

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



**Avaliação da expressão de genes  
envolvidos na síntese de microcistinas  
em cianobactérias tóxicas sujeitas a  
diferentes intensidades de luz**

**Daniel Fernando da Fonseca Salvador**

Dissertação

Mestrado Biologia Humana e Ambiente

2014

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



**Avaliação da expressão de genes  
envolvidos na síntese de microcistinas  
em cianobactérias tóxicas sujeitas a  
diferentes intensidades de luz**

Daniel Fernando da Fonseca Salvador

Dissertação

Mestrado Biologia Humana e Ambiente

Esta dissertação foi orientada por:

**Doutora Elisabete Valério**

Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Deodália Dias**

Departamento de Biologia Animal – Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa

2014



*Bloom de cianobactérias na Albufeira de Patudos.  
Jornal Público, Marisa Soares, 09-09-2014.*

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

*“Arão, levantando a vara, feriu as águas que estavam no rio, diante do Faraó... e todas as águas do rio se tornaram em sangue. De modo que os peixes que estavam no rio morreram, e o rio cheirou mal, e os egípcios não podiam beber da água do rio; e houve sangue por toda a terra do Egito.”*

*A primeira praga - Êxodo. 7:14-24*

## Nota Prévía

Esta dissertação contou com a co-orientação da Mestre Catarina Churro, pertencente ao Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas da revista *AQUATIC TOXICOLOGY*.

A escrita não seguiu as regras do novo acordo ortográfico.

### **Este trabalho deu origem à seguinte comunicação em forma de poster:**

Salvador, D., Churro, C., Valério, E., 2014. Evaluating *mcyA* gene expression in two toxic cyanobacterial species under different light intensities using RT-qPCR. *Trends in Environmental Microbiology for Public Health*. 18-21 de Setembro, Lisboa, Portugal.

*À memória de Capitolina Cunha,  
Pelo que sempre representou para mim...*

## Agradecimentos

Existem momentos na vida que importa parar, reflectir e agradecer! Agradecer aos que foram e são o nosso suporte na concretização de novos objectivos e de novos desafios. A realização desta dissertação foi sem dúvida um grande desafio, abraçado com receios, mas também com a determinação e vontade de fazer melhor. Revelou-se um projecto árduo, mas estimulante, que não teria sido possível desenvolver sem o apoio e encorajamento que fui recebendo ao longo deste período. Por isso quero expressar o meu reconhecimento e imensa gratidão:

À minha orientadora Doutora Elisabete Valério, por todos os conhecimentos transmitidos, atenção e cuidado com o meu trabalho. Por toda a ajuda e paciência em cada etapa e por toda a motivação nos momentos de maior “desespero”. Sem o seu interesse a concretização deste trabalho não teria sido possível. Muito obrigado!

À minha orientadora interna Prof.<sup>a</sup> Doutora Deodália Dias pela correcção da dissertação, e por todo o apoio e esclarecimentos.

À Mestre Catarina Churro, minha co-orientadora por todos os ensinamentos e correcções, quer no trabalho experimental, quer em conhecimentos teóricos. Por toda a disponibilidade, conversas e risadas.

Ao Sérgio, pelo grande auxílio com os ELISAs e com o microscópio, mas também por todos os esclarecimentos e apoio.

Ao Doutor Paulo, chefe do laboratório, e à Doutora Elsa, por toda ajuda na resolução de problemas, por todas as sugestões, comentários e críticas.

Ao INSA, por me ter permitido desenvolver este projecto nas suas instalações; à Doutora Manuela Cano, ao Lab. de Toxicologia Genética, ao Lab. de Oncobiologia e ao Departamento de Doenças Infecciosas pelo empréstimo dos seus equipamentos.

À Mestre Marta Palma da FCUL, pela cooperação e disponibilização do Nanodrop.

À Prof. Cristina, pela prontidão na ajuda com o tratamento estatístico dos resultados.

Aos meus colegas de mestrado, Inês, Ana, Andreia, Joana e Nádía pela amizade, pela troca de informações e entreaajuda.

A todos os meus amigos, que são a família que eu escolhi, Alexandra, Ana, Carla, Cristiano, Daniela, Débora, Fábio, Mauro, Rita e Sílvia por todo o suporte, por todas as conversas, gargalhadas e saídas de descompressão que tanto me animaram.

À família Simões pelo seu encorajamento, curiosidade e interesse na realização desta dissertação.

À minha família, em especial aos meus primos, tio, padrinhos e avós por serem sempre o meu porto de abrigo. Mas também ao meu avô e tios que, apesar de não estarem fisicamente comigo, sempre me guiaram. Estarão sempre no meu coração.

À minha tia, avó e segunda mãe Capitolina por tudo que fez e ajudou para poder chegar até aqui. As palavras existentes não são decerto suficientes para expressar o tamanho do meu agradecimento e o quanto a recordarei.

Aos meus pais Manuel e Sara, a quem devo tudo, todo o amor, toda a educação e toda a vontade de fazer sempre melhor e ir à luta de novos objectivos. Por todas as oportunidades que proporcionaram e continuam a proporcionar um obrigado inexplicável!

À minha namorada Sara, por ser o meu grande pilar! Pelo seu inesgotável amor, força e disponibilidade para me auxiliar. Pela paciência nas correcções e nas dezenas de conversas sobre este projecto. Para ti ficam todos os agradecimentos...

*“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza que vai mais longe.” Clarice Lispector*

## Sumário

As cianobactérias são um grupo de microrganismos fitoplanctónicos, procariotas unicelulares, aeróbios e autotróficos. Encontram-se difundidos numa ampla variedade de habitats, ainda assim, são especialmente comuns em ambientes de água doce. A maioria das espécies existe normalmente em baixas concentrações no ambiente, no entanto, quando as condições ambientais são favoráveis, as células podem proliferar massivamente, levando à formação de florescências (*blooms*). Os *blooms* são um problema bastante actual e crescente em todo o mundo, dado que por vezes podem ser tóxicos e causar intoxicações e até a morte. A sua toxicidade resulta da capacidade que algumas espécies de cianobactérias produzem toxinas. Dos vários grupos de cianotoxinas, as hepatotoxinas são umas das que mais frequentemente estão relacionadas com intoxicações. Deste grupo, as microcistinas são as mais comuns em corpos de água doce portugueses. A crescente consciencialização dos seus riscos tem resultado em vários estudos para compreender o seu mecanismo de síntese e os factores que podem regular/influenciar o mesmo. A síntese das microcistinas é não ribossomal, a partir de um mecanismo característico de tio-molde, e utilizando complexos multienzimáticos codificados pelos genes *mcy*. Relativamente aos factores regulatórios, diversos estudos têm vindo a demonstrar que os factores ambientais podem induzir alterações na concentração/produção de cianotoxinas, designadamente o pH, a concentração/proporção de nutrientes, a temperatura e a intensidade de luz. No entanto a informação existente não é consensual.

Assim, este estudo tem como objectivo principal avaliar a influência da intensidade de luz na transcrição do gene *mcyA* e correspondente produção de microcistina em diferentes cianobactérias tóxicas. Simultaneamente pretendeu-se avaliar a influência das diferentes intensidades de luz na taxa de crescimento e ainda avaliar diferentes genes de referência para a normalização da expressão génica, obtida em *RT-qPCR*.

Foram utilizados dois isolados produtores de microcistina - *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 7) e *Planktothrix agardhii* (LMECYA 256). As culturas foram expostas durante 18 dias a três diferentes intensidades de luz (4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a uma temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Diariamente recolheram-se amostras para avaliar o crescimento das culturas, através da medição da densidade óptica. Em cada fase do crescimento colheram-se também amostras (três vezes) para efectuar a contagem celular, quantificação das microcistinas pela técnica de ELISA e extracção de *RNA*. Neste trabalho foi avaliada a expressão do gene *mcyA* pertencente ao *cluster*



*mcy*, por *RT-qPCR*. Para além disso, foram ainda estudados genes de referência (*rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1*).

Verificou-se uma correlação entre a taxa de crescimento e a intensidade de luz, quer em *M. aeruginosa*, quer em *P. agardhii*. As taxas de crescimento em ambas as espécies foram menores a 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e maiores a 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As diferenças foram mais acentuadas entre o crescimento na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e o crescimento nas intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já entre estas últimas duas intensidades a taxa foi bastante semelhante. O efeito das diferentes intensidades de luz foi mais acentuado em *M. aeruginosa* do que em *P. agardhii*.

As concentrações de microcistina por célula em *M. aeruginosa* foram semelhantes entre intensidades de luz, sobretudo nas duas primeiras fases do crescimento. Apenas na fase estacionária as concentrações de toxina diferiram consideravelmente, tendo a maior produção ocorrido a 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a menor a 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em *P. agardhii* houve maiores diferenças na concentração de microcistina por célula entre intensidades de luz e fases do crescimento. A maior produção ocorreu a 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na fase estacionária e a menor a 20  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na fase exponencial de crescimento.

Relativamente à estabilidade dos genes de referência, o gene *rRNA 16S* foi o menos estável em *M. aeruginosa*, mas o mais estável em *P. agardhii*, tendo em conta os algoritmos *geNorm* e *NormFinder*. O gene *rpoC1* foi o mais estável em *M. aeruginosa* e o menos estável em *P. agardhii*, tendo em consideração os mesmos algoritmos. Usando o algoritmo *BestKeeper*, o gene *gltA* foi classificado como o mais estável em ambas as espécies. Utilizaram-se assim os genes *rpoC1* e *gltA* em *M. aeruginosa* e os genes *rRNA 16S* e *gltA* em *P. agardhii* na normalização da expressão do gene *mcyA*.

A expressão do gene *mcyA* nas três fases do crescimento em *M. aeruginosa* foi sempre significativamente diferente entre a intensidade 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo que entre estas duas últimas a expressão foi semelhante. A maior expressão deu-se na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em *P. agardhii*, apenas nas duas últimas fases do crescimento a expressão do *mcyA* foi significativamente diferente entre as várias intensidades luz. Nas duas últimas fases, os níveis de expressão de *mcyA* nas intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram inferiores ao nível de expressão a 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já entre as duas intensidades de luz mais altas a expressão foi muito idêntica.

A análise da evolução temporal da expressão do gene *mcyA* em cada intensidade de luz mostrou que em *M. aeruginosa*, de uma forma geral, a expressão

variou sobretudo entre a fase de adaptação e a fase exponencial de crescimento. Os níveis de expressão foram máximos na fase de adaptação nas três intensidades de luz. Em *P. agardhii*, os níveis de expressão de *mcyA* ao longo do tempo não variaram igualmente nas três intensidades de luz. Ainda assim, a maior expressão observou-se na fase exponencial de crescimento.

Não se verificou correspondência entre a expressão génica e a quantidade de microcistina efectivamente produzida por célula em nenhuma das espécies, pois as alterações verificadas na expressão de *mcyA* ao longo do tempo não foram acompanhadas por variações no mesmo sentido da quantidade de microcistina por célula.

Conclui-se assim, que as intensidades de luz testadas influenciaram tanto o crescimento, como a produção de microcistina, como a expressão do gene *mcyA*, ainda que de forma diferente em *M. aeruginosa* e *P. agardhii*. Revelando que ainda há muitas questões em aberto que necessitam de ser esclarecidas em estudos futuros.

**Palavras-chave:** *Microcystis aeruginosa*; *Planktothrix agardhii*; intensidade de luz; microcistina; gene *mcyA*; RT-qPCR

## Abstract

Cyanobacteria are phytoplanktonic organisms widely occurring in freshwaters, being frequently associated with the production of toxins, namely microcystins. Microcystins are produced non-ribosomally, by a multienzyme complex (*mcy* genes). It is believed that environmental factors such as pH, temperature, concentration/ratio of nutrients and light intensity can influence toxin production. The aim of this study was to assess the influence of light intensity, in the transcription of the *mcyA* gene and corresponding production of microcystins in toxic isolates of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii*.

For that purpose, cultures were exposed to three different light intensities (4, 20 and 30  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for 18 days at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . The growth was followed daily by measuring the optical density. At each growth stage samples were collected for cell counting, microcystins quantification by ELISA and RNA extraction. The level of transcripts was quantified by RT-qPCR and the relative expression determined using three reference genes, *rRNA 16S*, *gltA* and *rpoC1*. The most stable reference genes in *M. aeruginosa* were *rpoC1* and *gltA* whereas in *P. agardhii* were *rRNA 16S* and *gltA*.

There was a correspondence between the growth rate and intensity of light in *M. aeruginosa* and *P. agardhii*. The growth rates for both species were smaller at 4 and greater at 30  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The microcystin concentration per cell was similar among light intensities and over time in *M. aeruginosa*, while in *P. agardhii* the concentration was higher in the stationary phase at 4  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

There were differences in the expression of *mcyA* between the two species. In *M. aeruginosa*, the highest levels of expression occurred at 4  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the adaptation phase, whereas for *P. agardhii* it was at 4  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the exponential growth phase. The *mcyA* expression was influenced by light intensity and growth phase. There was no association between gene expression and the quantity of microcystin produced per cell in any of the species.

Our results indicate that the light intensities tested influenced the growth, microcystin production and *mcyA* expression levels, although differently in *M. aeruginosa* and *P. agardhii*.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*; *Planktothrix agardhii*; light intensity; microcystin; *mcyA* gene; RT-qPCR

## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Sumário .....	iii
Abstract.....	vi
Índice Geral .....	vii
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tabelas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Biologia e habitat das cianobactérias .....	2
1.2. <i>Blooms</i> e factores ambientais favoráveis à sua formação .....	3
1.3. Cianotoxinas e efeitos em Saúde Pública .....	6
1.4. Microcistina e sua síntese .....	7
1.5. Efeito dos factores ambientais na síntese de microcistina.....	10
2. Objectivos .....	15
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Isolados de cianobactérias e condições de cultura.....	18
3.2. Condições de cultura testadas .....	18
3.3. Curva de crescimento, taxa de crescimento e tempo de duplicação .....	20
3.4. Contagem celular .....	21
3.5. Quantificação da microcistina .....	21
3.6. Extracção de ácidos nucleicos .....	22
3.6.1. Extracção de <i>DNA</i> .....	22
3.6.2. Extracção e purificação do <i>RNA</i> .....	22
3.7. Genes em estudo, desenho de <i>primers</i> e amplificação específica .....	23
3.7.1. Genes em estudo .....	23
3.7.2. Desenho de <i>primers</i> .....	23
3.7.3. Condições de <i>PCR</i> convencional .....	26
3.8. Expressão génica.....	26
3.8.1. Construção de rectas padrão em <i>RT-qPCR</i> .....	26
3.8.2. Condições experimentais em <i>RT-qPCR</i> .....	28
3.8.3. Avaliação da estabilidade dos genes de referência.....	29
3.8.4. Quantificação da expressão génica.....	30
4. Resultados.....	32
4.1. Avaliação do crescimento nas diferentes intensidades de luz .....	33
4.1.1. Caracterização das culturas ao longo do ensaio .....	33
4.1.2. Curvas de crescimento.....	34

