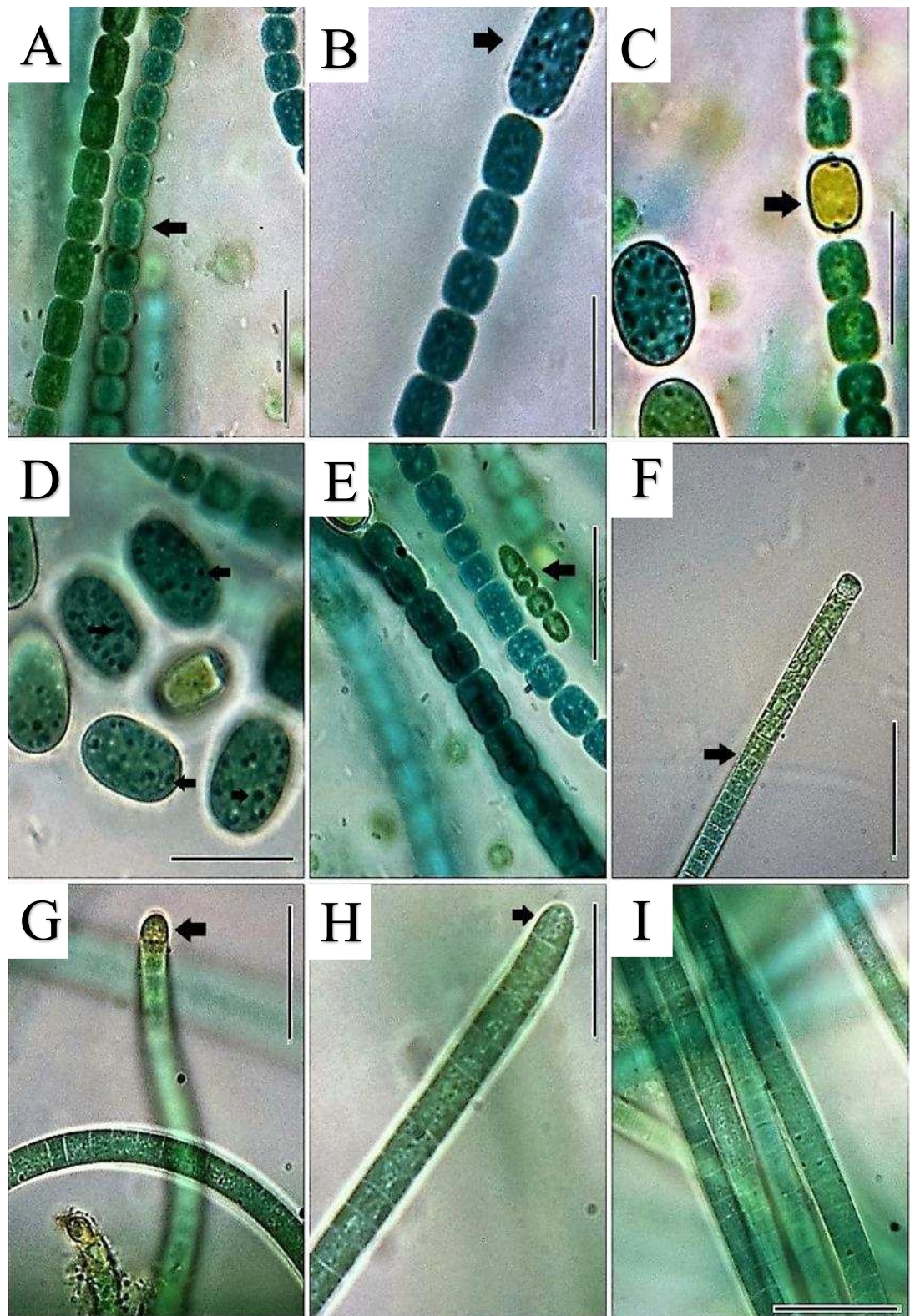


Figura 4. Micrografias das linhagens em estudo. As imagens (A) - (E) correspondem à linhagem CCM-UFV017. As imagens identificadas com as letras (F) - (I) correspondem à linhagem CCM-UFV034. As setas indicam: (A) Célula vegetativa em fissão binária; (B) Formação de um acineto a partir de uma célula vegetativa; (C) Heterócito intercalar; (D) Grânulos de reserva em acineto; (E) Hormogônio (tricoma diferenciado geralmente em condição de estresse); (F) Células vegetativas; (G) Célula apical diferenciada denominada caliptra; (H) Célula apical em diferenciação morfológica; (H) Presença de bainha. (I) Tricomas homocitados típicos da linhagem CCM-UFV034. Barra de escala = 10 μm .

3.2- Caracterização molecular baseada no rRNA 16S

Duas sequências do gene que codifica para o rRNA 16S foram obtidas sendo uma com 851 pares base (pb) para a linhagem CCM-UFV034 e outra com 1414 pb para a linhagem CCM-UFV017. A comparação entre essas sequências e outras disponíveis no GenBank mostrou valores de identidade que variaram de 90,8 a 99,2 % (Tabela 2). A sequência obtida da linhagem CCM-UFV017 apresentou valores de identidade $\geq 98,5$ % com sequências de morfotipos do gênero *Trichormus*. No entanto, valores de identidade maiores que 97 % foram obtidos em relação a sequências dos gêneros *Anabaena* e *Hydrocoryne*. Por outro lado, para a sequência da linhagem CCM-UFV034, os maiores valores de identidade (≥ 94 %) foram com sequências afiliadas ao gênero *Ancylothrix*, o qual foi recentemente descrito a partir de morfotipos inicialmente descritos como pertencentes ao gênero *Phormidium* (Martins et al., 2016).

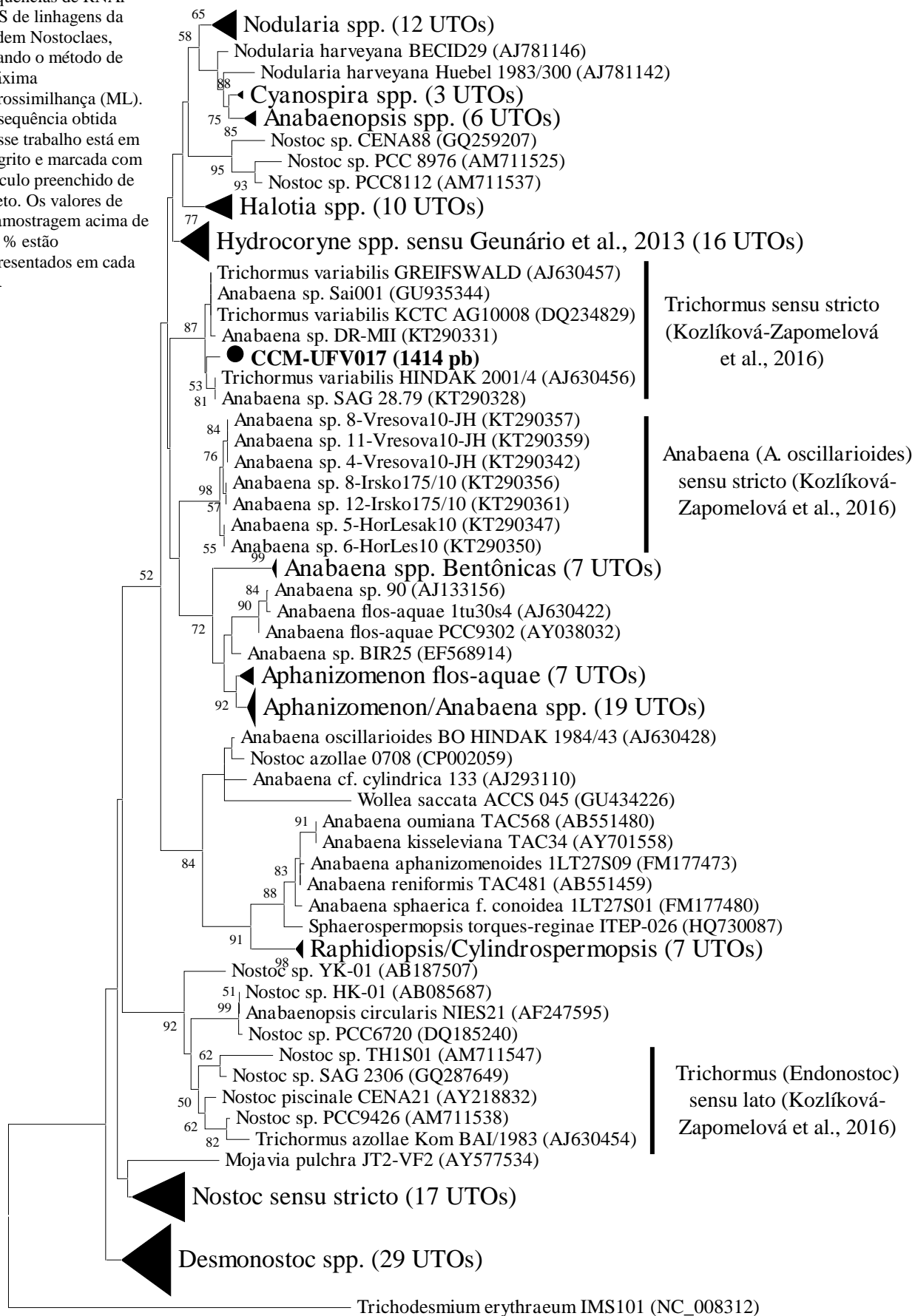
A árvore filogenética obtida a partir de linhagens com morfotipos heterocitados indicou que a sequência de rRNA 16S da linhagem CCM-UFV017 se agrupou com 87 % de valor de bootstrap com sequências afiliadas a morfotipos dos gêneros *Anabaena* e *Trichormus* (Figura 5). Esse clado abriga a sequência da linhagem reconhecida como referência do gênero *Trichormus*, *T. variabilis* HINDAK 2001/4 (Rajaniemi et al., 2005) (Figura 5). No caso da linhagem CCM-UFV034, sua sequência ficou agrupada com sequências de linhagens do gênero *Ancylothrix*, sem suporte por análise de bootstrap. No entanto, esse clado apresentou dois subgrupos internos, os quais apresentaram valor de bootstrap de 88 e 77 %, respectivamente (Figura 6).