---

4.1.3. Parâmetros das curvas de crescimento.....	36
4.2. Evolução temporal da concentração celular e produção de microcistina.....	37
4.3. Avaliação dos parâmetros das reacções de <i>RT-qPCR</i> .....	41
4.4. Avaliação da estabilidade dos genes de referência.....	41
4.5. Expressão relativa do gene alvo <i>mcyA</i> .....	45
4.5.1. Avaliação da expressão do gene <i>mcyA</i> em cada fase do crescimento.....	45
4.5.2. Avaliação da expressão do gene <i>mcyA</i> ao longo do tempo de exposição...	46
4.5.3. Avaliação da correspondência entre a expressão do gene <i>mcyA</i> e a concentração de microcistina por célula.....	48
5. Discussão .....	51
5.1. Avaliação das condições experimentais testadas.....	52
5.2. Efeito da intensidade de luz no crescimento .....	53
5.3. Efeito da intensidade de luz na concentração celular e produção de microcistina .....	55
5.4. Estabilidade dos genes de referência.....	59
5.5. Efeito da intensidade de luz na expressão de <i>mcyA</i> .....	60
6. Conclusão.....	65
7. Perspectivas Futuras .....	68
8. Referências Bibliográficas.....	70
9. Anexos.....	80
Anexo I: Composição do meio de cultura Z8.....	81
Anexo II: Análise estatística aplicada na avaliação do crescimento .....	82
Anexo III: Composição da solução de Lugol .....	86
Anexo IV: Protocolo de extracção de <i>DNA</i> .....	87
Anexo V: Protocolo de extracção de <i>RNA</i> .....	89
Anexo VI: <i>Primers</i> disponíveis para o gene <i>mcyA</i> .....	91

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática de uma célula vegetativa de uma cianobactéria .....	2
<b>Figura 2</b> – Fotografia de um <i>bloom</i> de cianobactérias na Albufeira de Salvaterra de Magos.....	3
<b>Figura 3</b> - Factores ambientais preponderantes na formação de <i>blooms</i> .....	4
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da organização estrutural do <i>cluster</i> de genes <i>mcy</i> dos géneros <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Anabaena</i> .....	9
<b>Figura 5</b> - Modelo de síntese da microcistina-LR, apresentando a organização do <i>cluster</i> de genes <i>mcyA-J</i> e a estrutura final da toxina .....	10
<b>Figura 6</b> - Fotografias das culturas de cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> .....	18
<b>Figura 7</b> - Desenho experimental do ensaio de exposição dos frascos de cultura às diferentes intensidades de luz (4, 20 e 30 $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na câmara de Fitoclima .....	19
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática das três colheitas de amostras dos frascos de cultura expostos às diferentes intensidades de luz, nas várias fases do crescimento, para contagem celular, quantificação das microcistinas e extracção de <i>RNA</i> .....	19
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática do local de hibridação dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>mcyA</i> .....	25
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática do local de hibridação dos <i>primers</i> dos genes <i>rpoC1</i> e <i>gltA</i> .....	25
<b>Figura 11</b> - Fotografias dos frascos de cultura na fase inicial e final do ensaio de exposição a 30 $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	33
<b>Figura 12</b> - Curvas de crescimento das espécies <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> durante os 18 dias de exposição .....	35
<b>Figura 13</b> - Concentração celular média nas várias fases de crescimento das culturas <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> .....	38
<b>Figura 14</b> - Relação entre a concentração celular/ concentração de microcistina absoluta produzida nas culturas de <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> .....	39
<b>Figura 15</b> - Concentração de microcistina por célula nas culturas de <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> .....	40
<b>Figura 16</b> – Valores de <i>Ct</i> obtidos para os genes de referência <i>rRNA 16S</i> , <i>gltA</i> e <i>rpoC1</i> nas espécies de <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> .....	42
<b>Figura 17</b> - Valores de <i>Ct</i> médios nas várias fases do crescimento (fase de adaptação, fase de crescimento exponencial e fase estacionária) dos genes de referência <i>rRNA 16S</i> , <i>gltA</i> e <i>rpoC1</i> das reacções de <i>RT-qPCR</i> .....	43

---

<b>Figura 18</b> - Expressão relativa média do gene <i>mcyA</i> em cada fase do crescimento, usando como condição controlo o nível de expressão na intensidade 4 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Expressão = 1) .....	45
<b>Figura 19</b> - Evolução da expressão relativa média do gene <i>mcyA</i> ao longo do tempo, tendo como condição controlo os níveis de expressão no terceiro dia de exposição (Expressão = 1) .....	47
<b>Figura 20</b> - Evolução temporal da expressão relativa média do gene <i>mcyA</i> (normalizada com o gene de referência <i>rpoC1</i> para <i>M. aeruginosa</i> e com o gene <i>rRNA 16S</i> para <i>P. agardhii</i> ) e da concentração de microcistina por célula.....	49

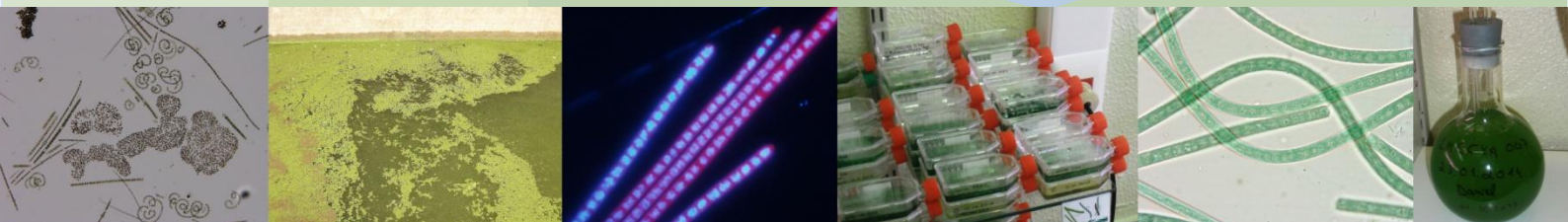
---

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Principais grupos de cianotoxinas: géneros produtores, estrutura química, dose letal (DL50), modo de acção e principais efeitos no organismo humano .....	8
<b>Tabela 2</b> - Descrição/função dos genes de referência utilizados na normalização da expressão obtida por <i>PCR</i> quantitativo em tempo real .....	23
<b>Tabela 3</b> - <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos genes <i>mcyA</i> , <i>rRNA 16S</i> , <i>gltA</i> e <i>rpoC1</i> , e respectivas temperaturas de <i>annealing</i> .....	24
<b>Tabela 4</b> - Programa de <i>PCR</i> convencional utilizado para a optimização de <i>primers</i> e para o despiste de contaminação de <i>DNA</i> nas amostras de <i>RNA</i> purificadas .....	26
<b>Tabela 5</b> - Programa de <i>RT-qPCR</i> utilizado na optimização dos <i>primers</i> .....	28
<b>Tabela 6</b> - Programa de <i>RT-qPCR</i> utilizado .....	29
<b>Tabela 7</b> - Volume de cultura evaporado em cada frasco durante o período de exposição às intensidades de luz de 4, 20 e 30 $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	33
<b>Tabela 8</b> - Taxa de crescimento e tempo de duplicação das culturas de <i>M. aeruginosa</i> e <i>P. agardhii</i> expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30 $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	37
<b>Tabela 9</b> - Parâmetros da reacção de <i>RT-qPCR</i> do gene alvo <i>mcyA</i> e dos genes de referência <i>rRNA 16S</i> , <i>gltA</i> e <i>rpoC1</i> .....	41
<b>Tabela 10</b> - Coeficientes de estabilidade dos genes de referência <i>rRNA 16S</i> , <i>gltA</i> e <i>rpoC1</i> , resultantes da aplicação dos algoritmos <i>geNorm</i> e <i>NormFinder</i> .....	44



# 1. Introdução

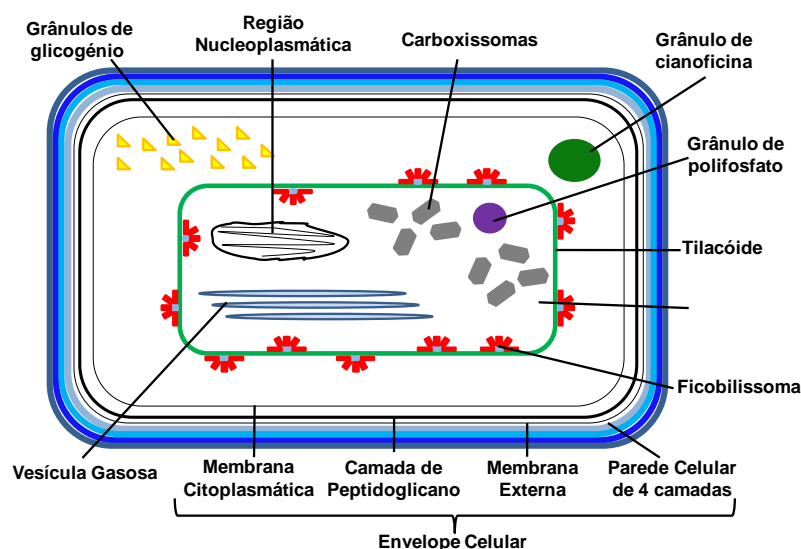


## 1.1. Biologia e habitat das cianobactérias

As cianobactérias apareceram acerca de 2-3 bilhões de anos. Acredita-se que tenham sido dos primeiros organismos fotossintéticos e os grandes responsáveis pelo aparecimento do oxigênio na atmosfera terrestre (Hedges *et al.*, 2001; Rasmussen *et al.*, 2008).

Originalmente foram classificadas como algas verdes-azuladas ou *Cyanophyta* juntamente com as algas eucarióticas no Código de Nomenclatura Botânica (Gupta *et al.*, 2013; Lee, 2008). Actualmente sabe-se que são um grupo de microrganismos procariotas unicelulares, aeróbios e autotróficos, com uma estrutura de gram negativos, embora alguns géneros apresentem uma camada de peptidoglicanos mais espessa do que seria espectável neste grupo (Gupta *et al.*, 2013; Hoiczky & Hansel, 2000; Whitton & Potts, 2000).

Ao contrário das microalgas eucarióticas, as cianobactérias não apresentam organelos associados a membranas, nem membrana nuclear. Os pigmentos fotossintéticos como a clorofila a, carotenóides, aloficocianina, ficobilinas e ficoeritrina encontram-se nos tilacóides que, por sua vez, se encontram dispersos no citoplasma perto da periferia da célula (Figura 1) (Mankiewicz *et al.*, 2003).



**Figura 1** – Representação esquemática de uma célula vegetativa de uma cianobactéria. (Adaptado de Churro *et al.*, 2012a.)

Estes organismos fitoplanctónicos encontram-se difundidos numa ampla variedade de habitats, podendo viver com sucesso em ambientes extremos (Mohamed, 2008). Ainda assim, são especialmente comuns em ambientes de água doce, salgada ou salobra, onde podem crescer na coluna de água (cianobactérias planctónicas), associadas a outras algas ou ligadas a substratos (cianobactérias

bentónicas) (Quiblier *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2005). Normalmente a maioria das espécies existe em baixas concentrações nestes ambientes, no entanto, quando as condições ambientais são favoráveis, as células podem proliferar massivamente, levando à formação de florescências ou *blooms* que se podem prolongar por tempo indeterminado (Figura 2) (Quiblier *et al.*, 2013).



**Figura 2** – Fotografias de um *bloom* de cianobactérias na Albufeira de Salvaterra de Magos. (Fotografias de Catarina Churro.)

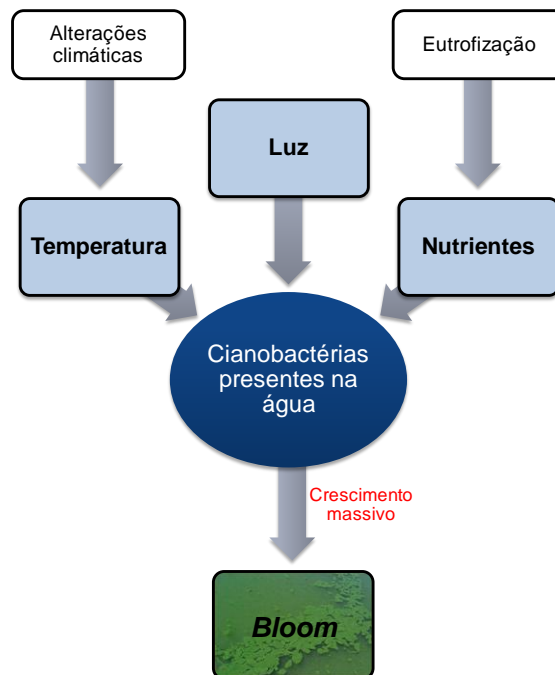
## **1.2. Blooms e factores ambientais favoráveis à sua formação**

Os primeiros *blooms* foram descritos há mais de 130 anos (O’Neil *et al.*, 2012), mas continuam a ser um problema bastante actual e crescente em todo o mundo, quer em ambientes de água doce, quer em ambientes marinhos (Ismael, 2012; Paerl *et al.*, 2011; Sotero-Santos *et al.*, 2006). Em Portugal, o clima mediterrânico é favorável à formação de *blooms*, desde do início dos anos 30 que a presença de cianobactérias é relatada (Bellém *et al.*, 2013; Vasconcelos, 1999). É comum encontrar-se cianobactérias tóxicas em lagos, por exemplo, na região centro, entre Aveiro e Figueira da Foz ou Mira e Quiaios, em reservatórios de água doce e em grandes rios de fluxo lento, como o Minho, Douro, Tejo ou Guadiana (Vasconcelos, 1999; Vasconcelos, 2006).

Os *blooms* são vulgarmente formados por géneros de cianobactérias como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix* e *Nodularia* (Gupta *et al.*, 2013; Kahru *et al.*, 2000; Ngwa *et al.*, 2014). No nosso país, os géneros mais comuns são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Planktothrix* (Bellém *et al.*, 2012, Vasconcelos, 1999).

Nos últimos anos tem-se procurado identificar quais os factores ambientais que contribuem para o aparecimento e expansão global dos *blooms* de cianobactérias. Dos diversos estudos realizados, os principais factores que mostraram estar envolvidos no desenvolvimento de *blooms* são: a temperatura da água, a exposição à luz e o

aumento da concentração de nutrientes dissolvidos na água, como apresentado na Figura 3 (Ismael, 2012; Merel *et al.*, 2013).



**Figura 3** - Factores ambientais preponderantes na formação de *blooms*. (Adaptado de Merel *et al.*, 2013.)

As variações na temperatura da água afectam fortemente as taxas de crescimento das comunidades naturais de fitoplâncton. No actual contexto de alterações climáticas, o aumento da temperatura torna-se bastante importante, pois enquanto as taxas de crescimento de fitoplâncton de água doce tendem a estabilizar em temperaturas mais elevadas (iguais ou superiores a 20°C), as taxas de crescimento de muitas cianobactérias tende a aumentar, traduzindo-se consequentemente numa vantagem competitiva (Bartram *et al.*, 1999; Merel *et al.*, 2013; O’Neil *et al.*, 2012). Para além da influência nas taxas de crescimento, o aumento da temperatura pode ainda provocar mudanças nas características físicas dos ambientes aquáticos (aumento da frequência e intensidade da estratificação da coluna de água, e diminuição da viscosidade da mesma) favoráveis ao desenvolvimento massivo das cianobactérias (O’Neil *et al.*, 2012; Paerl *et al.*, 2011).

Quanto à exposição à luz, as cianobactérias requerem baixas intensidades para o crescimento, ao contrário do que acontece com as algas, pois as primeiras são capazes de produzir pigmentos acessórios para absorver a luz de forma mais eficiente. As cianobactérias podem, assim, crescer muito mais rapidamente e com menos luz do que o restante fitoplâncton (Churro *et al.*, 2012a). Em particular, as pertencentes ao género *Planktothrix* são bastantes sensíveis a altas intensidades de luz, acima de 180  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o seu crescimento é inibido (Mur *et al.*, 1999). Habitam geralmente em lagos rasos e turvos, distribuindo-se homoganeamente ao

longo da coluna de água (Dittmann & Wiegand, 2006). Já as do género *Microcystis* são menos sensíveis às altas intensidades de luz do que as do género anterior, vivendo preferencialmente em corpos de água com uma profundidade superior a três metros e movimentando-se verticalmente ao longo da coluna de água, como forma de estarem expostas às melhores intensidades de luz para os seus processos vitais (Dittmann & Wiegand, 2006; Mur *et al.*, 1999). As espécies formadoras de colónias neste género mantêm-se na maior parte do tempo próximas da superfície da água (onde as taxas de fotossíntese são mais elevadas), acumulando-se e originando conseqüentemente densas espumas (Dittmann & Wiegand, 2006; Mur *et al.*, 1999).

Por fim, o aumento da concentração de nutrientes dissolvidos na água (principalmente o fósforo e o azoto), associado geralmente ao processo de eutrofização, leva frequentemente a mudanças na comunidade fitoplanctónica, colocando as cianobactérias numa posição dominante sobre as restantes comunidades (Merel *et al.*, 2013; O'Neil *et al.*, 2012). A dominância das mesmas resulta da sua maior afinidade para a captação de azoto e fósforo disponível no ambiente, relativamente a outros organismos fotossintéticos aquáticos, existindo inclusivamente espécies que desenvolveram células especializadas na fixação de azoto – heterocistos. Algum do fósforo captado pode ainda ser armazenado (Chorus & Mur, 1999; Churro *et al.*, 2012a; Paerl *et al.*, 2011; Whitton & Potts, 2000). A baixa razão entre as concentrações de azoto e fósforo no meio também pode favorecer o desenvolvimento de *blooms*, uma vez que as razões ideais destes dois nutrientes para o crescimento das algas eucarióticas são de 16-23 moléculas de azoto para 1 molécula de fósforo, enquanto que as razões ideais para influenciar a formação de *blooms* são 10-16 moléculas de azoto para 1 molécula de fósforo (Mur *et al.*, 1999)

Apesar destes conhecimentos, continua a existir uma natureza imprevisível no aparecimento dos *blooms* de cianobactérias, sendo a sua previsão desafiante, uma vez que falta ainda compreender muitos dos factores que provocam este fenómeno (Merel *et al.*, 2013; Valério *et al.*, 2010).

Os *blooms* são um motivo de preocupação por várias razões, nomeadamente pela acumulação de biomassa que se forma nas superfícies da água, levando à diminuição do turismo e também pela diminuição da utilidade dos corpos de água sobretudo para consumo humano, acarretando tudo isto elevadas perdas económicas (Bartram *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2013; O'Neil *et al.*, 2012; Wasmund *et al.*, 2012). Há ainda que ter em conta as alterações nos aspectos organolépticos da água e o excessivo consumo de oxigénio aquando da decomposição das densas massas e espumas, que leva ao declínio ou eliminação dos peixes, moluscos e outros organismos, como resultado das condições de hipoxia (Fernandes *et al.*, 2009). Para

além disso, podem ser tóxicos e causar intoxicações ou morte, quer em animais quer em seres humanos, sendo esta a razão mais marcante em contexto de saúde pública (Golubic *et al.*, 2010). Essa toxicidade resulta da capacidade que algumas espécies de cianobactérias têm em produzir compostos tóxicos, designados de cianotoxinas, que se pensa serem metabolitos secundários, uma vez que não são parecem ser essenciais para o seu crescimento e metabolismo primário (Oliver & Ganf, 2002; O'Neil *et al.*, 2012).

### **1.3. Cianotoxinas e efeitos em Saúde Pública**

As cianotoxinas apresentam os mais variados riscos para a saúde humana e animal (Codd *et al.*, 2005). Nos últimos tempos tem-se tentado esclarecer algumas das suas funções ecológicas e/ou fisiológicas, supondo-se que possam servir para a dissuasão da alimentação por organismos herbívoros, ou até mesmo como um mecanismo de regulação de metabolitos em condições de stress ambiental (Dittmann & Wiegand, 2006; Kaebernick & Neilan, 2001).

Estas toxinas podem ser libertadas para o exterior em pequenas quantidades durante o tempo de vida da célula (Pantelic *et al.*, 2013). Mas é sobretudo após a morte celular, ou seja, após a lise que acontece a saída da maior quantidade de toxinas para o ambiente (Corbel *et al.*, 2014). Depois de libertadas no ambiente, as toxinas poderão entrar em contacto com os seres humanos de várias formas, nomeadamente através da ingestão de água contaminada, inalação e/ou aspiração pulmonar, contacto dérmico, contacto com mucosas, consumo de alimentos contaminados ou ainda hemodiálise (Codd *et al.*, 2005; Dittmann & Wiegand, 2006; Figueiredo *et al.*, 2004). Da exposição e contacto das toxinas com o corpo humano resultam os mais variados efeitos na saúde, designadamente febre, vómitos, dores de cabeça, distúrbios visuais, tonturas, hipoxia, cianose, paralisia respiratória, danos nos rins e fígado e ataque cardíaco (Codd *et al.*, 2005; Pantelic *et al.*, 2013).

Existem várias formas de classificar e agrupar as cianotoxinas, por exemplo quanto à sua estrutura química (Kaebernick & Neilan, 2001). Mas é sobretudo tendo em conta os sistemas fisiológicos, órgãos, tecidos ou células que afectam e as consequências que lhes provocam, que mais vulgarmente são agrupadas em hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas ou irritantes como assinalado na Tabela 1 (Codd *et al.*, 2005; Teixeira & Rosa, 2006).

As hepatotoxinas são o grupo de cianotoxinas que mais frequentemente estão relacionadas com intoxicações (Sivonen & Jones, 1999). Deste grupo importa destacar as microcistinas, que são das cianotoxinas mais comuns em corpos de água doce

portugueses (Vasconcelos, 2006; Ngwa *et al.*, 2014). Inúmeras fatalidades em humanos e animais selvagens têm sido relatadas nos últimos anos como desfecho da exposição aguda a esta toxina, estimando-se uma dose tóxica para humanos de 19,5 µg/L (Carmichael *et al.*, 2001; Neilan *et al.*, 2013). Mas não é só a exposição aguda se torna preocupante, o consumo continuado de água potável contaminada com microcistina parece estar associado ao aumento da incidência do cancro do fígado e colo-rectal (concentrações de microcistina superiores a 50 pg/mL podem aumentar 7,9x o risco deste cancro) (Hernández *et al.*, 2009; Lun *et al.*, 2002). Atenta aos riscos para a saúde humana, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu um nível provisório para microcistina-LR de 1 µg/L em água potável (Pantelic *et al.*, 2013). Este valor também é actualmente aplicado em Portugal pelo Decreto - Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto (<http://dre.pt/pdf1s/2007/08/16400/0574705765.pdf>) (Acedido a 5 de Julho 2013). A crescente consciencialização dos riscos para a saúde pública tem dado uma relevância global preferencial à microcistina, resultando consequentemente em esforços cada vez maiores para compreender o seu mecanismo de síntese e os factores que podem regular/influenciar o mesmo (Merel *et al.*, 2013; Ngwa *et al.*, 2014).

#### **1.4. Microcistina e sua síntese**

Ao longo dos últimos 15 anos, os avanços da biologia molecular têm permitido aprofundar os conhecimentos de base genética, dos mecanismos de regulação e produção das cianotoxinas, sobretudo da microcistina, pelas razões anteriormente mencionadas (Kaebernick & Neilan, 2001; Neilan *et al.*, 2013).

O *cluster* de genes *mcy* responsável pela síntese de microcistinas foi o primeiro a ser totalmente sequenciado nas cianobactérias, em três estirpes filogeneticamente distantes, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *Anabaena* sp. (Christiansen *et al.*, 2003; Rouhiainen *et al.*, 2004; Tillett *et al.*, 2000). Apresenta um tamanho de cerca de 55 kpb e é um dos maiores *clusters* de genes bacterianos descritos até agora na literatura (Bittencourt-Oliveira, 2003). Este *cluster* apresenta nove genes no género *Planktothrix* e dez nos géneros *Microcystis* e *Anabaena*, como representado na Figura 4 (Kurmayer & Christiansen, 2009). Facilmente se verifica também que a organização dos genes *mcy* difere entre os vários géneros (Figura 4). Nos géneros *Microcystis* e *Anabaena*, os genes são transcritos a partir de uma região central do promotor de forma bidireccional, enquanto que quase todos os genes no género *Planktothrix* (com excepção do *mcyT*) são transcritos unidireccionalmente a partir de um promotor localizado a montante do gene *mcyD* (Kurmayer & Christiansen, 2009).

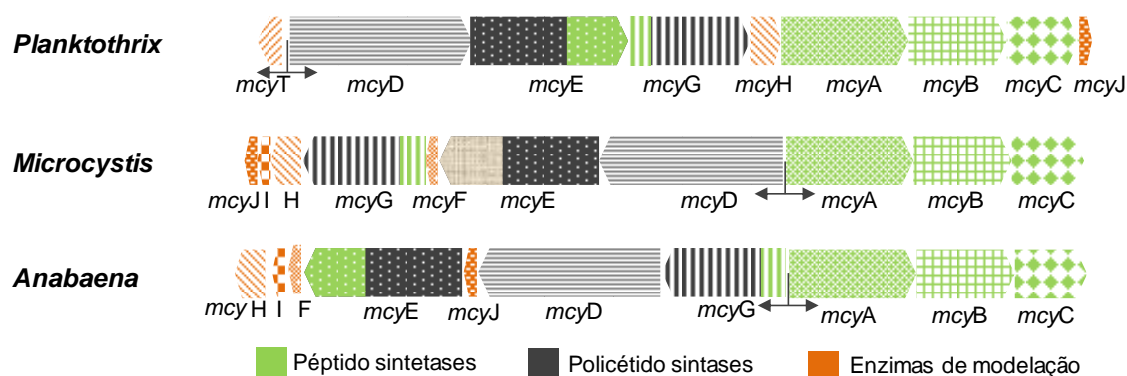
**Tabela 1** - Principais grupos de cianotoxinas: géneros produtores, estrutura química, dose letal (DL50), modo de acção e principais efeitos no organismo humano.

Grupo da Toxina	Toxina	Géneros produtores	Estrutura química	DL <sub>50</sub> (em ratos)	Modo de acção	Principais efeitos	Referências
Hepatotoxinas	Microcistina	<i>Anabaena</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Microcystis</i> <i>Nostoc</i> <i>Planktothrix</i>	Péptidos cíclicos	25 a ~1000 µg/kg bw**	Inibe as fosfatases proteicas PP1 e PP2A, e activa a fosforilase b	Hemorragia hepática massiva Insuficiência hepática Promoção tumoral	Carmichael, 2001 Churro <i>et al.</i> , 2012a Dittmann & Wiegand, 2006 Pantelic <i>et al.</i> , 2013 Sivonen & Jones, 1999 Valério <i>et al.</i> , 2010
	Nodularina	<i>Nodularia</i>		30-50 µg/kg bw**	Inibe as fosfatases proteicas PP1 e PP2A	Hemorragia hepática Insuficiência hepática	Carmichael, 2001 Churro <i>et al.</i> , 2012a Pantelic <i>et al.</i> , 2013 Merel <i>et al.</i> , 2013
Neurotoxinas	Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Oscillatoria</i>	Alcalóide	250 µg/kg bw**	Liga-se aos receptores nictínicos da acetilcolina	Espasmos musculares Asfixia	Churro <i>et al.</i> , 2012a Kaebernick & Neilan, 2001 Merel <i>et al.</i> , 2013 Teixeira & Rosa, 2006
	Anatoxina-a (S)	<i>Anabaena</i>		40 µg/kg bw**	Inibe a actividade da acetilcolinesterase	Convulsões Dispneia Fraqueza muscular	Churro <i>et al.</i> , 2012a Codd <i>et al.</i> , 2005 Kaebernick & Neilan, 2001 Merel <i>et al.</i> , 2013
	Saxitoxinas (ou PSP)	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i> <i>Planktothrix</i>		10-30 µg/kg bw**	Bloqueia os canais de sódio, inibindo a condução nervosa	Paragens respiratórias	Carmichael, 2001 Churro <i>et al.</i> , 2012a Kaebernick & Neilan, 2001
Citotoxinas	Cilindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i>		210-2100 µg/kg bw**/dia	Inibe a síntese proteica	Lesões necróticas no fígado, rins e coração Genotoxicidade	Carmichael, 2001 Carneiro & Leite, 2008 Churro <i>et al.</i> , 2012a Codd <i>et al.</i> , 2005 Corbel <i>et al.</i> , 2014
Toxinas irritantes	Lipossacarídeo	Todos os Géneros	Lipossacarídeo	-	-	Irritação e reacções alérgicas	Brandão, 2008 Carneiro & Leite, 2008 Churro <i>et al.</i> , 2012a Corbel <i>et al.</i> , 2014
	Aplisiatoxina	<i>Lyngbya</i> <i>Schizothrix</i> <i>Oscillatoria</i>	Alcalóide	107-117 µg/kg bw**	Activam a cinase proteica C	Promoção tumoral Irritação da pele	Brandão, 2008 Carneiro & Leite, 2008 Churro <i>et al.</i> , 2012a Mankiewicz <i>et al.</i> , 2003 Merel <i>et al.</i> , 2013
	Lingbiatoxinas	<i>Lyngbya</i>		250 µg/kg			

\*Dose de toxina necessária para matar 50% dos animais expostos.

\*\*bw- *body weight* (peso corporal)



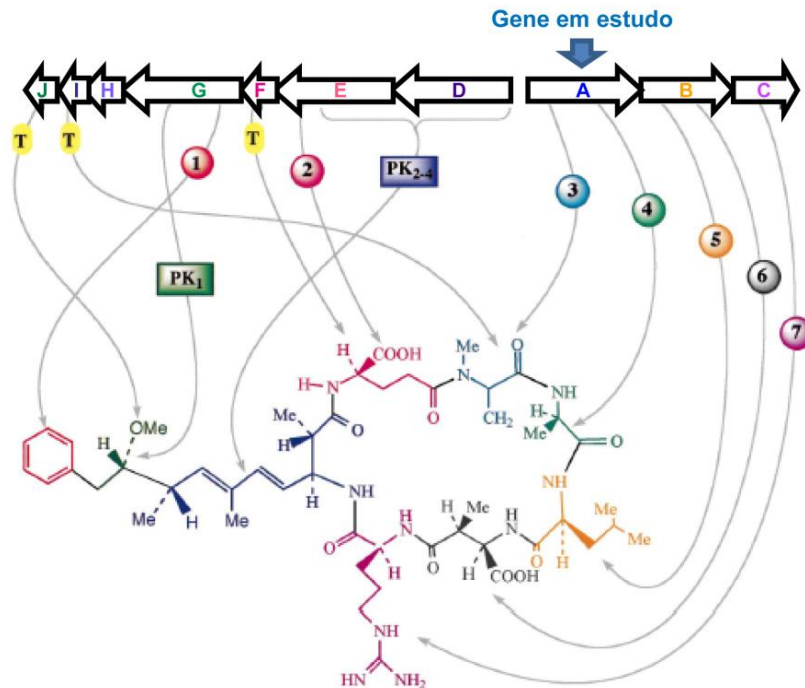


**Figura 4** - Representação esquemática da organização estrutural do *cluster* de genes *mcy* dos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena*. (Adaptado Kurmayer & Christiansen, 2009.)

Relativamente ao processo de síntese, as microcistinas apresentam uma síntese não ribossomal, dando-se a sua produção através de um mecanismo característico de tio-molde, necessitando de energia (ATP) e utilizando complexos multienzimáticos constituídos por módulos de péptido sintetases (NRPS) codificados pelos genes *mcyA*, *B*, *C*,  $E_p$  e  $G_p$ ; módulos de policétido sintases (PKS) codificados pelos genes *mcyD*,  $E_k$  e  $G_k$ , e enzimas de modelação codificadas pelos genes *mcyF*, *I*, *J* e *T* como indicado na Figura 5 (Dittmann & Börner, 2005; Figueiredo *et al.*, 2004; Kaebernick & Neilan, 2001; Kurmayer & Christiansen, 2009).