Tabela 2. Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S geradas neste estudo e sequências^a previamente depositadas no GenBank

Código	Identificação Morfológica	Tamanho (pb)	Organismo mais próximo no GenBank (nº de acesso)	C* (%)	I** (%)
CCM-UFV017	Anabaena sp. CCM-UFV017	1414	Trichormus variabilis HINDAK 2001/4 (AJ630456)	100	99,2
			Trichormus variabilis GREIFSWALD (AJ630457)	100	98,5
			Anabaena sp. SAG 28.79 (KT290328)	98	99,1
			Anabaena catenula SAG 1403-1 (KT290323)	98	98,6
			Anabaena viguieri SAG 27.79 (KT290327)	97	98,6
			Anabaena sp. DR-MII (KT290331)	96	98,5
			Hydrocoryne sp. CENA393 (KC346265)	100	97,2
			Anabaena augstumalis SCMIDKE JAHNKE/4a (AJ630458)	100	97,2
			Hydrocoryne sp. UFV-ANT32 (KC346268)	100	97,1
			Hydrocoryne sp. UFV-ANT31 (KC346267)	100	97,1
			Hydrocoryne sp. CENA398 (KC346266)	100	97,1
Anabaena cylindrica PCC7122 (NR_102457)	100	97,1			
CCM-UFV034	Phormidium sp. CCM-UFV034	851	Ancylothrix sp. 13PC (KT819202)	100	97,5
			Ancylothrix sp. 11PC (KT819200)	100	97,5
			Ancylothrix sp. 10PC (KT819199)	100	97,5
			Ancylothrix sp. 12PC (KT819201)	100	97,4
			Ancylothrix sp. 9PC (KT819198)	100	94,0
			Ancylothrix sp. 7PC (KT819196)	100	94,0
			Ancylothrix sp. 8PC (KT819197)	100	93,9
			Phormidiaceae cyanobacterium CENA533 (KF246499)	99	91,0
			Lyngbya sp. MA2 (AB857842)	99	90,9
			Lyngbya sp. MaedaD5 (AB863124)	99	90,9
			Geitlerinema cf. acuminatum CCALA 141 (EU196627)	99	90,8
Arthrospira platensis Sp-11 (DQ279771)	99	90,8			

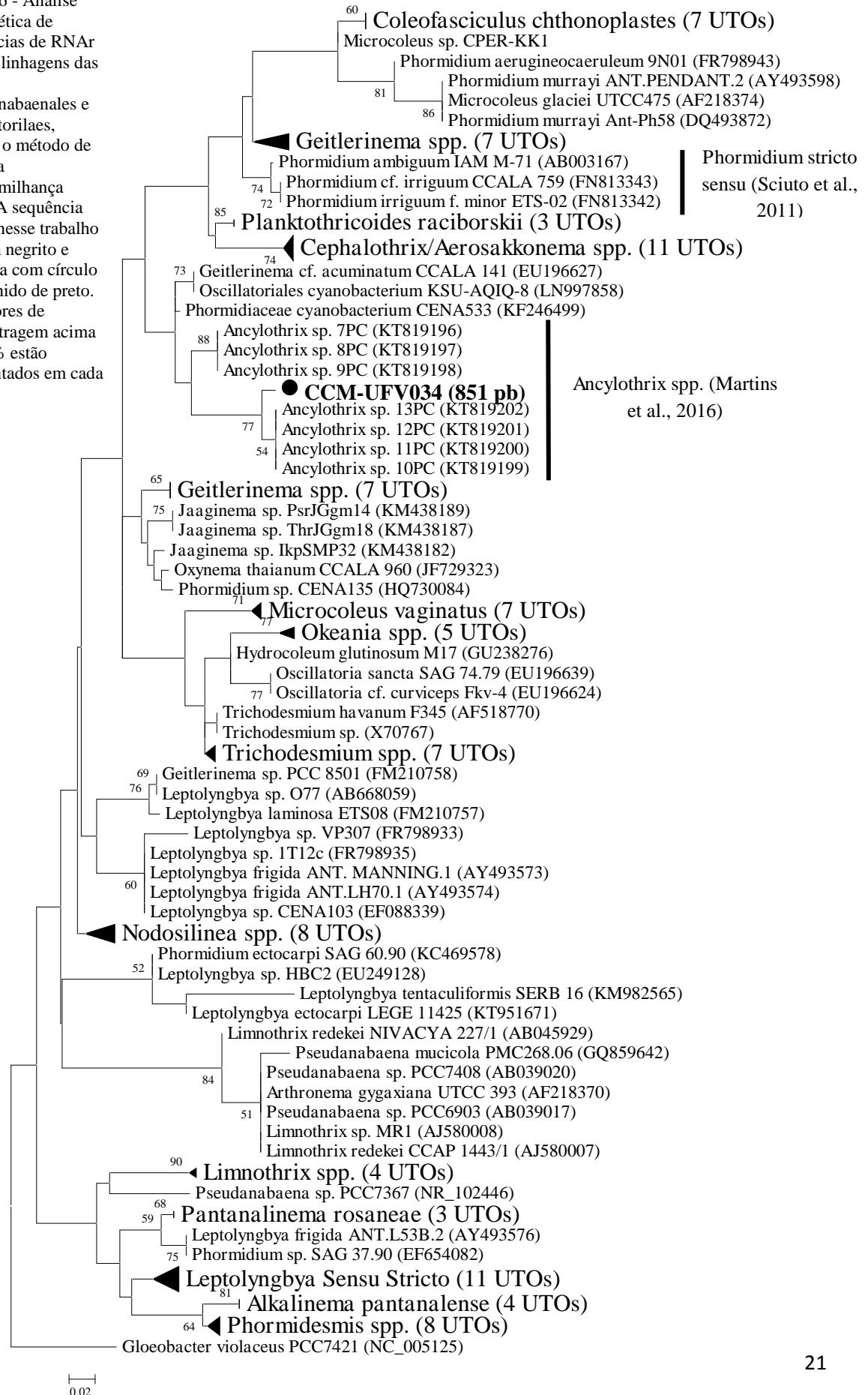
^aSequências publicadas e obtidas de linhagens cultiváveis, *Cobertura, ** Identidade

Figura 5 - Análise filogenética de sequências de RNAr 16S de linhagens da ordem Nostociales, usando o método de máxima verossimilhança (ML). A sequência obtida nesse trabalho está em negrito e marcada com círculo preenchido de preto. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



0.02

Figura 6 - Análise filogenética de seqüências de RNAr 16S de linhagens das ordens Pseudanabaenales e Oscillatoriales, usando o método de máxima verossimilhança (ML). A seqüência obtida nesse trabalho está em negrito e marcada com círculo preenchido de preto. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



0.02

4-DISCUSSÃO

Os dados apresentados aqui fornecem as primeiras evidências acerca de duas linhagens morfológicamente distintas de cianobactéria disponíveis na CCM-UFV obtidos a partir de uma abordagem polifásica baseada em dados morfológicos, ecológicos, fisiológicos e moleculares. Assim, a linhagem CCM-UFV034 apresenta características morfológicas semelhantes às da ordem Oscillatoriales (Perkerson et al., 2011), que se trata de uma ordem bem definida e distinta, englobando vários gêneros como, por exemplo, *Phormidium*. Nas análises morfológicas a linhagem apresentou tricomas longos e homocitados, com células mais largas que longas (Tabela 1). É importante mencionar que, além dos caracteres acima mencionados, a linhagem apresentou características muito semelhantes às encontradas no gênero *Phormidium*, tais como presença de bainha, ausente em alguns gêneros como *Planktothrix* e *Trichodesmium* e células apicais com morfologia distinta das demais células vegetativas (Capone et al., 1997; Komárek e Anagnostidis, 2005). Assim, tomados em conjunto, esses dados indicam que a linhagem CCM-UFV034 se assemelha morfológicamente ao gênero recentemente descrito *Cephalothrix* (Malone et al., 2015). As células vegetativas da CCM-UFV034 apresentaram ainda comprimento médio de 2,10 μm e largura de 4,08 μm (Tabela 1), valores próximos aos previamente descritos para o gênero *Cephalothrix* (Malone et al., 2015). Ademais, as células terminais modificadas, com presença de caliptra são uma importante característica que possibilita diferenciar a linhagem CCM-UFV034 de outros morfotipos de *Phormidium*, bem como de outros gêneros recém-descritos, como *Oxynema* (Chatchawan et al., 2012).

Cumprir mencionar também que as análises moleculares aqui realizadas, incluindo a tabela de identidade e a reconstrução filogenética, corroboraram os dados

morfológicos de inclusão da linhagem CCM-UFV034 dentro da família Phormidiaceae (ordem Oscillatoriales). Adicionalmente, esta linhagem parece ser uma nova espécie dentro do gênero *Ancylothrix*. Não obstante, para uma definição final sobre o posicionamento taxonômico dessa linhagem será importante analisar a morfologia de linhagens daquele novo gênero, comparando-a com a morfologia da CCM-UFV034. É importante mencionar aqui que essa comparação não foi realizada neste capítulo, uma vez que a versão definitiva do artigo que descreve o gênero *Ancylothrix* não se encontra ainda disponível para consulta. Além disso, a região genômica correspondente ao rRNA 16S será novamente sequenciada para esta linhagem, objetivando a obtenção de uma sequência completa, tornando as análises sobretudo mais robustas. Adicionalmente, outros marcadores moleculares, como a região ITS, também serão utilizados para uma melhor resolução taxonômica da linhagem CCM-UFV034. Espera-se, portanto, uma completa definição acerca dessa linhagem com a possível descrição de uma nova espécie.