As péptido sintetases, tal como o próprio nome indica, são enzimas que catalisam a formação de péptidos, enquanto que as policétido sintases são enzimas que juntam unidades de acetato ou propionato em estruturas de policetidos, sendo responsáveis pela formação da porção Adda da microcistina (Bittencourt-Oliveira, 2003; Dittmann & Börner, 2005; Kurmayer & Christiansen, 2009). À medida que o processo de síntese avança vão sendo incorporados aminoácidos ao péptido em crescimento pela ordem que se encontra descrita na Figura 5, obtendo-se no fim a estrutura completa da toxina (Kaebernick & Neilan, 2001). Os componentes multienzimáticos mencionados são bastante semelhantes entre os diferentes gêneros, com excepção das enzimas modeladoras, e dos genes *mcyF*, *mcyI* e *mcyT* (Valério *et al.*, 2010).

Nishizawa *et al.* (2000) demonstrou inclusivamente que ao existir mutação nos genes *mcyA*, *mcyD* ou *mcyE*, não se formam os componentes descritos, deixando de existir qualquer produção de toxina observável.



**Figura 5** - Modelo de síntese da microcistina-LR, apresentando a organização do *cluster* de genes *mcyA-J* e a estrutura final da toxina. Os círculos numerados indicam a ordem de incorporação dos aminoácidos ao péptido em crescimento, os retângulos numerados indicam a ordem de actuação das policétido sintases e os círculos com a letra T indicam a síntese das enzimas de modelação. (Adaptado de Kaebernick & Neilan, 2001.)

### 1.5. Efeito dos factores ambientais na síntese de microcistina

Ao longo dos anos, diversos estudos em cianobactérias têm vindo a demonstrar que os factores ambientais podem induzir alterações na concentração/produção de cianotoxinas (Neilan *et al.*, 2013; Sivonen & Jones, 1999). Ainda assim, não está totalmente claro, quais os que realmente afectam a produção de toxina e qual o seu papel concreto, já que muitos dos estudos existentes utilizaram diferentes estirpes, diferentes espécies, diferentes condições de cultura ou, ainda, diferentes métodos de análise da toxina produzida (El-Shehawey *et al.*, 2012; Kaebernick & Neilan, 2001; Neilan *et al.*, 2013).

Os factores ambientais que se julgam capazes de influenciar a produção de microcistinas são sobretudo o **pH** (Jähnichen *et al.*, 2001; Song *et al.*, 1998), a **concentração/proporção de nutrientes** (como o azoto, fósforo, zinco e o ferro) (Lukac & Aegerter, 1993; Sevilla *et al.*, 2008; Sevilla *et al.*, 2010; Vézic *et al.*, 2002), a **temperatura** (El Semaary, 2010; Rapala *et al.*, 1997; Tonk *et al.*, 2009), a **intensidade de luz** e o conseqüente **tempo de exposição** (Kaebernick *et al.*, 2000; Tonk *et al.*, 2005; Wiedner *et al.*, 2003). Os efeitos dos factores concentração/proporção de nutrientes, temperatura e intensidade de luz sobre o crescimento de estirpes de cianobactérias e sobre a produção cianotoxinas têm merecido alguma atenção

(Kaebernick *et al.*, 2000). Esses estudos têm sido realizados principalmente nos géneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Nodularia* e *Planktothrix* (Sivonen & Jones, 1999).

Existem poucos estudos acerca da influência do pH. Song *et al.* (1998) verificaram o seu efeito na produção de microcistinas em *M. aeruginosa*. Verificaram que a produção de microcistina variou drasticamente a diferentes valores de pH do meio, tendo sido a quantidade total de toxina maior nos valores mais baixos e mais altos de pH testados (7 e 9,2). Já Jähnichen *et al.* (2001) apuraram que nas estirpes estudadas de *M. viridis*, a produção de microcistinas se iniciava quando o pH ultrapassava o valor de 8,4 e que essa síntese acontecia apenas durante a fase exponencial de crescimento.

O efeito da concentração/proporção de nutrientes é um dos factores mais estudados, mas também dos mais discrepantes. Em 1990, Sivonen verificou em várias estirpes de *Oscillatoria agardhii* (actualmente designado de *P. agardhii*) a existência de uma correlação entre as concentrações de azoto e de fósforo com a produção de microcistina. Mais tarde, Rapala *et al.* (1997) apurou em duas estirpes fixadoras de azoto pertencentes ao género *Anabaena*, que o aumento da concentração do fósforo se traduziu num aumento da concentração das toxinas nas células. Por outro lado, Utkilen & Gjølme (1995) constataram a ausência de efeito das condições limitantes de azoto e fósforo estudadas sobre a produção de toxinas em *M. aeruginosa*. Enquanto que Lee *et al.* (2000) e Downing *et al.* (2005) mostraram que o conteúdo de microcistina nesta mesma espécie exibia uma alta correlação com o teor de azoto total, e quanto maior a razão de N:P maior a quantidade produzida na fase exponencial de crescimento. Em 2010, Sevilla *et al.*, empregando a recente metodologia de *PCR* em tempo real, concluiu que apesar do excesso de azoto promover o crescimento celular, não influenciou directamente a transcrição do gene *mcyD* e a produção efectiva de toxina. Também utilizando a mesma técnica Horst *et al.* (2014) demonstrou que em condições limitantes de azoto existia uma redução substancial da quantidade de microcistina produzida por célula, comparativamente a outras condições testadas (condições limitantes de fósforo e condições saturantes de nutrientes), porém com a expressão do gene *mcyB* verificou-se o contrário, tendo aumentado em condições limitantes de azoto. Em suma, o efeito da variação da concentração destes dois nutrientes depende muito das espécies e mesmo estirpes utilizadas nos estudos (Vézic *et al.*, 2002).

Também o ferro e o zinco parecem influenciar a quantidade de microcistina produzida. Segundo o estudo de Lukac & Aegerter (1993) o zinco estimulou um aumento do crescimento e produção de microcistina em *M. aeruginosa*, enquanto que baixas concentrações de ferro conduziram a uma diminuição do crescimento, mas um

aumento significativo da produção de microcistina. Posteriormente, Utkilen & Gjørlme (1995) constataram que a diminuição das concentrações de ferro provocava uma diminuição das concentrações de microcistina produzida, contrariamente às descobertas do estudo anterior. Em 2008, o estudo de Sevilha *et al.* veio corroborar os resultados de Lukac & Aegerter (1993), pois a deficiência de ferro induziu um aumento da síntese de microcistina. Este foi dos primeiros estudos a utilizar a metodologia de PCR em tempo real para estabelecer uma correlação entre o aumento da transcrição de um gene pertencente ao *cluster mcy*, mais concretamente o gene *mcyD*, com a quantidade de microcistina efectivamente produzida (Sevilha *et al.*, 2008). Mais recentemente, o estudo de Alexova *et al.* (2011), também recorrendo à técnica de PCR em tempo real, verificou um aumento na biossíntese da microcistina em condições de deficiência de ferro, contudo, contrariamente ao observado para o gene *mcyD* em Sevilha *et al.* (2008) não se detectou um aumento da transcrição de *mcyA*.

Quanto à influência da temperatura, a maioria dos estudos indica que a maior produção de cianotoxinas acontece sob as condições que são mais favoráveis para o seu crescimento (Carmichael, 2001; Sivonen & Jones, 1999). Diferentes géneros apresentam diferentes temperaturas ideais de crescimento, por exemplo *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* crescem bem a 20°C; *Anabaena* e *Nodularia* entre os 20-25°C; *Microcystis* e *Lyngbya* a 25°C; *Cylindrospermopsis*, *Phormidium* e *Synechococcus* a 30°C, podendo-se esperar assim diferenças no efeito da temperatura entre diferentes géneros de cianobactérias (O'Neil *et al.*, 2012; Paul, 2008; Sivonen & Jones, 1999). Ainda assim, de uma forma geral, a maior produção de toxinas nos géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Nodularia* tem sido associada a temperaturas altas, sensivelmente entre os 18°C e 25°C, enquanto que as temperaturas mais baixas (10°C) ou muito altas (30°C) reduziram os teores de toxinas (Sivonen & Jones, 1999). Em 1990, Sivonen percebeu que as taxas de crescimento e de produção de microcistinas em *P. agardhii* eram máximas a 25°C e mínimas a 30°C. Rapala *et al.* (1997) obtiveram efeitos semelhantes em estirpes de *Anabaena*, verificando-se também que as taxas de produção foram máximas a 25°C e diminuía em temperaturas elevadas (entre os 25 e os 30°C) conjugadas com altas intensidades de luz. O efeito da temperatura tem-se verificado não só ao nível das taxas de produção, mas também ao nível da variante de microcistina produzida, em que temperaturas superiores a 25°C tendem a estimular a produção da variante MC-RR enquanto que temperaturas inferiores tendem a favorecer a produção da variante MC-LR (Figueiredo *et al.*, 2004; Rapala & Sivonen, 1998). Tonk *et al.* (2009) observaram um efeito negativo das temperaturas mais altas sobre a produção de

microcistina-LR em *Anabaena*, ao contrário do que se sucedeu com a produção de microcistina-RR.

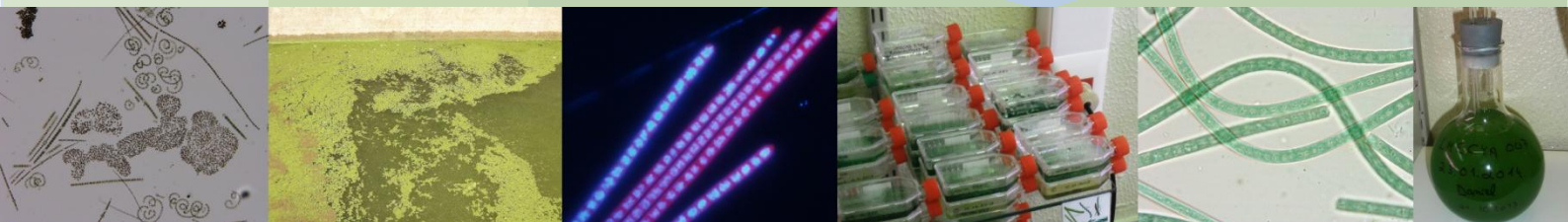
Relativamente ao efeito da luz, a maioria dos estudos refere que a maior produção de cianotoxinas acontece sob as condições que são mais favoráveis para o seu crescimento (Carmichael, 2001; Sivonen & Jones, 1999). Sabe-se ainda que diferentes espécies de cianobactérias têm diferentes necessidades de luz (por exemplo *Planktothrix* prefere baixas intensidades de luz para crescer, *Anabaena* moderada, *Aphanizomenon* e *Microcystis* intensidades de luz mais altas), é, portanto, de esperar que também o seu efeito na produção de toxinas seja dependente do género em causa (Oliver & Ganf, 2002; Sivonen & Jones, 1999). Ainda assim, de uma forma geral, tem-se verificado que a produção de toxina é menor em condições de baixas intensidades de luz (2-20  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e maior em altas intensidades de luz (20-142  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Kaebernick & Neilan, 2001). Wiedner *et al.* (2003) notaram que o aumento da intensidade de luz estimulava a produção de microcistina em *Microcystis* até ao valor em que a taxa de crescimento era máxima (80  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Os valores acima de 80  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  resultaram num declínio da produção da toxina. É assim, de esperar que intensidades saturantes diminuam/suprimam a produção de microcistinas (Wiedner *et al.*, 2003). De facto, o estudo de Tonk *et al.* (2009) confirmou que as taxas de produção de microcistinas foram significativamente menores em condições de luz saturantes (150  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) do que em condições de luz mais baixas (40  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Por outro lado existem alguns estudos acerca da influência da temperatura e da luz usando técnicas biologia molecular, mas são muito limitados. Kaebernick *et al.* (2000) e Tonk *et al.* (2005) utilizando o ensaio de protecção de RNase (RPA) estudaram o efeito da luz na transcrição dos genes *mcy*. Kaebernick *et al.* (2000) observou que em *M. aeruginosa* se registaram maiores níveis de transcrição do gene *mcyB* em culturas expostas a altas intensidades de luz (68 e 400  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e luz vermelha, comparativamente às células expostas a outras intensidades (16 e 31  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e à luz azul. Já Tonk *et al.* (2005) observou um aumento tanto da transcrição do gene *mcyA* como da quantidade de toxina produzida até aos 60  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em *P. agardhii*, e uma diminuição nas intensidades de luz superior a 100  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Este último foi também um dos primeiros estudos a verificar uma associação directa entre o nível de transcrição dos genes e a quantidade de toxina produzida efectivamente.

Os estudos de influência da temperatura e da intensidade de luz, recorrendo à metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR), que se pretende utilizar no presente trabalho, são ainda mais escassos, existindo apenas o de Kim *et al.* (2005) e, mais

recentemente, o de El Semary (2010). Ambos avaliaram a influência destes factores na transcrição do gene *mcyB* no género *Microcystis*, denotando um efeito da temperatura. Contudo, no que se refere à intensidade de luz, os resultados diferiram. Kim *et al.* (2005) constataram que os maiores níveis de transcrição aconteciam em culturas expostas à temperatura de 25°C (comparativamente às temperaturas de 20 e 30°C também testadas). Para além disso, verificaram também um aumento dos níveis de transcrição de *mcyB* quando as culturas expostas à intensidade de luz de 7,53 passaram para uma exposição de 45,15  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . No estudo de El Semary (2010), os maiores níveis de transcrição aconteceram na fase estacionária de crescimento das culturas expostas a 25°C e à intensidade de luz média (14  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), não tendo existido um efeito significativo nas outras intensidades de luz testadas (2,8; 32 e 40  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Contudo, a exposição prolongada à intensidade de 40  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provocou uma inibição da transcrição do gene *mcyB* (El Semary, 2010).

## 2. Objetivos



A informação disponível acerca da influência dos factores ambientais - temperatura e luz - na produção de microcistinas são limitados e pouco consensuais, sobretudo ao nível da expressão génica. Ainda se encontra pouco elucidado quais os reais efeitos destes factores a nível da expressão de alguns genes pertencentes ao cluster *mcy* – responsável pela síntese de microcistinas (como o gene *mcyA*), em diferentes fases do crescimento e em diferentes condições de luz. Assim, neste estudo pretende-se avaliar a relação entre o crescimento, nível de transcrição dos genes *mcy* e quantidade de toxina produzida em diferentes condições de luz, utilizando técnicas moleculares quantitativas inovadoras como a *PCR* em tempo real. Ambiciona-se ainda ajudar a esclarecer se o crescimento e a toxicidade estão ou não relacionados, e de que forma estes factores podem desencadear/inibir a produção de microcistina, possibilitando posteriormente a investigação de novas e melhores estratégias de gestão dos *blooms* de cianobactérias, evitando riscos para saúde animal e humana.

Em suma, o objectivo principal deste estudo é:

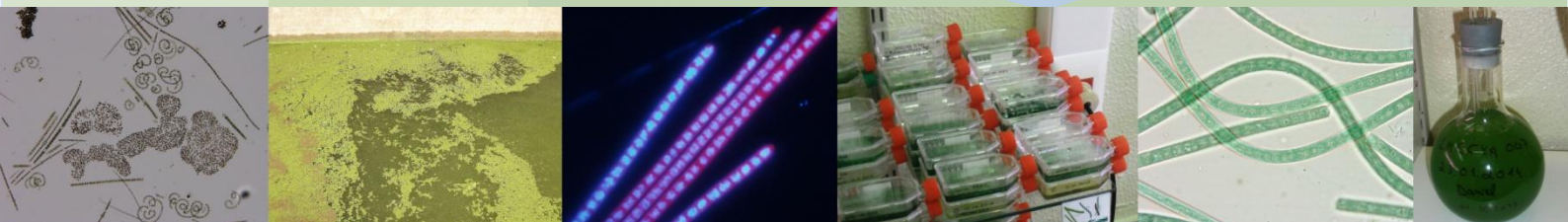
- ☞ Avaliar a influência do factor intensidade de luz, em condições controladas, na transcrição do gene *mcyA* (em diferentes fases do crescimento) e correspondente produção de microcistina em diferentes isolados tóxicos - *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 7) e *Planktothrix agardhii* (LMECYA 256).