As características morfológicas apresentadas pela linhagem CCM-UFV017 colocam-na dentro da ordem Nostocales, família Nostocaceae, possivelmente do gênero *Trichormus*, em função de heterócitos predominantemente intercalares, formação de acinetos em pontos não adjacentes aos heterócitos e ausência de colônias microscópicas e hormogônios. De acordo com os dados moleculares, principalmente a reconstrução filogenética, a sequência de rRNA 16S desta linhagem agrupou-se com 87 % de valor de bootstrap com sequências obtidas de linhagens associadas à espécie-tipo de gênero *Trichormus*. Esses dados estão de acordo com os resultados de identidade e, juntamente com as análises de morfologia, permitem a classificação da linhagem CCM-UFV017 como *Trichormus* sp.

CAPITULO II

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA DE TRÊS LINHAGENS DE CIANOBACTÉRIAS COM CARACTERES MORFOLÓGICOS DISTINTOS

1-INTRODUÇÃO

As cianobactérias são possivelmente um dos grupos mais importantes como produtores primários e em produção de oxigênio. Adicionalmente, as cianobactérias são altamente bem-sucedidas em termos ecológicos sendo organismos cosmopolitas encontrados nos mais diversos ambientes. Tal fato se justifica, ao menos em parte, pelo fato de as cianobactérias serem organismos com várias morfologias e uma alta plasticidade metabólica (Rajaniemi et al., 2005).

É possível verificar a presença de cianobactérias nos mais diversos ambientes, sejam com temperaturas variadas, radiações contaminantes ou mesmo locais com variada disponibilidade de nutrientes, dentre outros fatores (Flores e Herrero, 2010). É importante salientar que variações ambientais e temporais no que respeita irradiância, principalmente, CO₂ e O₂ parecem funcionar como força motriz para a evolução, aquisição de genes e propriedades fisiológicas nos mais diversos organismos (Price et al., 2008).

As cianobactérias ocupam os mais variados nichos ecológicos apresentando, portanto, grande diversidade em termos de habitat, fisiologia, morfologia, capacidade metabólica e propriedades moleculares (Lussier, et al., 2006). Acredita-se que estes fatores tenham sido importantes para o sucesso evolutivo e ecológico das cianobactérias (Beck et al., 2012). 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). Nesse contexto, as cianobactérias apresentam uma grande plasticidade metabólica e morfológica dentro do domínio Bacteria (Wright et al., 2001). Essa plasticidade pode ser observada pela sua capacidade de redução do dióxido de carbono via fotossíntese e também da fixação biológica do nitrogênio atmosférico realizada por alguns grupos (Skulberg e Utkilen, 1999). Tomadas em conjunto, tais características contribuem grandemente para a fertilidade dos solos e águas, tornando esses organismos de fundamental importância.

Apesar de sua natureza tipicamente fotossintética aeróbica, algumas cianobactérias são heterotróficas facultativas, crescem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (Kaźmierczak e Iryu, 1999). Por apresentarem um sistema fotossintético altamente eficiente na conversão e fixação de carbono (Mangan e Brenner, 2014), as cianobactérias vêm sendo alvo de vários estudos fisiológicos, metabólicos e de engenharia genética. Esses estudos são particularmente atraentes uma vez que estes organismos, quando comparados com as plantas terrestres, apresentam maiores taxas de fotossíntese, fixação de carbono e ganho em biomassa. 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).

Cianobactérias, assim como algumas plantas, possuem mecanismos concentradores de carbono (CCM). De maneira particular, em cianobactérias destaca-se a presença dos carboxissomos, que se caracterizam por serem envoltórios proteicos que concentram enzimas como rubisco e anidrase carbônica. Esse fato culmina com a capacidade de inibir a fotorrespiração, potencializando assim a fotossíntese e o ganho em biomassa (Durrall e Lindblad, 2015). 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). Registre-se também que pouco ainda se conhece acerca da enorme biodiversidade presente no filo Cyanobacteria e, dessa forma, um melhor entendimento sobre o seu metabolismo e potencialidades é ainda necessário (Dismukes et al., 2008). Coletivamente, essas informações se traduzem em um grande potencial no uso de cianobactérias com vistas a aplicações biotecnológicas.

Diante do exposto acima e levando-se em consideração a grande diversidade apresentada pelas cianobactérias, que resulta em numerosos tipos morfológicos e genótipos ecologicamente especializados (Anagnostidis e Komárek, 1985), é plausível sugerir a existência de um grande, mas inexplorado potencial metabólico, fisiológico e de produção de compostos de interesse por estes organismos. Portanto, a presente proposta buscou analisar o crescimento e algumas respostas metabólicas em três linhagens de cianobactérias com caracteres morfológicos distintos, cultivadas em condições padrão. Também se objetivou a obtenção de informações que possam, futuramente, ser usadas para fins biotecnológicos, em indústrias farmacêuticas, alimentícias ou até mesmo pela indústria de biocombustíveis. Essa pormenorizada caracterização possibilitou a inferência dos distintos mecanismos de crescimento e de aclimação metabólica diferencial em cianobactérias morfológicamente distintas.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Obtenção e seleção de linhagens de cianobactérias

Três linhagens de cianobactérias foram utilizadas, as quais são mantidas na Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Laboratório de Ficologia (CCM-UFV). A seleção dessas linhagens foi baseada em caracteres morfológicos contrastantes e, assim, foram utilizadas: *Synechococcus* sp. PCC7942, linhagem unicelular; *Ancylotrix* sp. CCM-UFV034, linhagem filamentosa homocitada e *Trichormus* sp. CCM-UFV017, linhagem filamentosa heterocitada.

A linhagem *Synechococcus* sp. PCC 7942 tem sido bem caracterizada em termos morfológicos e moleculares e é considerada a linhagem de referência para o gênero *Synechococcus* (Herdman et al., 2001). Essa linhagem foi selecionada, pois, por ser amplamente estudada, os resultados gerados nesse trabalho puderam ser comparados com os previamente registrados na literatura. Adicionalmente, essa linhagem foi utilizada como padrão comparativo em relação às linhagens CCM-UFV017 e CCM-UFV034, sobre as quais esse trabalho é a primeira referência.

2.2-Condições de cultivo do pré-inóculo

As culturas estoque de cada linhagem foram mantidas em sala de crescimento em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 50 mL de meio de cultivo BG-11 (Rippka et al., 1979) com ou sem (BG-11₀) adição de nitrogênio (N), de acordo com as exigências fisiológicas das linhagens. Para a produção de inóculos, alíquotas de 1000 µL foram retiradas das culturas estoque e inoculadas em Erlenmeyers (1 L de volume) contendo 250 mL de meio de cultivo. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro), temperatura de 24 ± 2 °C, intensidade

luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e sem agitação durante o período de produção do pré-inóculo dos experimentos.

2.3-Montagem dos experimentos

Os experimentos foram montados em frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo 60 mL de meio de cultivo BG-11 para as três linhagens. Adicionalmente, o meio BG-11₀ (sem suplementação por N) foi utilizado para a linhagem CCM-UFV017. A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 não realiza fixação biológica do nitrogênio, e para a linhagem CCM-UFV034 essa informação ainda não é conhecida; no entanto, sabe-se que algumas cianobactérias homocitadas podem realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN) atmosférico (Tobergte e Curtis 2013). A linhagem CCM-UFV017 é capaz de realizar a FBN sendo normalmente mantida em meio BG-11₀, o qual não contém fonte inorgânica de nitrogênio. Com o intuito de verificar o crescimento dessa linhagem em meio suplementado com nitrogênio (uso de meio BG-11) e suas consequências metabólicas e fisiológicas, optou-se pela realização deste teste.

Para a montagem dos experimentos e confirmação da quantidade inicial de células utilizadas como inóculo, utilizou-se a determinação de densidade óptica (turbidez), em comprimento de onda de 750 nm ($\text{DO}_{750\text{nm}}$). Esse comprimento de onda tem sido sugerido, bem como o de 730 nm, pois ambos evitam a interferência de pigmentos fotossintéticos na determinação dos valores de absorbância. Os experimentos foram padronizados para terem ao seu início um inóculo com valor inicial de $\text{DO}_{750\text{nm}} = 0,1$. Os experimentos foram conduzidos com 4 repetições ($n=4$), por um período total de 9 dias, totalizando 10 pontos amostrais, sendo o primeiro ponto (P0) equivalente ao dia da montagem do experimento.

2.4-Determinação de massa seca

A determinação do ganho de biomassa dos cultivos, ou seja, a análise dos sólidos totais das amostras foi realizada conforme procedimento descrito no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, de 2005, com adaptações. Para esta determinação foram utilizadas membranas de nitrato de celulose, com poros de 0,22 μm e diâmetro de 47 mm previamente secas em estufa a 60 °C por 24h. Após esse período as membranas foram transferidas para dessecador, sendo mantidas por 30 minutos (suficiente para atingir temperatura ambiente e constante) e, em seguida, pesadas em balança analítica eletrônica.

Para a determinação do incremento em biomassa, 10 mL de suspensão homogênea do cultivo foram filtrados em membranas previamente secas e pesadas, as quais foram acopladas a um sistema de filtração ao vácuo. Após a filtração completa, a membrana contendo a biomassa aderida foi seca em estufa a 60 °C por um período de 24 h. A determinação da massa foi realizada conforme descrito para a membrana. Desta forma, a biomassa seca correspondeu ao valor da massa da membrana após filtração subtraída pela massa da membrana limpa.

2.5-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 60 mL de meio BG-11, para as três linhagens, e BG-11₀ para a linhagem CCM-UFV017. As curvas de crescimento foram interrompidas após o décimo dia de experimento.

2.6-Ensaio bioquímico

Para os ensaios bioquímicos, as amostras foram coletadas de 24 em 24 h ao longo das curvas de crescimento. Alíquotas de 5 mL obtidas durante as amostragens foram centrifugadas a $13.000 \times g$ e o sobrenadante descartado. Em seguida, estas alíquotas foram ressuspensas em 2 mL de meio BG-11 e transferidas para microtubos de 2 mL, novamente centrifugadas a $13.000 \times g$, sendo o sobrenadante descartado. O pélete foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para seu uso a posteriori.

Os ensaios bioquímicos foram realizados para as amostras coletadas em 4 pontos de cada curva de crescimento. Esses pontos foram selecionados por serem considerados relevantes, uma vez que caracterizavam cada uma das fases de crescimento: (P0) = dia inicial do experimento; (P3) final da fase lag ou início da fase log; (P6) ponto dentro da fase log; e (P9) ponto final do experimento, coincidente com a fase estacionária.

2.7-Pigmento fotossintetizante

Para a extração de clorofila a foram utilizados 5 mL de cultura. Esse volume foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 8 minutos, submetendo-se o precipitado a extração etanólica a quente. Para isso foram adicionados 250 μL de etanol 98 % (v/v) aos microtubos que continham as alíquotas. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação constante de 500 rpm. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $15.000 \times g$ a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo microtubo de 2 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 precipitados resultantes armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração de clorofila a foi determinada espectrofotometricamente imediatamente após a extração, sendo a absorbância determinada a 665 nm. A concentração de clorofila a (chl a) foi expressa em $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de massa seca, sendo os valores de absorbância multiplicados por 13,9 (coeficiente de extinção molar da clorofila a neste conjunto de solventes), seguida de correção em relação aos volumes de extrato utilizados (Porra et al., 1989).

2.8-Proteínas totais

Para extração de proteínas totais foram utilizados 5 mL de cultura, os quais foram centrifugados a $15.000 \times g$ por 8 min e ressuspendidos em 1 mL de solução salina. Após nova centrifugação a $10.000 \times g$ por 8 min, 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 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguidos de resfriamento em gelo por 5 minutos. Em seguida ao resfriamento, adicionou-se ao extrato obtido 125 μL de HCl (0,4 M), procedendo-se a homogeneização e nova centrifugação a $11.000 \times g$ por 10 minutos. Por fim, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para placa de ELISA, os quais foram mantidos à temperatura ambiente por 20 minutos no escuro. 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 das concentrações de proteínas totais a absorbância da solução foi determinada a 750 nm (Randall e Lewis, 1951).

2.9-Aminoácidos totais

A concentração de aminoácidos totais foi determinada como previamente descrito (Morgan et al., 2008). Para este ensaio utilizou-se o pélete obtido do extrato etanólico proveniente dos mesmos 5 mL de cultura. O precipitado obtido foi submetido a extração etanólica a quente, como descrito acima. 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 absorbância a 550 nm para a determinação da concentração de aminoácidos totais, contra uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de leucina.

2.10-Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado sendo realizadas 4 repetições para cada tratamento. Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$) utilizando-se o software ASSISTAT 7.7. As figuras foram organizadas utilizando-se o software SIGMAPLOT 11.0. As análises de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram realizadas no EXCEL 2016.

3-RESULTADOS

3.1-Curvas de crescimento

Foi possível observar para a linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, em DO_{750nm} , uma pequena fase lag com duração de apenas 24 h (Figura 1A). A fase log foi bastante evidente para essa linhagem iniciando-se no ponto 1 (P1) e terminando no ponto 6 (P6) ao passo que a fase estacionária teve início no ponto 6 (P6) com leve declínio ao final do experimento (Figura 1A).

A linhagem CCMUFV034 apresentou uma maior fase lag, do ponto 0 (P0) até o ponto 4 (P4), enquanto a fase log foi do ponto 4 (P4) ao ponto 9 (P9). Assim, para essa linhagem não foi possível observar uma fase estacionária no período de análise (Figura 1B).

A linhagem CCMUFV-017 quando cultivada em meio BG-11 não apresentou uma fase lag; ademais, sua fase log durou até o sexto dia de cultivo momento a partir do qual houve uma clara desaceleração do crescimento (Figura 1C). Em seguida, a partir dos dias 6-7, esta linhagem entrou em fase estacionária (Figura 1C). Essa mesma linhagem quando cultivada em meio BG-11₀ apresentou um padrão similar de cinética de crescimento, com uma fase lag inexistente e iniciando a fase de desaceleração no ponto 5 (Figura 1D).

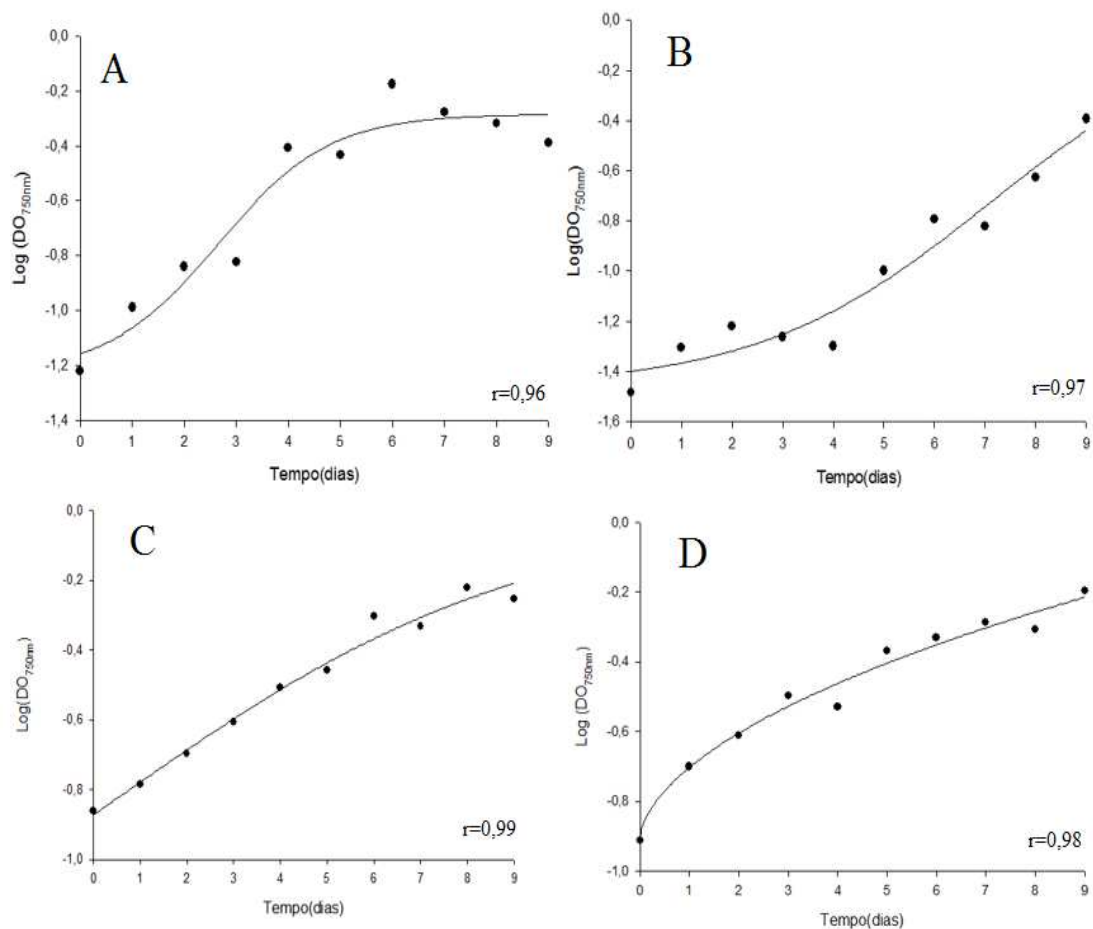


Figura 1: Curvas de crescimento das linhagens *Synechococcus* sp. PCC7942 (A), CCM-UFV034 (B), CCM-UFV017 em meio BG-11 (C) e CCM-UFV017 em meio BG-11₀ (D). No eixo Y, log de DO_{750nm}; no eixo X, o tempo em dias. Aos dados amostrais aplicou-se uma curva sigmoial para análise do perfil de crescimento; os valores de r representam o quanto a curva se ajusta aos pontos amostrais.

As curvas de crescimento obtidas a partir de dados de incrementos de massa seca (Figura 2) apresentaram perfis bastante similares aos obtidos com a DO_{750nm} como parâmetro de crescimento (Figura 1). A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 (Figura 2A) não apresentou fase lag evidente, tendo a fase log durado até o quarto dia. No quinto dia observou-se uma clara desaceleração, seguida de fase estacionária, a partir do dia 6 sem entrar, no entanto, em fase de declínio (morte) (Figura 2A).

A linhagem CCM-UFV034, corroborando os dados obtidos por DO_{750nm}, apresentou uma maior fase lag, que durou até o quarto-quinto dia de cultivo (Figura

2B). Em seguida uma fase log foi evidenciada, a qual se estendeu até o final do experimento. Assim, para essa linhagem não foi possível observar a fase estacionária expressa em termos de massa seca, durante os 9 dias de experimento (Figura 2B).

A linhagem CCM-UFV-017 cultivada em meio BG-11 não apresentou uma fase lag quando expressa a partir de massa seca (Figura 2 C). A fase log se prolongou até o dia 4, sendo seguida por 24 horas de desaceleração e uma fase estacionária a partir do dia 6. A mesma linhagem quando cultivada em meio BG-11₀ (Figura 2D) apresentou um padrão temporal bem distinto de quando cultivada em meio BG-11 (Figura 2C). Novamente não se observou uma fase lag evidente; no entanto, a fase log teve apenas 48 horas de duração. Após o segundo dia de cultivo observou-se uma tendência de desaceleração, com fase estacionária a partir dos dias 3-4 (Figura 2D).