Como objectivos secundários, pretende-se simultaneamente:

- ☞ Avaliar a influência das diferentes intensidades de luz no crescimento das duas espécies de cianobactérias;
- ☞ Avaliar e seleccionar vários genes de referência para a normalização da expressão do gene *mcyA* obtida por *RT-qPCR*.



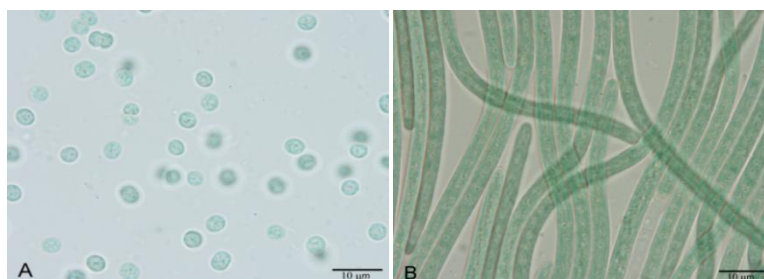
# 3. Materiais e Métodos



### 3.1. Isolados de cianobactérias e condições de cultura

Neste trabalho foram utilizados dois isolados produtores de microcistina - *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 7) (Figura 6A) e *Planktothrix agardhii* (LMECYA 256) (Figura 6B) - pertencentes à coleção de culturas ESSACC (Coleção de Culturas de Cianobactérias Estela Sousa e Silva – LBE-INSA), descrita em mais detalhe em Paulino *et al.* (2009).

Para a propagação das culturas, estas foram mantidas em balões de um litro com arejamento, utilizando meio Z8 (Anexo I) (Skulberg & Skulberg, 1990), sob ciclos de 14 h de luz e 10 h de escuro, com uma intensidade de luz de  $4 \pm 4 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a uma temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 6** – Fotografias das culturas de cianobactérias: A) *M. aeruginosa* – LMECYA 7. B) *P. agardhii* - LMECYA 256.

### 3.2. Condições de cultura testadas

As culturas (100 mL de volume) foram mantidas em três frascos de cultura de  $80 \text{ cm}^2$  com arejamento contínuo na câmara de *Fitoclina S 600* de acordo com a Figura 7. Cada frasco foi exposto durante 18 dias a uma intensidade de luz diferente ( $4 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a uma temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . O valor da intensidade de luz foi medido usando um *Light Meter TES 1335*.

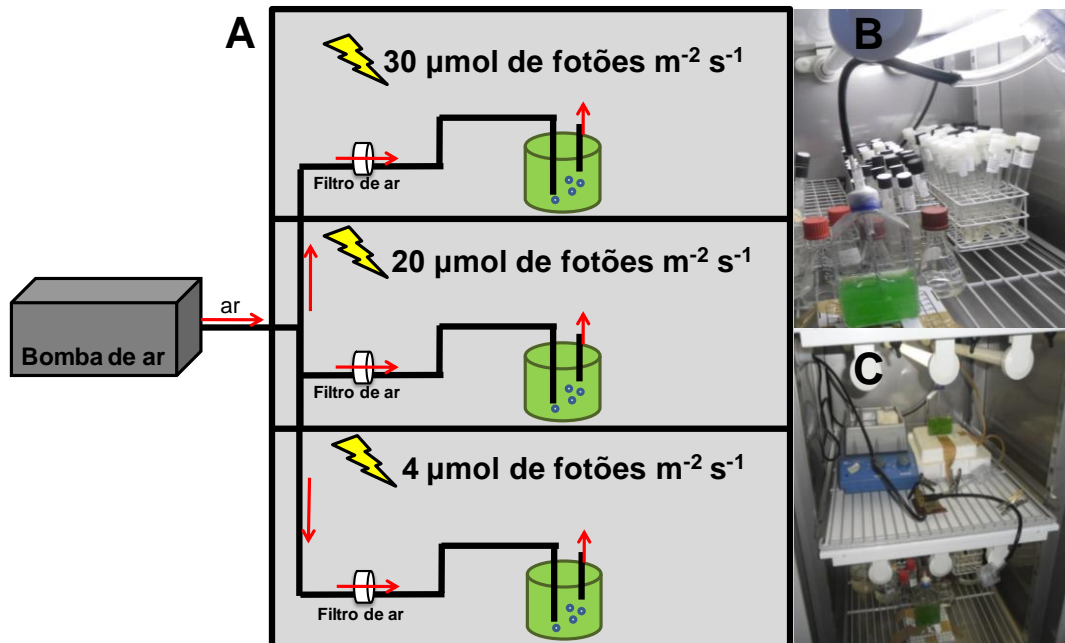
#### **Amostragem**

Foram recolhidas diariamente amostras de cada frasco, para avaliar o crescimento das culturas espectrofotometricamente. Para além disso, foram recolhidas amostras conforme o esquema apresentado na Figura 8, para efectuar a contagem celular, quantificação das microcistinas e extração de *RNA*.

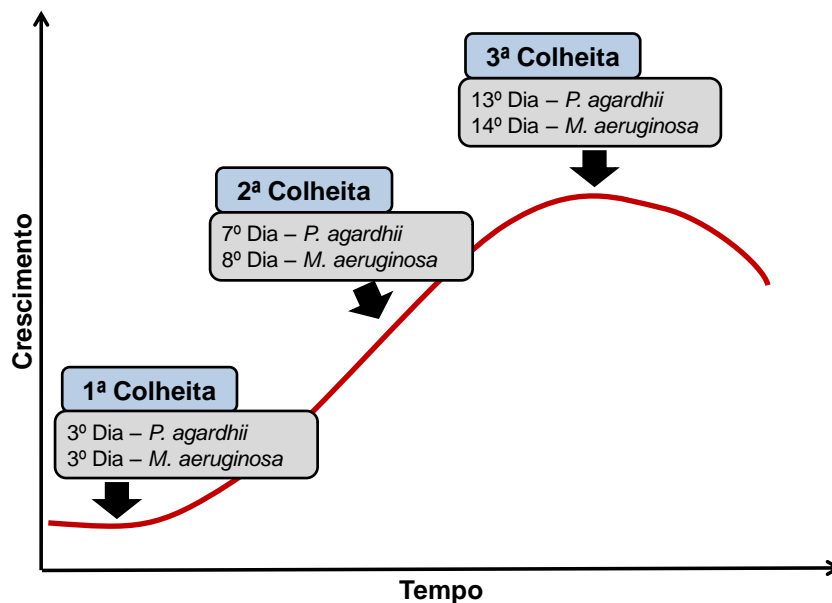
No fim dos 18 dias, o volume de cultura evaporado ( $V_{\text{evaporado}}$ ) de cada frasco exposto às diferentes intensidades de luz foi quantificado utilizando a seguinte fórmula:

$$V_{\text{evaporado}}(\text{mL}) = V_{\text{inicial}}(\text{mL}) - [V_{\text{utilizado}}(\text{mL}) + V_{\text{final}}(\text{mL})]$$

Em que  $V_{\text{inicial}}$  representa o volume inicial de cultura nos frascos (100 mL);  $V_{\text{utilizado}}$  representa o volume de cultura utilizado nas várias operações; e  $V_{\text{final}}$  representa o volume de cultura restante em cada frasco, no fim do ensaio de exposição.



**Figura 7** – Desenho experimental do ensaio de exposição das culturas às diferentes intensidades de luz (4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na câmara de *Fitoclina*. A) Esquema da disposição dos frascos de cultura e respectivas intensidades de luz. B) Fotografia de um frasco de cultura na câmara de *Fitoclina*. C) Fotografia da câmara de *Fitoclina* com os frascos e sistema de arejamento.



**Figura 8** – Representação esquemática das três colheitas de amostras dos frascos de cultura expostos às diferentes intensidades de luz, nas várias fases do crescimento, para contagem celular, quantificação das microcistinas e extração de RNA.

### **3.3. Curva de crescimento, taxa de crescimento e tempo de duplicação**

Para determinar a curva de crescimento retiraram-se 600 µL de cultura de cada frasco (200 µL para cada medição em triplicado) de 24 h em 24 h, durante os 18 dias. Mediu-se a densidade óptica das culturas a 450 nm (Churro *et al.*, 2010), recorrendo-se ao espectrofotómetro *Multiskan Ascend – Thermo Labsystems*.

A avaliação do crescimento utilizando a taxa de crescimento específica ( $\mu_g$ ) e o tempo de duplicação ( $t_D$ ) foi realizada de acordo com o referido em Lopes & Fonseca (1996).

A taxa de crescimento específica por dia foi determinada a partir do declive da recta do gráfico de regressão linear dos valores de  $\ln DO$  correspondentes à fase exponencial de crescimento (representada pela equação  $\ln DO_t = \ln DO_0 + \mu_g t$ ).

O tempo de duplicação (por dia) foi calculado de acordo com a fórmula:

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu_g}$$

Em que  $\ln 2 = 0,693$  e  $\mu_g$  representa a taxa de crescimento específica.

#### **Análise estatística**

Os dados do crescimento, obtidos às várias intensidades de luz, foram analisados detalhadamente recorrendo a diversas análises estatísticas (explicadas em detalhe no Anexo II). Em suma, a fim de averiguar a existência de uma associação entre o crescimento e intensidade de luz utilizou-se inicialmente a análise de correlação simples – correlação de *Pearson*, com uma margem de erro de 5% (El Semary, 2010). Aferida essa correlação, pretendeu-se saber se existiram diferenças significativas entre o crescimento nas três intensidades de luz. Para tal, ponderou-se aplicar a análise de variância simples – ANOVA, contudo uma vez que os requisitos para o seu uso não foram satisfeitos, utilizou-se o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* com uma margem de erro de 5% (Marôco, 2014; McDonald, 2009). Notadas diferenças, importou perceber entre que intensidades de luz ocorreram essas desigualdades e, por isso, utilizou-se o teste *a posteriori* de comparações múltiplas - teste de *Dunn* com uma margem de erro de 5% (Marôco, 2014). Com a sua aplicação foi assim possível comparar o crescimento entre as diferentes intensidades de luz, analisando-se as intensidades duas a duas. Por fim empregou-se o teste *t-Student* com uma margem de erro de 5%, para avaliar as diferenças entre o crescimento nas três intensidades de luz em cada dia, agrupando-se as intensidades duas a duas (McDonald, 2009).

### 3.4. Contagem celular

Antecipadamente preparou-se uma solução de lugol, de acordo com a informação referenciada por Utkilen *et al.* (1999) e referida no Anexo III. Em seguida elaborou-se a solução de fixação, adicionando-se uma gota de lugol por cada 10 mL de água destilada.

As alíquotas de 1 mL recolhidas para efectuar a contagem celular foram depois fixadas nessa mesma solução, numa diluição inicial de 1:50, embora nas concentrações celulares mais elevadas se tenham efectuado diluições adicionais. Colocou-se 1 mL da cultura fixada em lugol na câmara de contagem *Sedgewick-Rafter* e aguardou-se cerca de 30 min para as células sedimentarem. Passado esse tempo, para *M. aeruginosa* contaram-se as células que existiam em 40 quadrículas aleatórias utilizando o microscópio invertido *Olympus PM-PB20*. A concentração celular (células/mL) para a cultura de *M. aeruginosa* foi depois determinada através das seguintes fórmulas:

$$(1) C_{inicial} \text{ (células/mL)} = \frac{\text{Número de células existentes em 40 quadrículas} * 1000 \mu\text{L}}{40 \mu\text{L}}$$

$$(2) C_{final} \text{ (células/mL)} = C_{inicial} * \text{factor de diluição}$$

Para *P. agardhii* mediu-se o comprimento total dos filamentos (utilizando a escala da ocular) existentes em 40 quadrículas da câmara, utilizando o microscópio anteriormente referido. Posteriormente fotografaram-se vários filamentos no microscópio *Olympus Bx 60* e determinou-se através das fotografias o comprimento médio de cada célula utilizando o software *ImageJ 1.47h*. A concentração celular (células/mL) para a cultura de *P. agardhii* foi depois estabelecida através das seguintes fórmulas:

$$(1) \text{Comprimento}_{total} (\mu\text{m}) = \text{Compr. dos filamentos em 40 quadrículas} (\mu\text{m}) * 5,1$$

Em que 5,1 representa o factor de ampliação da escala da objectiva de 20x.

$$(2) \text{N}^{\circ} \text{ de células existentes em 40 quadrículas} = \frac{\text{Comprimento}_{total} (\mu\text{m})}{\text{Comprimento de cada célula} (\mu\text{m})}$$

$$(3) C_{inicial} \text{ (células/mL)} = \frac{\text{Número de células existentes em 40 quadrículas} * 1000 \mu\text{L}}{40 \mu\text{L}}$$

$$(4) C_{final} \text{ (células/mL)} = C_{inicial} * \text{factor de diluição}$$

### 3.5. Quantificação da microcistina

Para a quantificação das microcistinas (mic) produzidas utilizou-se um método analítico - teste de ELISA. Este ensaio bioquímico utiliza anticorpos e uma mudança de cor mediada por uma enzima para detectar a presença de antígenos ou de

anticorpos de uma determinada amostra (Gan & Patel, 2013). Neste estudo, foi usado o kit *Microcystins (Adda specific) ELISA* (Enzo Life Sciences), que utiliza anticorpos que se ligam especificamente à porção *Adda* da microcistina. Este método permite determinar a quantidade de microcistinas totais, com uma sensibilidade de 0,1 ng/mL. O procedimento experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Para além da quantificação absoluta das microcistinas ( $\mu\text{g/mL}$ ) em cada amostra, determinou-se também a concentração de microcistina por célula ( $\mu\text{g/célula}$ ) recorrendo à fórmula:

$$\text{Concentração}_{\text{mic por célula}} (\mu\text{g/célula}) = \frac{\text{Conc. absoluta de microcistinas } (\mu\text{g/mL})}{\text{Conc. celular (células/mL)}}$$

### 3.6. Extracção de ácidos nucleicos

#### 3.6.1. Extracção de DNA

Foi necessário proceder à extração prévia de *DNA* das duas culturas, para se poder otimizar as condições de *PCR* dos vários *primers*, e para se obter um controlo positivo no *PCR* convencional realizado às amostras de *RNA* como despiste de contaminação com *DNA*. O protocolo de extração de *DNA* utilizado resultou da adaptação do método usado em Santos & Phillips (2009) e encontra-se descrito em detalhe no Anexo IV.

Depois da extração, as amostras foram quantificadas no *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific) e as razões de purezas avaliadas de acordo com o referido em [http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality) (Acedido a 13 de Dezembro 2013).

#### 3.6.2. Extracção e purificação do RNA

O procedimento de extração de *RNA* resultou da compilação e adaptação dos métodos utilizados em Pinto *et al.* (2009), Singh *et al.* (2010) e Tran *et al.* (2013). O protocolo final usado encontra-se descrito no Anexo V.

As amostras de *RNA* extraído foram posteriormente purificadas com o kit *High Pure RNA Isolation* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante, e quantificadas no *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). As suas razões de purezas foram apreciadas de acordo com o descrito em [http://biomedicalgenomics.org/RNA\\_quality\\_control.html](http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html) (Acedido a 12 de Dezembro 2013).

### 3.7. Genes em estudo, desenho de primers e amplificação específica

#### 3.7.1. Genes em estudo

Neste estudo foi analisado o gene *mcyA* pertencente ao *cluster mcy*, responsável pela síntese das microcistinas, e o qual se pretende quantificar a expressão.