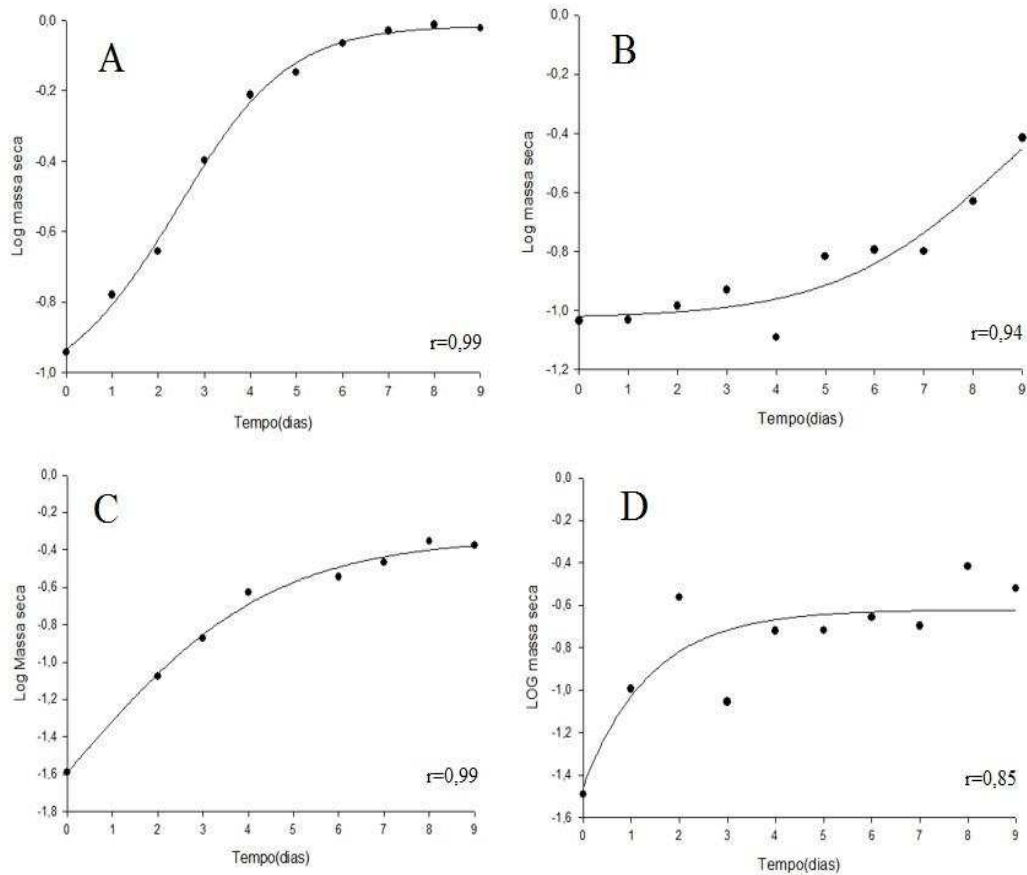


Figura 2: Curvas de crescimento baseadas em incremento de massa seca (Log de massa seca - mg·mL⁻¹). (A) *Synechococcus* sp. PCC7942; (B) CCM-UFV034; (C) CCM-UFV017 em meio BG-11 e (D) CCM-UFV017 em meio BG-11₀. Aos dados amostrais aplicou-se uma curva sigmoidal para análise do perfil de crescimento e os valores de *r* representa o quanto a curva se ajusta aos pontos amostrais.

As análises de pH, realizadas a cada 24 horas, revelaram um padrão semelhante entre as diferentes linhagens, com tendências de aumento ao longo do período de cultivo com valor de pH fluando entre 6 e 11 (Figura 3). A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, ao final do cultivo, apresentou os maiores valores de pH (aproximadamente 11,0) dentre as linhagens estudadas (Figura 3). A linhagem CCM-UFV017, quando cultivada em meio BG-11₀ apresentou valores de pH relativamente estáveis (5,5 – 7,0) e inferiores aos observados quando do cultivo em meio BG-11 (6,0 – 9,5). A linhagem CCM-UFV034 apresentou valores de pH

variando entre 6,0 e 8,0, sendo o maior valor observado no último dia de cultivo (Figura 3).

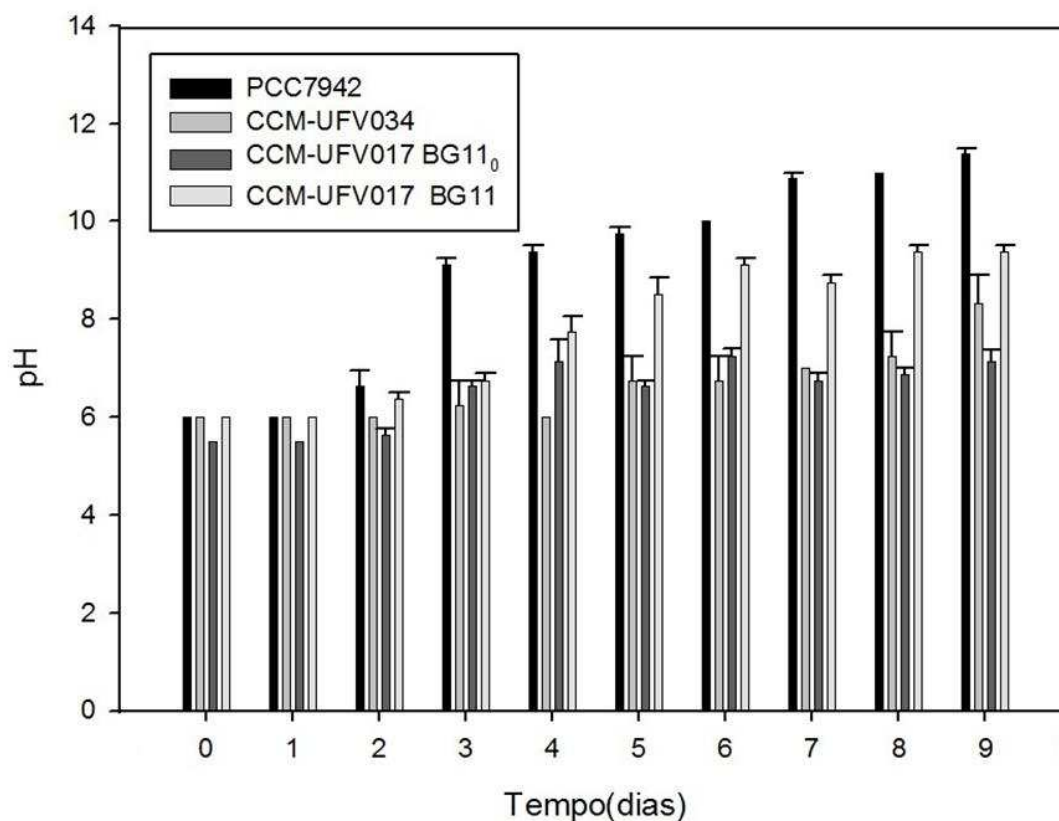


Figura 3: Valores do pH do meio de cultura durante os dez dias de experimento. O horário das aferições foi as 14:00 h e utilizaram-se 4 repetições por ponto em todas as linhagens.

Embora tenham sido cultivadas nas mesmas condições, as linhagens aqui investigadas apresentaram padrões de crescimento distintos, evidenciado tanto em análise de DO_{750nm} quanto de massa seca, o que se refletiu na produção diária e final de biomassa (Figura 4). A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentou um maior incremento médio de massa seca diária ($0,092 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), ao passo que o menor incremento foi notado em CCM-UFV034 ($0,032 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Cabe mencionar também que ocorreram diferenças no incremento de biomassa no crescimento da linhagem CCM-UFV017, quando comparados os cultivos com os

meios BG-11 ($0,058 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e BG-11₀ ($0,039 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). O maior valor final de produção de biomassa também foi obtido para a linhagem *Synechococcus* sp. PPC7942 ($0,596 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), seguida da linhagem CCM-UFV017 em BG-11, linhagem CCM-UFV017 em BG-11₀ e da linhagem CCM-UFV034 (Figura 5).

Figura 4: Variação de produção entre biomassa inicial (BS_i) e final (BS_f) e a produtividade diária de cada linhagem.

LINHAGENS	Biomassa seca inicial (BS_i) mg mL^{-1}	Biomassa seca final (BS_f) mg mL^{-1}	Produtividade diária ($BS_f - BS_i/9$) $(\text{mg mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$
PCC7942	0,061	0,596	0,059
CCM-UFV034	0,094	0,384	0,032
CCM-UFV017 BG-11	0,032	0,560	0,058
CCM-UFV017 BG-11 ₀	0,051	0,405	0,039

Outro parâmetro utilizado para a análise do crescimento das linhagens em estudo foi a velocidade de crescimento na fase log, ou seja, a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$). De modo geral, esse parâmetro reflete o quão inclinado é a curva de crescimento durante a sua fase logarítmica, ou seja, maiores inclinações correspondem a maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$. A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentou o maior valor de $\mu_{\text{máx}}$ 0,1966 (Figura 5A). A linhagem CCM-UFV034 obteve $\mu_{\text{máx}}$ de 0,1278 (Figura 5B). A linhagem CCM-UFV017, quando cultivada em BG-11 e BG-11₀ apresentou valores de 0,0936 e 0,0954, respectivamente (Figuras 5C e 5D).

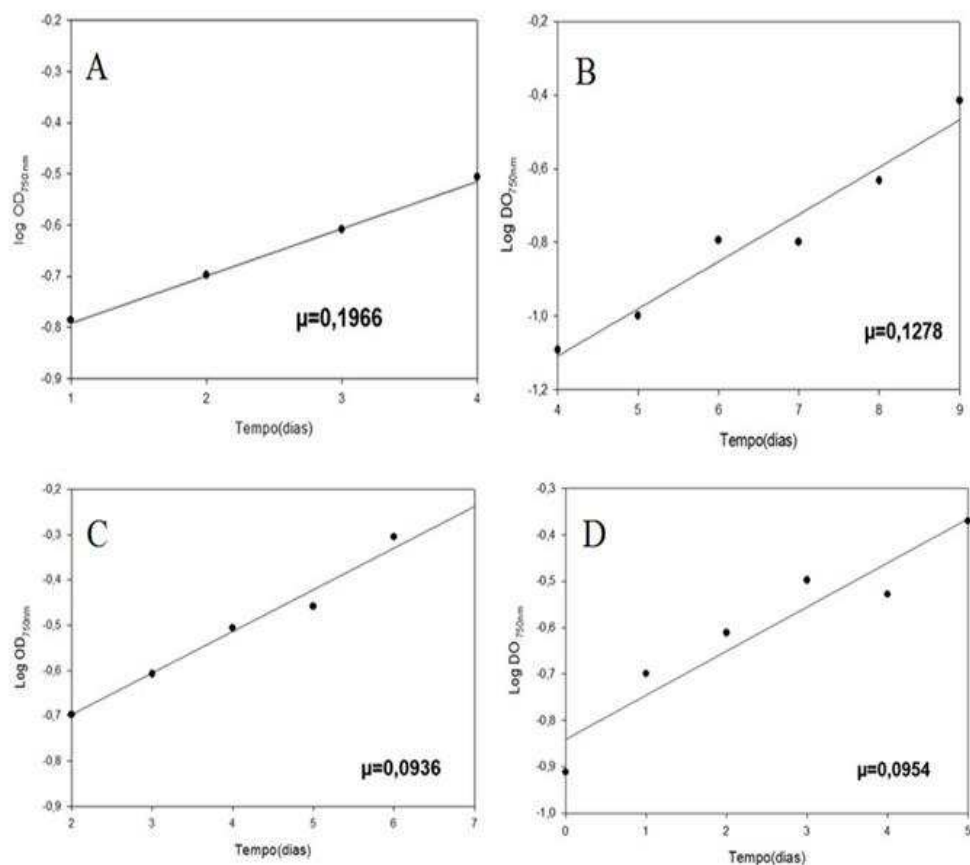


Figura 5: Regressão linear dos pontos correspondentes à fase de crescimento logarítmica e determinação da velocidade máxima ($\mu_{\text{máx}}$). **(A)** *Synechococcus* sp. PCC7942; **(B)** Phormidiaceae CCM-UFV034. **(C)** Nostocaceae CCM-UFV017 em meio BG-11 e **(D)** Nostocaceae CCM-UFV017 em meio BG-11₀.

As duas análises utilizadas para o crescimento e montagem das curvas de crescimento (massa seca e DO_{750nm}) apresentaram alta correlação segundo o coeficiente de Pearson. Assim, para as linhagens aqui analisadas *Synechococcus* sp. PCC7942, CCM-UFV034, CCM-UFV017 em meio BG-11 e CCM-UFV017 em meio BG-11₀ obtiveram-se valores de r iguais a 0,958, 0,986, 0,94 e 0,801, respectivamente (Figura 6). Esses resultados indicam alta coerência entre as análises utilizadas.

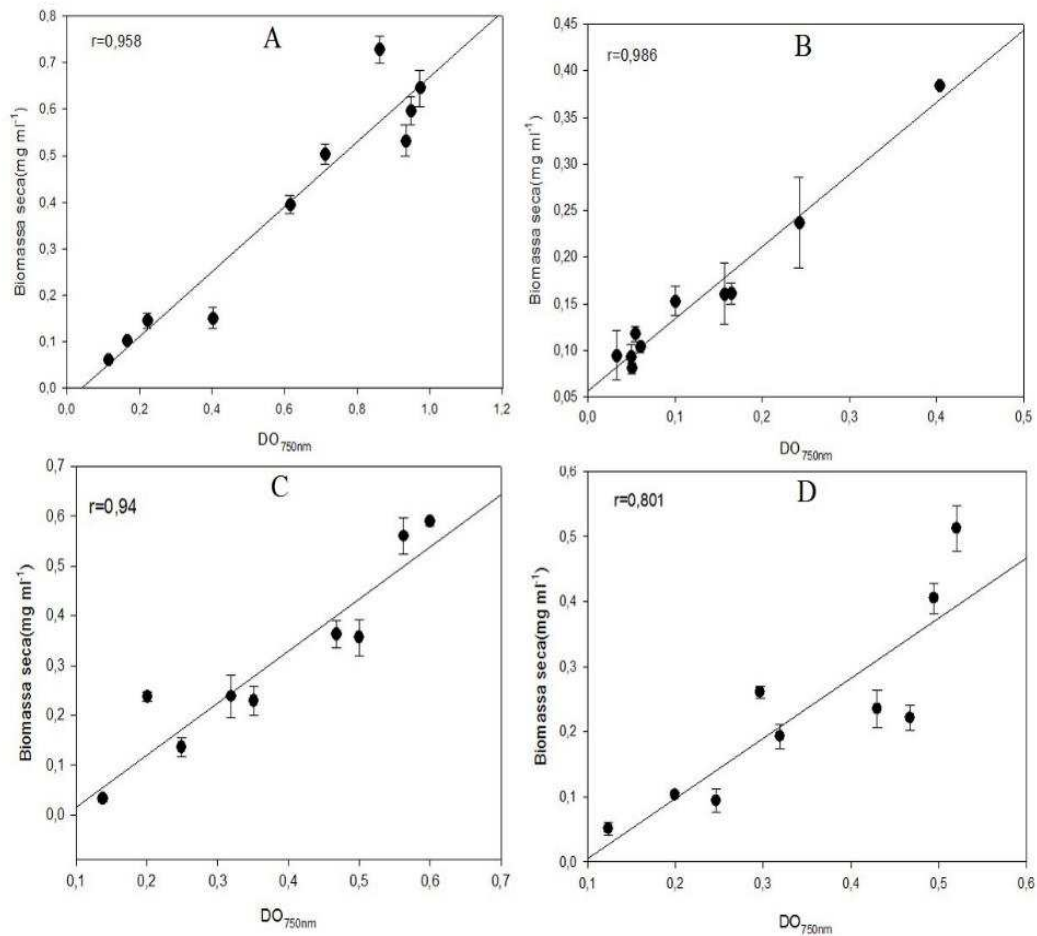


Figura 6: Correlação de Person observada entre densidade ótica e massa seca das diferentes linhagens (A) *Synechococcus* sp. PCC7942; (B) *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034; (C) *Trichormus* sp. CCM-UFV017 em meio BG-11 e (D) *Trichormus* sp. CCM-UFV017 em meio BG-11₀.

3.2-Proteínas e aminoácidos totais

De forma geral, verificou-se que as concentrações de proteínas totais apresentaram pequena variação entre os morfotipos analisados, principalmente entre as linhagens unicelular e homocitada (Figura 7A). Não obstante, a linhagem heterocitada CCM-UFV017 apresentou maior variação nas concentrações de proteínas, em ambos meios testados (Figura 7A). Salienta-se aqui a alta concentração de proteínas encontrada no último dia de quantificação das proteínas totais para CCM-UFV017 quando cultivada em meio BG-11, que foi a única linhagem a apresentar diferenças significativas entre os dois últimos pontos de análise.

As três linhagens, independentemente do meio de cultivo utilizado, apresentaram uma tendência de incremento nos níveis de amino ácidos totais ao longo dos dias de cultivo (Figura 7B). Para todas as linhagens foi possível observar que até o terceiro dia não houve uma grande variação nos níveis de aminoácidos, os quais sofreram incrementos conspícuos nos pontos 6 e 9 (Figura 7B). A linhagem CCM-UFV017 quando cultivada em meio BG-11 apresentou o maior nível e incremento de aminoácidos, embora tenha apresentado também o menor valor no dia inicial de cultivo (Figura 7B).

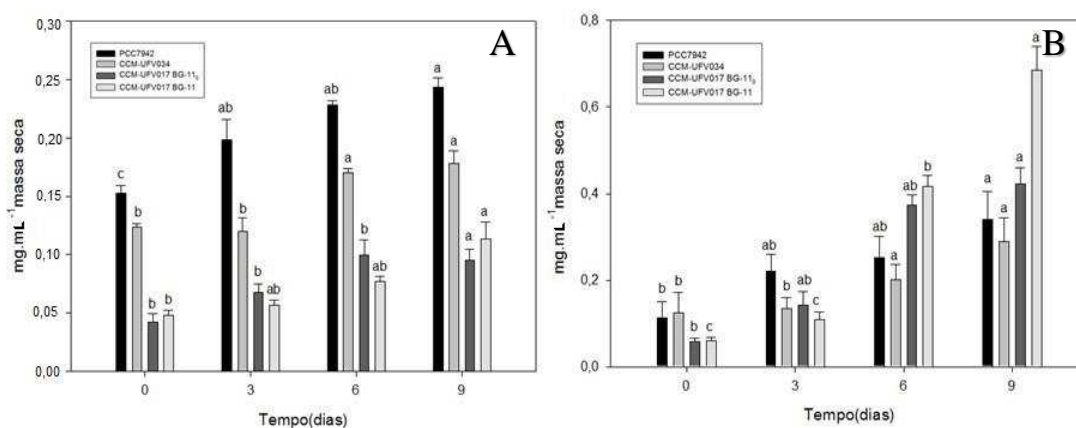


Figura 7: Quantificação do conteúdo de proteínas e aminoácidos totais. (A) Proteínas totais e (B) Aminoácidos totais. 5 % de probabilidade, pelo teste Tukey, comparadas entre pontos e não entre as diferentes linhagens, as letras indicam as diferenças significativas para a análise.

3.3-Clorofila a

As concentrações de clorofila a mostraram-se bastante variáveis entre as linhagens (Figura 8). Nota-se, no entanto, que a despeito das pequenas variações nos dois primeiros dias, incrementos nos níveis de clorofila a foram observados ao longo dos últimos dias analisados (Figura 7); exceção feita para a linhagem CCM-UFV017 em meio BG-11₀ que, no último ponto de coleta, apresentou um declínio significativo nos níveis de clorofila a. Salienta-se que a linhagem CCM-UFV034

apresentou as maiores concentrações de clorofila a no último ponto analisado (Figura 8).