Na técnica de *RT-qPCR* a quantificação do *mRNA* resultante da transcrição dos genes em estudo pode ser absoluta ou relativa. Na quantificação relativa usam-se genes de referência, expressos em todas as células e essenciais para a sobrevivência de cada uma, apresentando por isso teoricamente uma expressão constante independentemente das condições ambientais (Kozera & Rapacz, 2013; Pfaffl, 2001). Tendo em conta que se recorrerá ao método de quantificação relativa para a análise dos resultados obtidos, foram seleccionados três genes de referência, *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1*, descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Descrição/função dos genes de referência utilizados na normalização da expressão obtida por *PCR* quantitativo em tempo real.

Gene	Descrição/Função	Referência Bibliográfica
<i>rRNA 16S</i>	Constituinte estrutural da subunidade menor do ribossoma. Actua como suporte na definição das posições das proteínas ribossomais.	Botteldoorn <i>et al.</i> , 2006 Pinto <i>et al.</i> , 2012 Tran <i>et al.</i> , 2013
<i>rpoC1</i>	Codifica a subunidade gama da RNA polimerase dependente de DNA.	Alexova <i>et al.</i> , 2011 Churro <i>et al.</i> , 2012b Ngwa <i>et al.</i> , 2014
<i>gltA</i>	Também designado por <i>cit</i> . Citrato sintase que actua ao nível do Ciclo do Ácido	Tran <i>et al.</i> , 2013

#### 3.7.2. Desenho de primers

Os *primers* para o gene *mcyA* foram seleccionados a partir dos descritos na bibliografia (ver informação detalhada no Anexo VI). A triagem teve em conta três principais critérios: codificarem um fragmento entre 100 e 300 pb para assegurar o sucesso da reacção de *RT-qPCR* (Fraga *et al.*, 2008), amplificarem um fragmento de tamanho semelhante entre o género *Microcystis* e *Planktothrix*, e amplificarem um fragmento de dimensão idêntica aos vários genes utilizados no estudo. A selecção recaiu então sobre os *primers* que constam na Tabela 3, e seu local de hibridação encontra-se representado na Figura 9.

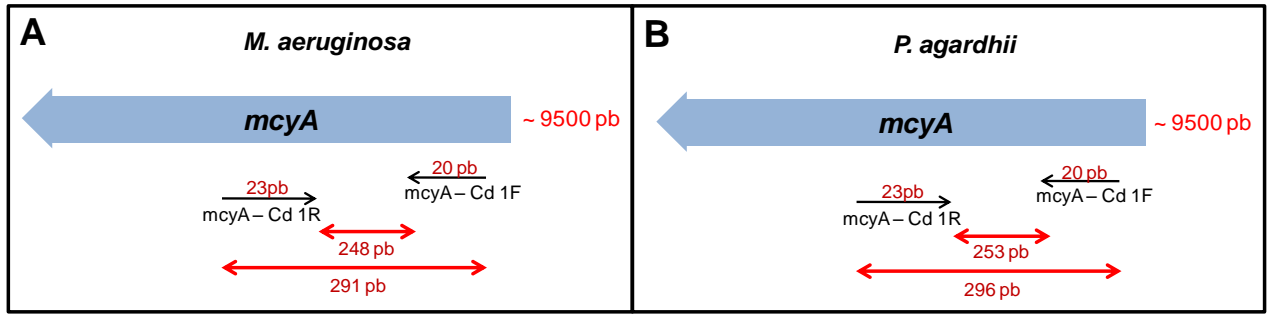
**Tabela 3** – Primers utilizados na amplificação dos genes *mcyA*, *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1*, e respectivas temperaturas de *annealing*.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do Fragmento (pb)	Temperatura de <i>Annealing</i> (°C)	Referência Bibliográfica	Observações
<i>mcyA</i>	mcyA-Cd 1F	AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA	291–297*	59	Hisbergues <i>et al.</i> , 2003	Universal para cianobactérias
	mcyA-Cd 1R	AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT				
<i>rRNA 16S</i>	CYA106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	258	60	Adaptado de Nübel <i>et al.</i> , 1997	Universal para cianobactérias
	CYA359F**	CCCATTGCGGAARATTCCCC				
<i>gltA</i>	<i>gltA</i> _F793	TATAAAGTTAARGATCCCCGGGC	265	52	Este estudo	Específico para <i>Microcystis</i> e <i>Planktothrix</i>
	<i>gltA</i> _R1039	ASTTGTTCTTTCCAGTGGG				
<i>rpoC1</i>	<i>rpoC1</i> _Plank_F271	TGTTAAATCCAGGTA ACTATGACGGCCTA	210	58	Churro <i>et al.</i> , 2012b	Específico para <i>Planktothrix</i>
	<i>rpoC1</i> _P_agardhii_R472	GCGTTTTTGTCCCTTAGCAACGG				
	<i>rpoC1</i> _Mic_F335	GCCTATGTGGTTCTCGATCCGG	235	62	Este Estudo	Específico para <i>Microcystis</i>
	<i>rpoC1</i> _Mic_R 545	GCCCGTTTTTGCCCYTTACTTTTCGAC				

Fragmento de 291 pb em *M. aeruginosa* e um fragmento de 296 pb em *P. agardhii*.

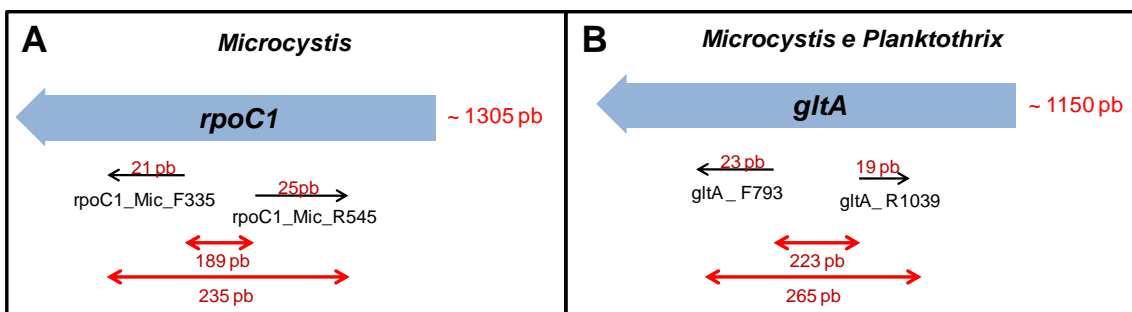
\*\* Apesar de ser um *primer forward* utilizou-se o complementar reverso deste como *primer reverse*.





**Figura 9** – Representação esquemática do local de hibridação dos *primers* utilizados na amplificação do gene *mcyA*: A) Local de hibridação em *M. aeruginosa*. B) Local de hibridação em *P. agardhii*.

Os *primers* utilizados para o gene de referência *rRNA 16S* foram adaptados de Nübel *et al.* (1997) e constam da Tabela 3. Já os *primers* do gene *rpoC1* para o género *Planktothrix* encontram-se descritos em Churro *et al.* (2012b) (Tabela 3). Para o género *Microcystis* desenharam-se novos *primers* para o gene *rpoC1*, tal como para o gene *gltA*. Para o desenho dos *primers*, retiram-se várias sequências dos dois genes das bases de dados *NCBI* e *Cyanobase*. Para cada um, procedeu-se ao alinhamento das sequências com recurso ao software *BioEdit*® v.7.0.5 (Hall, 1999), apurando-se as melhores regiões conservadas, com o objectivo de obtermos um fragmento com um tamanho entre 200 e 300 pb e com o menor número de nucleótidos variáveis. A capacidade de poderem gerar *hairpins*, auto-dímeros e hetero-dímeros foi analisada com o software *OligoAnalyzer 3.1* (Owczarzy *et al.*, 2008). Os *primers* foram sintetizados pela *Thermo Fisher Scientific*. Para testa-los, realizou-se um *PCR* convencional, sequenciaram-se os fragmentos e confirmou-se a identidade das sequências obtidas recorrendo à ferramenta de *Blastn* no *NCBI*. Tal como os *primers* anteriores, também estes constam da Tabela 3 e o seu local de hibridação está representado na Figura 10.



**Figura 10** – Representação esquemática do local de hibridação dos *primers* *rpoC1* e *gltA*: A) Amplificação do gene *rpoC1* no género *Microcystis*. B) Amplificação do gene *gltA* nos géneros *Microcystis* e *Planktothrix*.

### 3.7.3. Condições do PCR convencional

Seleccionados e validados os *primers* foi necessário otimizar a sua temperatura de *annealing* (temperatura de hibridação) com recurso ao PCR convencional. Para além disso, esta reacção foi utilizada também para despiste da contaminação de DNA das amostras de RNA purificadas.

A reacção de PCR convencional foi executada numa mistura de reacção de 25 µL contendo: 1x de PCR Rxn Buffer (Invitrogen); 0,05 mM de dNTPs (Invitrogen); 0,3 µM de cada primer (Thermo Fisher Scientific); 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 0,05% (v/v) de W-1; 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen); e 2 µL de DNA a 50 ng/µL (nas reacções de optimização da temperatura de *annealing* dos primers) ou 2 µL de extracto de RNA (nas reacções de despiste da contaminação de DNA). A amplificação foi realizada num termociclador TGradient (Biometra) tendo sido utilizado o programa que consta na Tabela 4. Os produtos de PCR amplificados foram depois separados por electroforese em gel de agarose a 1% com 0,25x de GelRed Nucleotic Acid Strain (Biotium) incorporado, e visualizados por exposição à luz UV.

**Tabela 4** – Programa do PCR convencional utilizado para a optimização de primers e para o despiste de contaminação de DNA nas amostras de RNA purificadas.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo
Desnaturação Inicial	95	5 min	1x
Desnaturação	95	30 seg	40x
<i>Annealing</i> (hibridação dos primers)	T <sub>ann</sub> *	30 seg	
Extensão	72	30 seg	
Extensão final	72	5 min	1x

\* De acordo com o par de primers usado – ver Tabela 3.

## 3.8. Expressão génica

### 3.8.1. Construção de rectas padrão em RT-qPCR

A técnica de PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR) é bastante semelhante à técnica de PCR convencional, divergindo na possibilidade de quantificar e observar o DNA amplificado em tempo real em cada ciclo de amplificação, sem ser preciso de esperar pela conclusão da mesma (Oliveira, 2010; Martins & Vasconcelos, 2011).

Antes de seguir para a próxima etapa, foi necessário confirmar que as condições de *PCR* seleccionadas anteriormente, desta vez em *RT-qPCR*, se dariam nas condições óptimas, nomeadamente com um coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) superior a 0,95% e uma eficiência entre 80-115% (Zhang & Fang, 2006). O método de optimização baseou-se na construção de rectas padrão e resultou de uma adaptação às informações descritas em [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_042486.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042486.pdf) (Acedido a 5 de Abril 2014) e em Perini *et al.* (2011).

Primeiramente, os produtos de *PCR* amplificados com cada par de *primers* (Tabelas 3 e 4), foram purificados com o kit *JetQuick® DNA Purification (Genomed)* de acordo com instruções do fabricante. Quantificou-se a concentração de *DNA* nos produtos purificados, recorrendo ao *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)*. Em seguida, procedeu-se ao cálculo da massa de cada fragmento ( $m$ ) com a fórmula:

$$m(g) = n (pb) * \frac{1 \text{ mole}}{6,023 * 10^{23} \text{ moléculas (bp)}} * \frac{660 \text{ g}}{\text{mole}} = n (pb) * \frac{1,096 * 10^{-21} \text{ g}}{bp}$$

Em que  $n$  representa o tamanho do fragmento de *DNA* (pb);  $6,023 * 10^{23}$  o número de Avogadro; e 660 (g/mole) o peso molecular médio de um par de bases. Calculada a massa de cada fragmento, e sabendo a concentração de *DNA* nas amostras de produtos de *PCR* purificados (quantificados anteriormente), determinou-se a quantidade de fragmentos na amostra com a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de fragmentos} = \frac{\text{Concentração de DNA nos produtos de PCR purificados (g/}\mu\text{L)}}{\text{Massa de cada fragmento (g)}}$$

Posto isto, efectuaram-se diluições seriadas de 1:100 e posteriormente 1:10 para obter uma concentração final de 1000 000, 100 000, 10 000 e 1000 fragmentos por reacção.

As várias diluições foram usadas em ensaios de *RT-qPCR* no *Rotor-Gene 3000 (Quiagen-Corbett)*, utilizando-se o kit *SensiMix™ SYBR No-ROX (Bioline)* (para *DNA*). Os seguintes reagentes foram adicionados numa mistura de reacção de 12,5  $\mu\text{L}$ : 6,25  $\mu\text{L}$  de *SensiMix™ SYBR No-ROX*; 0,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (a 50 mM); 0,125  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (a 10 mM) (*Thermo Fisher Scientific*) e 4  $\mu\text{L}$  de produtos de *PCR* purificados, às concentrações de 1000 000, 100 000, 10 000 ou 1000 fragmentos por reacção. As amostras foram analisadas em triplicado. O programa de amplificação de *RT-qPCR* encontra-se na Tabela 5. Para confirmar a especificidade do produto de *PCR* amplificado, realizou-se sempre uma curva de *melting* da fluorescência no final dos 40 ciclos, com um aumento gradual da temperatura de 60 para os 99°C, através do aumento de 1°C a cada segundo. A linha de *threshold* foi fixada em 0,02 de sinal de fluorescência para todos os testes de *RT-qPCR*, usando o software *Rotor-Gene 3000 series*. Por fim, todos os parâmetros da reacção foram avaliados.

**Tabela 5** – Programa de *RT-qPCR* utilizado na otimização dos *primers*.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95	3 min	1x
Desnaturação	95	20 seg	40x
<i>Annealing</i> (hibridação dos <i>primers</i> )	T <sub>ann</sub> *	20 seg	
Extensão	72	20 seg	
<i>Melting</i>	60 99	Começar com uma rampa de 1°C / seg	1x

De acordo com o par de *primers* usado – ver Tabela 3.

### 3.8.2. Condições experimentais em *RT-qPCR*

A técnica de *PCR* em tempo real quantitativo, combinada com a reacção de transcrição reversa, permite sintetizar *cDNA* a partir de *RNA* e, assim, quantificar o *RNA* transcrito (Smith & Osborn 2009). Esta técnica é cada vez mais recorrente em estudos de biologia molecular, especialmente nos de expressão génica, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na quantificação de perfis de expressão de genes de interesse (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001).

Também os ensaios de *RT-qPCR* foram realizados no *Rotor-Gene 3000* (Quiagen-Corbett), e utilizou-se o kit *SensiMix™ SYBR No-ROX One-Step* (Bioline) (para *RNA*). Os seguintes reagentes foram adicionados numa mistura de reacção de 25 µL: 12,5 µL de *SensiMix™ SYBR No-ROX One-Step*; 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (a 50 mM); 0,5 µL de cada *primer* (a 10 mM) (*Thermo Fisher Scientific*); 0,5 µL de *RNase Inhibitor*; e 4 µL de amostra de *RNA* a 5 ng/ µL. As amostras foram analisadas em triplicado. O programa de amplificação de *RT-qPCR* encontra-se na Tabela 6. Para confirmar a especificidade do produto de *PCR* amplificado, realizou-se sempre uma curva de *melting* da fluorescência no final dos 40 ciclos, com um aumento gradual da temperatura de 50 para os 95°C, através do aumento de 1°C a cada segundo. A linha de *threshold* foi fixada em 0,02 de sinal de fluorescência para todos os testes de *RT-qPCR*, usando o software *Rotor-Gene 3000 series*.