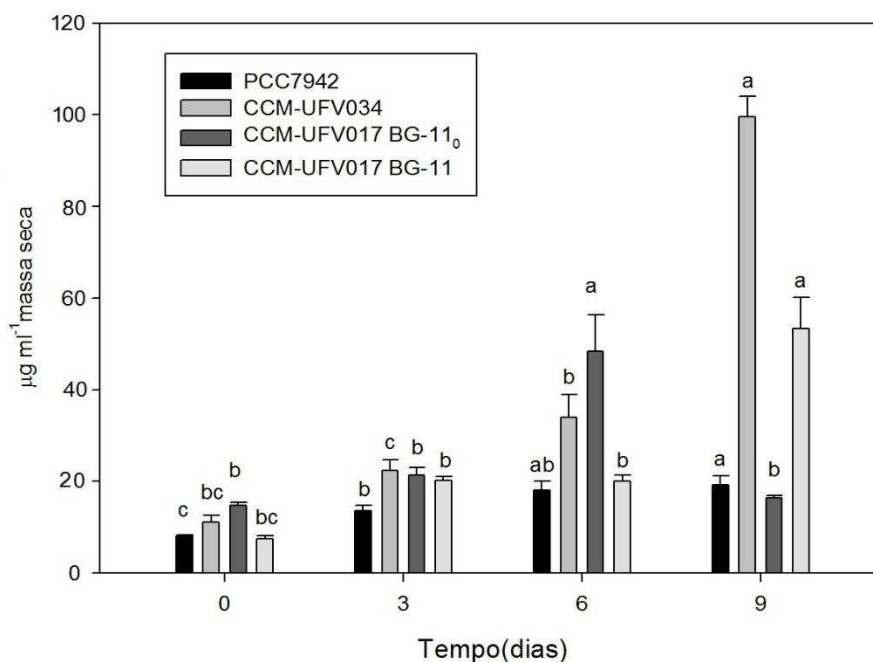


Figura 8: Quantificação de clorofila a. As análises estatísticas foram realizadas a 5 % de probabilidade, pelo teste Tukey, comparadas entre pontos e não entre as diferentes linhagens, as letras indicam diferenças significativas entre os pontos dentro de uma mesma linhagem.

4-DISCUSSÃO

Neste trabalho, três linhagens morfológicamente distintas foram analisadas em termos de crescimento e características metabólicas em condições ótimas de cultivo. Adicionalmente, realizou-se um tratamento extra para a linhagem CCM-UFV017, cujo crescimento foi investigado em meios com e sem fonte de nitrogênio inorgânico (N). Dessa forma, buscou-se compreender a relação entre a morfologia distinta dessas diferentes linhagens, bem como o cultivo de uma linhagem reconhecidamente fixadora de nitrogênio atmosférico com e sem disponibilização de N em meio de cultura, nos parâmetros cinéticos e em alguns metabólitos chave.

Tendo essas premissas em vista, foi possível observar diferenças no que respeita o crescimento (fases de crescimento e duração de cada fase), nos valores de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), bem como produção de biomassa, variação do pH e na concentração de metabólitos ao longo do cultivo dessas linhagens. Cabe ressaltar que as variações ora observadas podem ter relação direta não somente com a morfologia de cada organismo (Jezberová e Komárková, 2007), mas também com aspectos ecológicos, relacionados aos sítios de origem de cada linhagem.

A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, unicelular, apresentou crescimento rápido e não apresentou uma fase lag evidente (Figuras 1A e 2A), sugerindo que as células utilizadas como pré-inóculo já se encontravam aclimatadas às condições de cultivo ou, alternativamente, se aclimataram em período de tempo inferior a 24 horas, que foi intervalo entre os pontos amostrais. Os quatro dias de fase log associados a um valor de $\mu_{\text{máx}}$ relativamente alto (quando comparado com as demais linhagens em estudo; Figura 5) possibilitaram que essa linhagem obtivesse a maior produção final e incremento diário de biomassa (Figura 4). Não obstante, alterações nos valores de pH foram maiores para essa linhagem (Figura 3), com maiores incrementos a partir do terceiro dia de cultivo, coincidindo com o meio da fase log. Apesar dessas características, a partir do quarto – quinto dias de cultivo, essa linhagem entrou em fase estacionária indicando a ocorrência de alguma deficiência nutricional ou mesmo de um estresse ambiental. Tomados em conjuntos, esses resultados indicam que, possivelmente, deficiência em fontes de nitrogênio e auto-sombreamento acoplados ao efeito prejudicial dos altos valores de pH, principalmente a partir do sexto dia de cultivo ($\geq 10,0$), tenham contribuído, em larga escala, para essa paralisação do crescimento. Ademais, considerando-se que a concentração de clorofila a ao longo do cultivo, tenha alcançado os maiores valores

ao final do cultivo (Figura 8), é plausível sugerir que a entrada na fase estacionária não se deva à reduções nas taxas fotossintéticas. O aumento nas concentrações deste pigmento deve estar, em último caso, associado à manutenção do funcionamento adequado da cadeia transportadora de elétrons, objetivando uma melhor absorção da energia luminosa disponível, mesmo em fase do auto-sombreamento (Flores e Herrero 2010). Adicionalmente, concentrações crescentes de proteínas totais também foram observadas (Figura 7) indicando possíveis aumentos nos complexos de reserva (grânulos de cianoficina) e, principalmente, incremento de ficobiliproteínas, que correspondem a até 70 % do conteúdo proteico de uma célula cianobacteriana (Flores e Herrero 2010). Essa classe de proteínas é a base dos complexos-antena associados ao Fotossistema II e, em menor escala, ao Fotossistema I. Desse modo, embora dados experimentais adicionais sejam ainda necessários, é plausível sugerir que o rápido crescimento dessa linhagem culmine em um estresse energético, causado principalmente pelo auto-sombreamento (Quesada e Vincent, 1997). Como forma de reverter essa situação, a síntese de clorofila a e proteínas associadas aos fotossistemas é aumentada, potencializando, assim, a eficiência de captação da energia luminosa. No entanto, em função do acelerado crescimento, é possível que outros metabólitos ou nutrientes tenham também limitado o crescimento, que poderia ser restabelecido com a diluição dessa cultura (desfazendo os efeitos do auto-sombreamento) ou com o fornecimento contínuo de nutrientes.

A linhagem CCM-UFV034, filamentosa homocitada, por outro lado, apresentou uma fase lag bastante longa (4 a 5 dias- Figuras 1 e 2), sugerindo uma aclimatação mais tardia às condições de cultivo. Apesar de uma fase log tardia, o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ registrado para essa linhagem foi o segundo maior (Figura 5), indicando que ela apresenta uma rápida capacidade de crescimento. Não obstante, é

ainda necessário um melhor entendimento acerca das condições ótimas de crescimento para essa linhagem, objetivando a redução da fase lag. Assim, uma longa fase de aclimação (lag) refletiu, sobretudo, na produção de biomassa ao final do período de 9 dias (Figura 4). Em conjunto, os resultados de pH e concentração de clorofila a corroboram essa entrada tardia na fase log, uma vez que o pH sofreu alterações significativas apenas após o sétimo de cultivo (Figura 3) e a clorofila a apresentou sua maior concentração no último ponto de cultivo (Figura 8). Cumpre mencionar que a elevada concentração de clorofila a pode refletir, ao menos em parte, a necessidade de manutenção de taxas fotossintéticas relativamente altas que, em última análise, refletem maior fixação de carbono inorgânico e produção de biomassa. Experimentos adicionais, visando a otimização das condições de cultivo além de uma investigação mais detalhada, com a coleta de mais pontos amostrais, são ainda necessários para confirmar e melhor entender o comportamento apresentado por essa linhagem.

A linhagem UFV017, filamentosa heterocitada, independentemente do cultivo, com ou sem suplementação com N, apresentou crescimento similar, com uma rápida aclimação ao meio caracterizada pela curta ou mesmo ausente fase lag (Figura 1 e 2). No entanto, em função da ausência de N no meio observou-se uma fase log muito curta (48 h apenas) e uma rápida desaceleração do crescimento. Considerando-se os valores inferiores de pH observados nesse meio (Figura 3) e um $\mu_{\text{máx}}$ similar entre os diferentes meios sugere-se que as diferenças observadas nas curvas não estejam associadas ao pH, mas provavelmente à limitações nutricionais. De modo interessante, pequenas diferenças foram observadas nos níveis de proteínas totais para essa linhagem nos dois meios de cultivo; no entanto, incrementos consideráveis foram observados nos níveis de aminoácidos ao final de cultivo em meio

suplementado com N. Em conjunto, esses resultados indicam que o nitrogênio fornecido está sendo possivelmente assimilado e convertido em aminoácidos sem, no entanto, alterar o conteúdo proteico e a taxa de crescimento. Registre-se também que os maiores teores de clorofila a ao final do experimento, associados aos maiores níveis de aminoácidos, sugerem que a maior fração da energia obtida via fotossíntese esteja sendo direcionada para a assimilação do nitrogênio disponível sem, no entanto, se traduzir em ganhos de biomassa ou crescimento. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que a linhagem UFV017, caso mantida por um período mais prolongado de experimento obteria vantagens produtivas por apresentar uma célula diferenciada (heterócito), capaz de fixar o nitrogênio gasoso e convertê-lo, assim, em uma forma assimilável para o metabolismo cianobacteriano. Cumpre mencionar também que as alterações nos níveis de aminoácidos sem ganhos em biomassa devem influenciar largamente a relação carbono/nitrogênio (Laurent et al., 2005) e, em última instância, impactar o crescimento. Nesse contexto, trabalhos futuros devem buscar entender melhor os impactos dessa relação e da sua alteração no crescimento de linhagens capazes de fixar nitrogênio bem como a presença desse nutriente no meio afetaria (ou não) o estabelecimento dessas linhagens.

Tomados em conjunto, os resultados desse trabalho, aliados a trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, em condições ótimas (Esteves-Ferreira, 2013) e em resposta ao estresse por salinidade (Alvarenga, 2015) indicam que uma caracterização detalhada de um maior número de linhagens de cianobactérias faz-se ainda necessária, de modo a selecionar não somente organismos com elevadas taxas de crescimento, mas também aquelas linhagens com alto potencial de acúmulo de substâncias de interesse, como proteínas (Vilela et al., 2003).