Tabela 6 – Programa de RT-qPCR utilizado.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Transcrição reversa	42	10 min	1x
Activação da polimerase	95	10 min	1x
<i>PCR</i>			
Desnaturação	95	20 seg	40x
<i>Annealing</i> (hibridação dos <i>primers</i> )	T <sub>ann</sub> *	30 seg	
Extensão	72	30 seg	
<i>Melting</i>	50	Começar com uma rampa de 1°C / seg	1x
	95		

De acordo com o par de *primers* usado – ver Tabela 3.

### 3.8.3 Avaliação da estabilidade dos genes de referência

Para avaliar a estabilidade dos genes de referência *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1* durante o período de exposição às diferentes intensidades de luz, os valores de Ct obtidos pela reacção de RT-qPCR foram analisados utilizando-se três algoritmos matemáticos distintos: *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), *Normfinder* (Andersen *et al.*, 2004) e *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004).

O algoritmo *geNorm* é o mais utilizado na literatura, baseando-se na transformação dos valores de “Ct não tratados” das amostras, em quantidade absoluta de cada gene (Q). A medida de estabilidade da expressão génica (M) para um gene de referência é calculado pela variação média dos pares de genes testados, uns contra os outros. Quanto menor o valor M, maior a estabilidade. Calculou-se previamente a quantidade relativa de cada gene, importaram-se os dados para o software *geNorm Excel versão 3* e procedeu-se à sua análise.

O algoritmo *NormFinder* permite identificar o melhor gene de referência entre vários candidatos, baseando-se na variação global dos mesmos (variação inter-grupo) e na variação entre os subgrupos da amostra (variação intra-grupo). Combinados estes dois dados, resulta um único valor de estabilidade para cada gene de referência. Para aplicação deste algoritmo é necessária a transformação dos valores de “Ct não tratados” na quantidade absoluta de cada gene, tal como acontece com *geNorm*. Os genes com os valores mais baixos do coeficiente de estabilidade (M) têm a expressão mais estável. Calculou-se então a quantidade relativa de cada gene, importaram-se os dados para o software *NormFinder Excel v0.953* e determinaram-se os coeficientes de estabilidade.

A quantidade absoluta de cada gene (Q) utilizada foi antecipadamente calculada utilizando a fórmula adaptada de Tran *et al.*, 2013:

$$[DNA] = 10^{\frac{Ct-b}{m}}$$

Em que  $[DNA]$  representa a quantidade absoluta de cada gene;  $Ct$  representa o ciclo de *threshold* da amostra;  $m$  o declive da recta e  $b$  a ordenada na origem da recta de eficiência de cada par de *primers*.

O último algoritmo utilizado foi o *BestKeeper*, que se fundamenta no cálculo dos desvios padrões e nos coeficientes de variação, tendo como base os valores de “Ct não tratados” dos vários genes de referência. O coeficiente de correlação de *Pearson* foi também determinado para cada par de genes. Assim, todos os valores de Ct obtidos nas várias reacções de *RT-qPCR* foram importados para o software *Microsoft Excel BestKeeper versão 1* e analisados.

#### 3.8.4 Quantificação da expressão génica

A quantificação relativa da expressão génica baseia-se na comparação dos níveis de expressão do gene alvo com os níveis de genes de referência. Em muitos trabalhos, este é o tipo de quantificação mais utilizado para avaliar as alterações fisiológicas nos níveis de expressão de determinados genes (Pfaffl, 2004).

Neste estudo foi utilizado o método matemático de quantificação relativa para *RT-qPCR* desenvolvido por Pfaffl (2001). Este método oferece diversas vantagens, designadamente, a necessidade de elaborar rectas padrão apenas no início do estudo, e a eficiência das reacções do gene alvo/gene de referência não ter de ser obrigatoriamente igual, uma vez que é efectuada a devida correcção na fórmula. Para além disso, é assumidamente fiável, preciso e reprodutível, permitindo calcular a expressão relativa do gene em estudo através da fórmula:

$$R = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct_{\text{gene alvo}} (\text{controlo-amostra})}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta Ct_{\text{gene referência}} (\text{controlo-amostra})}}$$

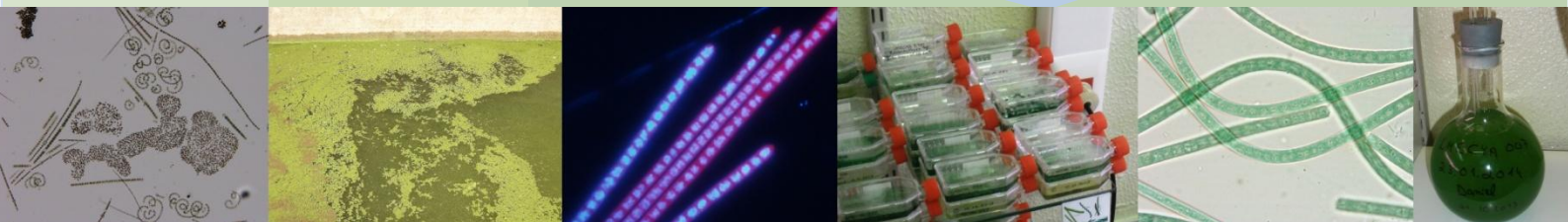
Em que  $R$  representa a taxa de expressão relativa do gene alvo *mcyA* relativamente a um gene de referência, *rRNA 16S* ou *gltA* ou *rpoC1*;  $E_{\text{gene alvo}}$  representa a eficiência da reacção de *RT-qPCR* do gene alvo (*mcyA*);  $E_{\text{gene referência}}$  representa a eficiência da reacção de *RT-qPCR* do gene de referência seleccionado;  $\Delta Ct_{\text{gene alvo}}$  representa a variação do ciclo de *threshold* do gene alvo (Ct da condição controlo – Ct da amostra a analisar); e  $\Delta Ct_{\text{gene referência}}$  representa a variação do ciclo de *threshold* do gene de referência (Ct da condição controlo – Ct da amostra do gene de referência a analisar).

O valor da expressão relativa apresentado resulta da média de três valores medidos. Todos os dados foram tratados no software *Microsoft Office Excel*.

Para analisar a expressão do gene *mcyA*, em cada fase do crescimento utilizou-se como condição controlo o nível de expressão na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já para o estudo da evolução da expressão ao longo do tempo, fixou-se como condição controlo o nível de expressão existente no terceiro dia de exposição (fase de adaptação).

As diferenças de expressão entre as várias intensidades de luz e entre as várias fases de crescimento foram investigadas pelo teste *t-Student*, com uma margem de erro de 5% (estudaram-se as intensidades de luz e as fases do crescimento duas a duas). Avaliou-se a hipótese nula, dos valores médios terem sido iguais, contra uma hipótese alternativa dos valores médios terem sido diferentes. Se o *p-value* obtido for superior à margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula (os valores médios entre as duas intensidades de luz/ fases do crescimento foram idênticos), se for igual ou inferior ( $P \leq 0,05$ ) rejeita-se a hipótese nula.

# 4. Resultados





## 4.1. Avaliação do crescimento nas diferentes intensidades de luz

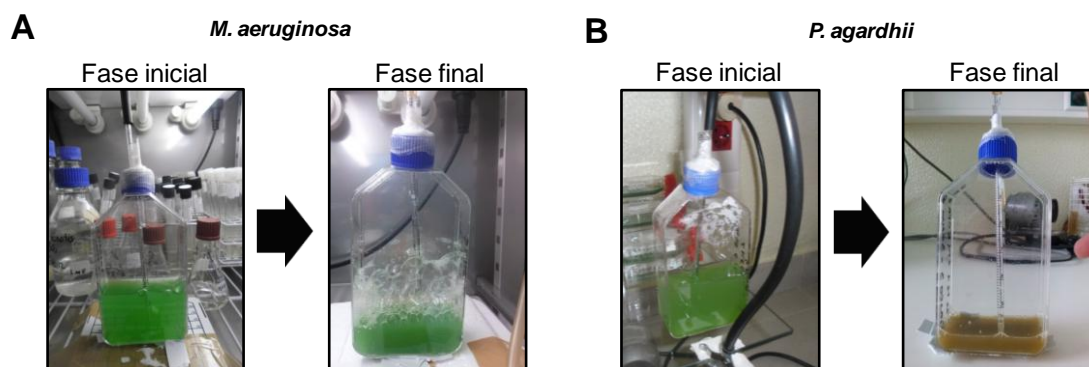
### 4.1.1. Caracterização das culturas ao longo do ensaio

Uma vez que o ensaio decorreu durante cerca de 18 dias e sendo necessário arejamento contínuo, era espectável alguma evaporação da cultura ao longo dos dias. Depois de determinar o volume de cultura evaporado em cada frasco, durante o período de exposição, às várias intensidades de luz, verificou-se que esta evaporação foi reduzida e bastante semelhante em ambas as espécies de cianobactérias. A maior evaporação (cerca de 14 mL) aconteceu nos frascos expostos à intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a menor nos frascos expostos à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (cerca de 11 mL), como se pode observar na Tabela 7.

**Tabela 7** – Volume de cultura evaporado em cada frasco durante o período de exposição às intensidades de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Intensidade de luz	Volume de cultura evaporado (mL)
4 $\mu\text{mol}$ de fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	11
20 $\mu\text{mol}$ de fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	13
30 $\mu\text{mol}$ de fotões $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	14

Na fase inicial do ensaio as culturas de *M. aeruginosa* e *P. agardhii* encontravam-se verdes e pouco densas, com características semelhantes. No fim do ensaio o aspecto e a densidade das culturas diferiram. As culturas de *M. aeruginosa* encontravam-se líquidas e com uma cor verde clara/transparente, enquanto que as culturas de *P. agardhii* expostas às intensidades de luz de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tinham um aspecto “pastoso” e com uma cor acastanhada, como se constata na Figura 11.



**Figura 11** – Fotografias dos frascos de cultura na fase inicial e final do ensaio de exposição a 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A) *M. aeruginosa*. B) *P. agardhii*.

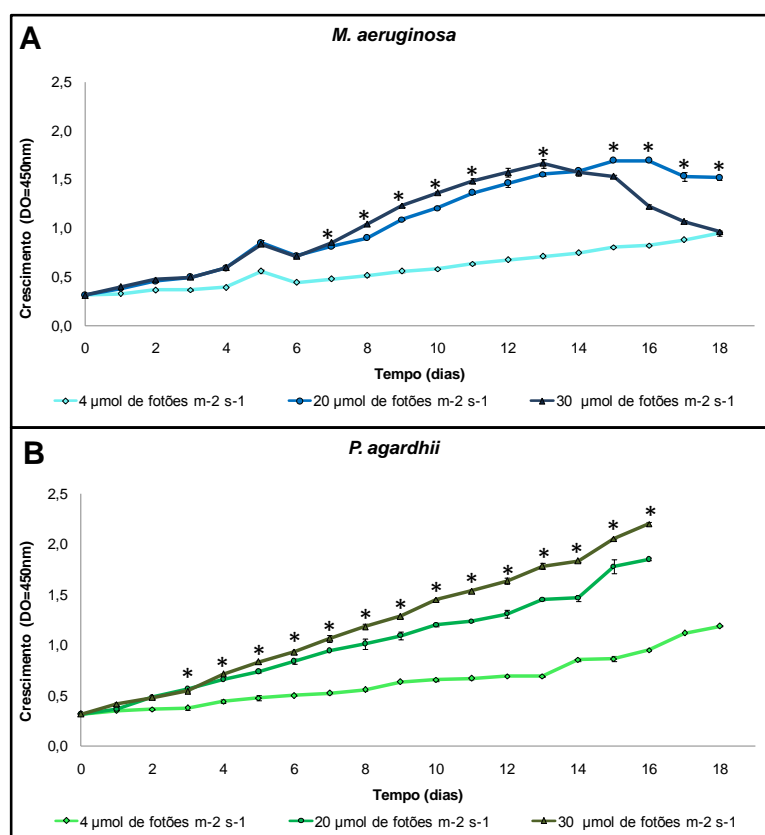
#### 4.1.2. Curvas de crescimento

Durante o ensaio mediram-se as densidades ópticas das culturas nas várias intensidades de luz, tendo resultado três curvas de crescimento para cada espécie de cianobactérias (Figura 12).

##### ***M. aeruginosa***

A cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  exibiu uma curva com um crescimento contínuo ao longo do tempo. Já nas curvas de crescimento das culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , foi possível identificar facilmente as quatro fases características do crescimento microbiano (fase de adaptação, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de morte celular), como se verifica na Figura 12A.

Relativamente à análise estatística, primeiramente aplicou-se o teste de correlação de *Pearson* às densidades ópticas medidas nas diferentes condições de luz, identificando-se uma relação entre crescimento e intensidade de luz ( $P = 0,000$ ) em *M. aeruginosa*. Comprovada essa associação, equacionou-se utilizar a ANOVA para compreender se existiriam diferenças significativas entre o crescimento nas três intensidades de luz. Contudo, quando se avaliaram os dois pressupostos necessários para a sua aplicação, percebeu-se não ser possível, uma vez que nenhum dos dois requisitos para o seu uso foi satisfeito. Por um lado, existiu normalidade nos dados de crescimento em 4 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teste *Kolmogorov-Smirnov*,  $P = 0,200$  e  $P = 0,200$  respectivamente), mas não nos dados de 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teste *Kolmogorov-Smirnov*,  $P = 0,006$ ). Não existiu também igualdade de variâncias das intensidades de luz testadas (Teste de *Levene*,  $P = 0,000$ ). Como alternativa, utilizou-se o Teste *Kruskal-Wallis*, tendo-se apurado diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento nas três intensidades ( $P = 0,000$ ). Posto isto, aplicou-se o Teste de *Dunn* e perceberam-se acentuadas diferenças entre o crescimento nas intensidades de 4 e 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e entre 4 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $P = 0,000$  e  $P = 0,000$  respectivamente). O crescimento entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi idêntico (Teste de *Dunn*,  $P = 0,908$ ). Em cada dia avaliaram-se também as diferenças de crescimento entre as várias intensidades. Nos 18 dias existiram sempre diferenças estatisticamente significativas entre as intensidades de 4 e 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e entre 4 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ). Enquanto que entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  existiram diferenças estatisticamente significativas em apenas 10 dos 18 dias de exposição (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 12A).



**Figura 12** – Curvas de crescimento das espécies: A) *M. aeruginosa* e B) *P. agardhii* durante os 18 dias de exposição. O valor da densidade óptica representada em cada dia resulta da média de três leituras. As barras de erro representam o valor do erro padrão. O \* denota os dias em que existiram diferenças estaticamente significativas (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) entre o crescimento das culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### *P. agardhii*

Nas três curvas de crescimento de *P. agardhii* não foi possível identificar tão facilmente as típicas fases de crescimento microbiano (Figura 12B). Por exemplo, a cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  cresceu continuamente ao longo do tempo tal como em *M. aeruginosa*. Para as culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  não foi possível medir correctamente a densidade óptica nos dois últimos dias do ensaio. Pois apesar de se notar abundante morte celular na cultura, quer ao nível das observações microscópicas, quer ao nível do seu aspecto macroscópico (aspecto pastoso e cor acastanhada), obtiveram-se medições exageradas da densidade óptica nestes últimos dois dias. Estes valores não corresponderam a crescimento celular mas antes num aumento da absorção por parte dos compostos resultantes da lise celular.