Nesse sentido, faz-se necessário a seleção e caracterização de um maior número possível de linhagens e também uma análise mais detalhada do seu metabolismo principalmente do nitrogênio e das condições de cultivo voltadas especificamente para sua produção. Coletivamente, essas informações se traduzirão em impactos científicos além de maximizar a produção em escala industrial ou até mesmo biotecnológica dessas linhagens.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados filogenéticos aqui obtidos indicam que as linhagens CCM-UFV034 e UFV017 estavam previamente classificadas em gêneros distintos aos aqui encontrados, fato devido à primeira vez que estas linhagens de cianobactérias foram caracterizadas a nível genético. Tais resultados demonstram a força da abordagem polifásica aqui utilizada. Embora ainda que preliminares, cumpre mencionar que os resultados aqui apresentados, em longo prazo, possibilitam uma caracterização molecular mais detalhada permitindo a identificação de metabólitos e genes alvos associados à características intrínsecas nas diferentes linhagens estudadas. Ainda, espera-se que esse conhecimento possa, a médio e longo prazo, contribuir para o desenvolvimento de plantas e cianobactérias tolerantes aos mais variados estresses através da engenharia genética.

A caracterização dos parâmetros fisiológicos, metabólicos e de crescimento em linhagens de cianobactérias sugere que o maior crescimento de algumas linhagens aparenta estar associado à manutenção do pH do meio e a uma rápida adaptação e morfologia diferencial. Em adição, foi possível verificar também o grande potencial da linhagem unicelular PCC7942 para a produção de massa seca e proteínas totais.

É importante mencionar também que para cada padrão morfológico analisado aqui foi possível inferir como as variações apresentadas por essas linhagens acarretaram alterações na fisiologia, metabolismo e crescimento. Registre-se também que essas alterações são particularmente semelhantes dentro um mesmo grupo morfológico, como previamente observado (Esteves-Ferreira, 2013).

Os resultados obtidos demonstram também a importância e a necessidade de caracterizações fisiológicas mais detalhadas dos organismos desse filo. Isso se faz necessário não somente com o objetivo de se entender as diferentes relações casuais usualmente observadas entre as linhagens, como também para um melhor entendimento das relações metabólicas e moleculares existentes nesse grupo, possibilitando assim a seleção de linhagens com alto potencial biotecnológico.

Em síntese, os resultados obtidos aqui indicam que o crescimento diferencial observado entre os morfotipos estudados associado ao uso da taxonomia polifásica baseada em uma maior gama de informações fornecem uma taxonomia mais refinada. Não obstante, mais estudos e com diferentes linhagens fazem-se ainda necessários com o intuito de se explorar ao máximo as potencialidades desses micro-organismos.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, F. et al. Biofuel from Algae- Is It a Viable Alternative? *Procedia Engineering*, v. 49, p. 221–227, 2012.
- ALTERMANN, W.; KAZMIERCZAK, J. Archean microfossils: a reappraisal of early life on earth. *Research in Microbiology, Paris*, v. 154, p. 611-617, 2003.
- ALVARENGA, L.V. Respostas fisiológicas em cianobactérias da família NOSTOCACEAE cultivadas sob estresse salino. 2015. 37 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- ANAGNOSTIDIS, K. AND J.Í. KOMÁREK. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 1 - Introduction. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 1985. 38-39: p. 291-302.
- BARBER, J.; ARCHER, M. D. P680, the primary electron donor of photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 142, n. 2, p. 97–106, 2001.
- BECK C, KNOOP H, AXMANN IM, STEUER R. The diversity of cyanobacterial metabolism: Genome analysis of multiple phototrophic micro-organisms. *BMC Genomics* 13, 2012.
- BUICK, R. The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient archaen lakes. *Science*, v. 255, n. 0, p. 74–77, 1992.
- CAPONE, Douglas G. et al. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, v. 276, n. 5316, p. 1221-1229, 1997.
- CHATCHAWAN, T. et al. *Oxynema*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). *Cryptogamie Algologie*, v. 33, n. 1, p. 41–59, 2012.
- DISMUKES, G. C. et al. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 235–240, 2008.
- DURALL, C.; LINDBLAD, P. Mechanisms of carbon fixation and engineering for increased carbon fixation in cyanobacteria. *Algal Research*, v. 11, p. 263–270, 2015.
- EBERLY, J. O.; ELY, R. L. Photosynthetic accumulation of carbon storage compounds under CO₂ enrichment by the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 6, p. 843–850, 2012.
- ESTEVEZ-FERREIRA, A.A., et al., Comparative evaluation of different preservation methods for cyanobacterial strains. *Journal of Applied Phycology*, 2013. 25(4): p. 919-929.

EWING, B.; HILLIER, L. D.; WENDL, M. C. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

FENG, D. F.; DOOLITTLE, R. F. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of molecular evolution*, v. 25, n. 4, p. 351–360, 1987.

FEDERATION, Water Environmental et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2005.

FLORES, E.; HERRERO, A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 39–50, 2010.

GENUÁRIO, Diego Bonaldo et al. Characterization of freshwater benthic biofilm-forming *Hydrocoryne* (Cyanobacteria) isolates from Antarctica. *Journal of phycology*, v. 49, n. 6, p. 1142–1153, 2013.

GOVINDJEE, SHEVELA D. Adventures with cyanobacteria: A personal perspective. *Frontiers in Plant Science* 2: 28, 2011.

HEIDORN T, CAMSUND D, HUANG HH, LINDBERG P, OLIVEIRA P, STENSJÖ K, LINDBLAD P: Synthetic biology in cyanobacteria engineering and analyzing novel functions. *Methods Enzymol*, 497: 539-579, 2011.

HERDMAN, M.; CASTENHOLZ, R.W.; ITEMAN, I.; WATERBURY, J.B.; RIPPKA, R. (2001) The Cyanobacteria: subsection 1. In: Boone, D.R.; Castenholz, R.W. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer, p. 493–514.

HOFFMANN, L., KOMÁREK, J. E KASTOVSKY, J. System of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) - state in 2004. *Algol Stud* 117, 95–115.

JEZBEROVÁ, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Morphometry and growth of three *Synechococcus*-like picoplanktic cyanobacteria at different culture conditions. *Hydrobiologia*, v. 578, n. 1, p. 17–27, 2007.

JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 367–372, 2001.

KARLIN, S.; ALTSCHUL, S. F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 6, p. 2264–2268, 1990.

KAŹMIERCZAK, J.; IRYU, Y. Cyanobacterial origin of microcrystalline cements from Pleistocene rhodoliths and coralline algal crusts of Okierabu-jima, Japan. *Acta*

Palaeontologica Polonica, v. 44, n. 2, p. 117–130, 1999.

KOMÁREK, J. The modern classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanol Hydrobiol Stud* 34, 5–17, 2005.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Bd. 19/2: Cyanoprokaryota: teil 2: Oscillatoriales. München: Elsevier, 2005.

KOZLIKOVA-ZAPOMELOVA, E. et al. Phylogenetic and taxonomic position of the genus *Wollea* with the description of *Wollea salina* sp. nov. (Cyanobacteria, Nostocales). *Fottea*, v. 16, n. 1, p. 43–55, 2016.

LAURENT, S. et al. Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 28, p. 9907–9912, 2005.

LEA-SMITH, D. J. et al. Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, p. 1–9, 2015.

LUSSIER, J. P. et al. A meta-analysis of voucher-based reinforcement therapy for substance use disorders. *Addiction*, v. 101, n. 2, p. 192–203, 2006.

MALONE, C. F. DA S. et al. *Cephalothrix* gen. nov. (Cyanobacteria): Towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 2993–3007, 2015.

MANGAN, N.; BRENNER, M. Systems analysis of the CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. *eLife*, v. 2014, n. 3, p. 1–17, 2014.

MARTINS, Mariellen Dornelles et al. Proposition of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of Phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on polyphasic approach. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2016.

MORGAN, M. J. et al. Decrease in Manganese Superoxide Dismutase Leads to Reduced Root Growth and Affects Tricarboxylic Acid Cycle Flux and Mitochondrial Redox Homeostasis. *Plant Physiol*, v. 147, n. 1, p. 101–114, 2008.

NÜBEL, Ulrich; GARCIA-PICHEL, Ferran; MUYZER, Gerard. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 8, p. 3327–3332, 1997.

PARMAR A, SINGH NK, PANDEY A, GNANSOUNOU E, MADAMWAR D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology* 102: 10163–10172, 2001.

PERKERSON, R. B. et al. A unique pseudanabaenalean (cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, v. 47, n. 6, p. 1397–1412, 2011.

- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A; KRIEDEMANN, P. E. Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous-Equations for Assaying Chlorophyll-a and Chlorophyll-B Extracted with 4 Different Solvents - Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic-Absorption Spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta*, v. 975, n. 3, p. 384–394, 1989.
- PRICE, G. D. et al. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating- mechanism (CCM): Functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 7, p. 1441–1461, 2008.
- QUESADA, A.; VINCENT, W. F. Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *European Journal of Phycology*, v. 32, n. 4, p. 335–342, 1997.
- RAJANIEMI, P. et al. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 11–26, 2005.
- RANDALL, R. J.; LEWIS, A. The folin by oliver. *Readings*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- REVIERS, B. *Biologia e filogenia das algas*. Artmed, Porto Alegre, 280p, 2006.
- RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY JB, HERDMAN M, STANIER RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1-61,1979.
- SCHOPF, J.W. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, v. 260, n. 5108, p. 640-646, 1993.
- SCIUTO, Katia et al. Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics*, v. 28, n. 4, p. 357-374, 2011.
- SENNA, P. A. C.; MAGRIN, A. G. E. A importância da “boa” identificação dos organismos fitoplanctônicos para os estudos ecológicos. *Perspectivas da Limnologia no Brasil*, p. 198, 1999.
- STANIER, R. Y.; BAZINE, G. C. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 31, n. 1, p. 225-274, 1977.
- SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. Chapter 2. Cyanobacteria in the environment. 1999.
- TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. No Title No Title. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.
- TATON, A. et al. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular

- approach. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 9, p. 5157-5169, 2003.
- TRIPP, H. J. et al. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature*, v. 464, n. 7285, p. 90–94, 2010.
- VILELA, M. J. et al. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 67–72, 2003.
- WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008.
- WRIGHT, D. et al. Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 5, p. 1839–1852, 2001.