Quanto à análise estatística, aplicou-se o teste de correlação de *Pearson* às densidades ópticas medidas. Também neste caso se apurou uma relação entre o crescimento e a intensidade de luz ( $P = 0,000$ ), como em *M. aeruginosa*. Estabelecida

essa associação, tentou-se igualmente utilizar a ANOVA para aferir se existiriam diferenças significativas. No entanto, tal não foi possível, uma vez que nenhum dos requisitos para a sua aplicação foi satisfeito. Não existiu normalidade nos dados de crescimento em 4 e 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teste *Kolmogorov-Smirnov*,  $P = 0,004$  e  $P = 0,001$  respectivamente), ao contrário dos dados da intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teste *Kolmogorov-Smirnov*,  $P = 0,200$ ). Também não se verificou a igualdade de variâncias das intensidades de luz estudadas (Teste de *Levene*,  $P = 0,000$ ). Como alternativa utilizou-se o Teste *Kruskal-Wallis*, tendo-se aferido diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento nas três intensidades de luz ( $P = 0,000$ ). Aplicando o Teste de *Dunn* verificaram-se diferenças significativas entre o crescimento nas intensidades de 4 e 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e entre 4 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $P = 0,000$  e  $P = 0,000$ , respectivamente). O crescimento entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi semelhante (Teste de *Dunn*,  $P = 1,000$ ). Diariamente avaliaram-se também as diferenças de crescimento entre as várias intensidades. Nos 18 dias existiram sempre diferenças estatisticamente significativas entre as intensidades de 4 e 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e entre 4 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ). Entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  existiram diferenças estatisticamente significativas em 14 dos 18 dias de exposição (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 12B).

#### 4.1.3. Parâmetros das curvas de crescimento

As taxas de crescimento de ambas as espécies foram menores nas culturas expostas à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e maiores nas culturas expostas à intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  como apresentado na Tabela 8. Consequentemente o tempo de duplicação foi maior nas culturas com menores taxas de crescimento, ou seja, nas culturas expostas à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e menor nas culturas expostas à intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A maior taxa de crescimento/menor tempo de duplicação aconteceu na cultura de *M. aeruginosa* exposta a 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As diferenças entre as taxas de crescimento/tempo de duplicação das culturas expostas a 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e das culturas expostas a 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram mais acentuadas em *M. aeruginosa* do que em *P. agardhii* (Tabela 8).

**Tabela 8** – Taxa de crescimento e tempo de duplicação das culturas de *M. aeruginosa* e *P. agardhii* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Espécie	Intensidade de luz ( $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ )	Tempo de duplicação (dia)
<i>M. aeruginosa</i>	4	0,067	10,345
	20	0,107	6,478
	30	0,116	5,975
<i>P. agardhii</i>	4	0,064	10,830
	20	0,086	8,060
	30	0,094	7,374

#### **4.2. Evolução temporal da concentração celular e produção de microcistina**

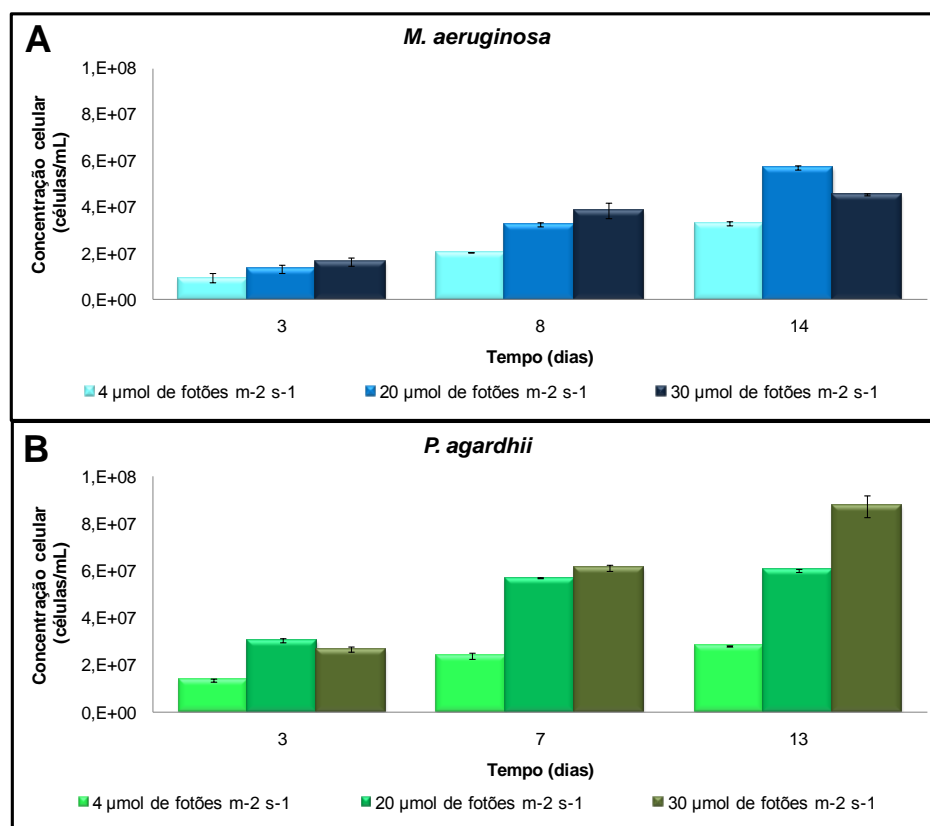
Tal como seria de esperar, verificou-se um aumento da concentração celular ao longo do tempo de exposição em todas as intensidades de luz e em ambas as espécies, tendo-se atingido as concentrações máximas no 13<sup>o</sup> dia/14<sup>o</sup> dia de exposição (fase estacionária) (Figura 13). A concentração celular das culturas expostas à intensidade de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  permaneceu relativamente baixa, comparativamente às outras duas intensidades.

##### ***M. aeruginosa***

A cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentou as maiores concentrações celulares na duas primeiras fases do crescimento (terceiro e oitavo dia de exposição), enquanto que a cultura exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  exibiu a maior concentração celular na fase estacionária (14<sup>o</sup> dia de exposição) (Figura 13A).

##### ***P. agardhii***

A cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade 20  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentou a maior concentração celular na fase de adaptação (terceiro dia de exposição). Já nas duas últimas fases do crescimento (sétimo e 13<sup>o</sup> dia de exposição) foi a cultura exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  que exibiu as maiores concentrações celulares (Figura 13B).



**Figura 13** – Concentração celular média nas várias fases de crescimento das culturas: A) *M. aeruginosa*. B) *P. agardhii*. As concentrações celulares apresentadas resultam da média de duas contagens. As barras de erro representam o desvio padrão.

A correspondência entre a concentração celular e a concentração de microcistina absoluta produzida (quantificada pelo método de ELISA) não foi evidente na maioria das condições testadas (Figura 14).

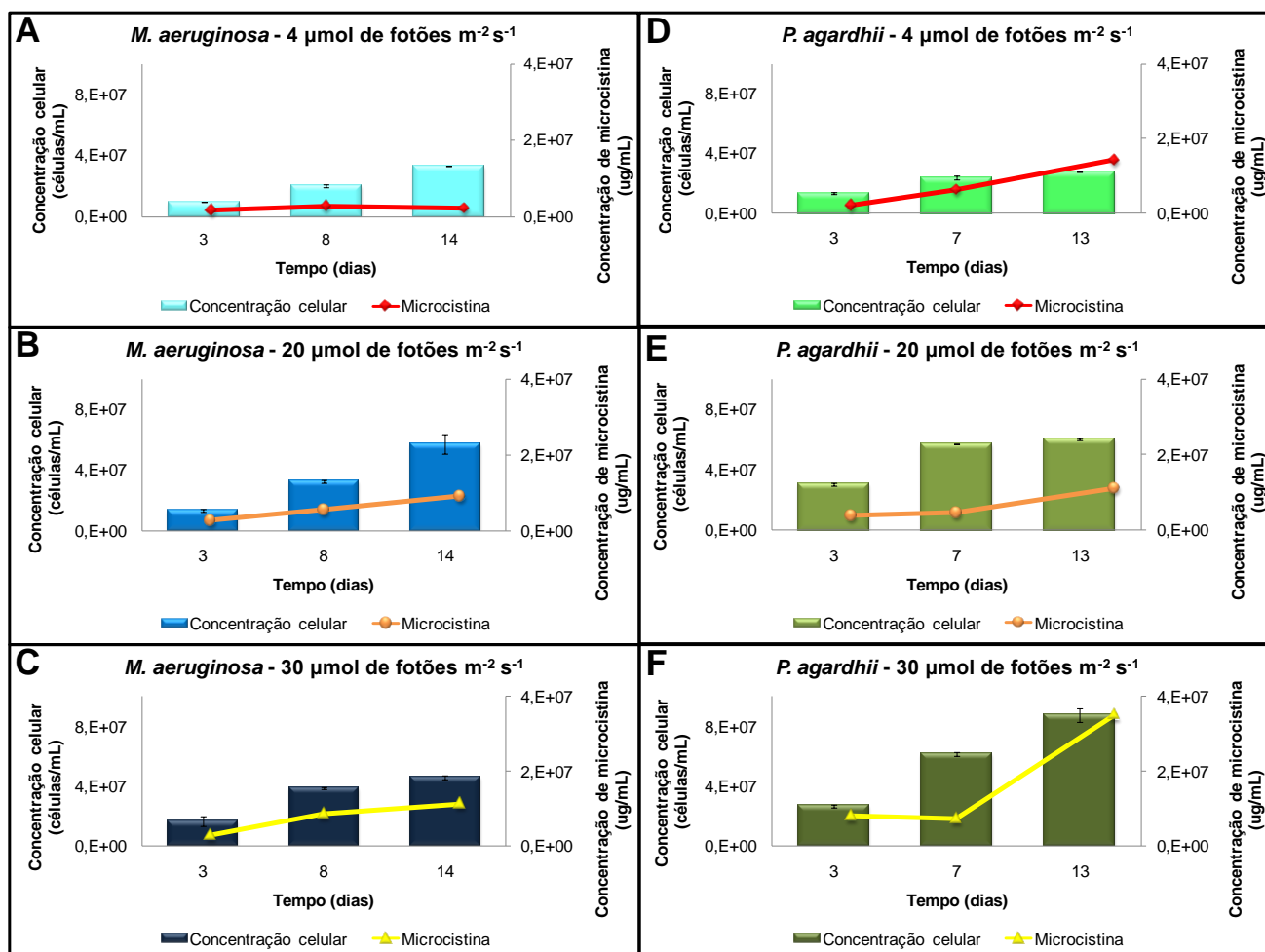
### ***M. aeruginosa***

Em *M. aeruginosa*, a cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sofreu um aumento do número de células ao longo do tempo, embora os níveis de toxina se tenham mantido inalterados (Figura 14A). Nas culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o aumento do número de células correspondeu a um reduzido aumento da quantidade de toxina produzida, atingindo-se as maiores concentrações de microcistina absoluta no 14º dia de exposição, correspondente à fase estacionária (Figuras 14B e 14C).

### ***P. agardhii***

Em *P. agardhii*, essa equivalência foi clara na cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a única em que um aumento do número de células correspondeu a um aumento da quantidade de microcistina produzida (Figura 14D). Nas culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apesar do

grande aumento da concentração celular ao longo do crescimento, a quantidade de toxina produzida entre o terceiro e sétimo dia permaneceu constante, tendo aumentado apenas entre o sétimo e 13º dia de exposição (Figuras 14E e 14F). Também nesta espécie as maiores concentrações de microcistina absoluta aconteceram na fase estacionária.



**Figura 14** – Relação entre a concentração celular/ concentração de microcistina absoluta produzida nas culturas: A) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de  $4 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . B) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de  $20 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . C) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de  $30 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . D) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de  $4 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . E) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de  $20 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . F) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de  $30 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As barras de erro representam o desvio padrão.

Definida a concentração celular das culturas e a concentração de microcistina absoluta, determinou-se então a concentração de toxina por célula, tendo-se denotado algumas diferenças entre as duas espécies de cianobactérias (Figura 15).

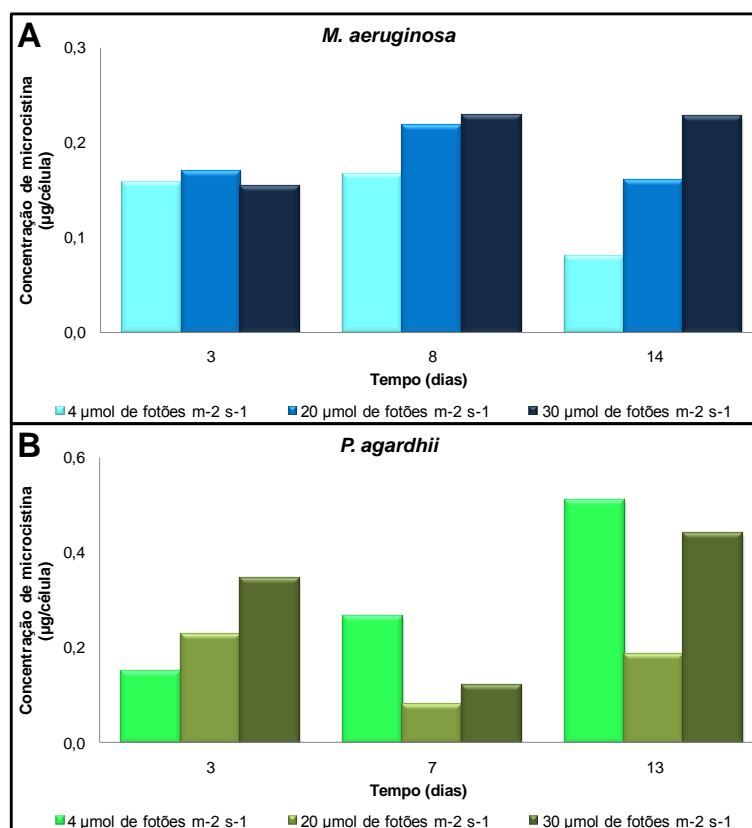


Figura 15 – Concentração de microcistina por célula nas culturas: A) *M. aeruginosa*. B) *P. agardhii*.

### *M. aeruginosa*

Nas três culturas de *M. aeruginosa* a concentração de toxina por célula foi próxima, principalmente no terceiro e oitavo dia de exposição (fase de adaptação e fase exponencial de crescimento) (Figura 15A). Já no 14<sup>o</sup> dia (fase estacionária) verificaram-se diferenças mais expressivas. A concentração de microcistina por célula na cultura exposta a 4 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> aumentou entre o terceiro e oitavo dia, e diminuiu consideravelmente entre este último e o 14<sup>o</sup> dia. Na cultura exposta a 20 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a concentração de microcistina primeiro aumentou entre o terceiro e o oitavo dia, e posteriormente diminuiu entre este e o 14<sup>o</sup> dia. Na cultura exposta a 30 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a concentração de toxina aumentou entre o terceiro e oitavo dia, e depois manteve-se aproximadamente constante no resto do crescimento. Foi também esta a intensidade que se registaram os valores máximos de toxina nas duas últimas fases do crescimento (oitavo e 14<sup>o</sup> dia).

### *P. agardhii*

As culturas de *P. agardhii* manifestaram um comportamento diferente, entre as várias intensidades de luz a que estiveram expostas (Figura 15B). A concentração de microcistina por célula na cultura exposta a 4 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> aumentou ao longo do tempo, tendo sido sempre a que apresentou valores superiores no sétimo e



13<sup>o</sup> dia de exposição (fase exponencial de crescimento e fase estacionária). Nas culturas expostas a 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a concentração de toxina diminuiu no sétimo dia (fase exponencial de crescimento), mas voltou a aumentar no 14<sup>o</sup> dia (fase estacionária).

#### 4.3. Avaliação dos parâmetros das reacções de RT-qPCR

Analisada cada reacção de RT-qPCR referente à optimização dos *primers* do gene alvo *mcyA* e dos genes de referência *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1* percebeu-se que em todas as reacções o coeficiente de determinação na regressão linear ( $R^2$ ) foi superior a 0,95 e o valor de eficiência esteve entre 0,82-1,14 (Tabela 9).

Concluiu-se também pelo estudo da curva de *melting* que todos os pares de *primers* produziram um único pico, sendo assim específicos para os fragmentos pretendidos.

**Tabela 9** – Parâmetros da reacção de RT-qPCR do gene alvo *mcyA* e dos genes de referência *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1*.

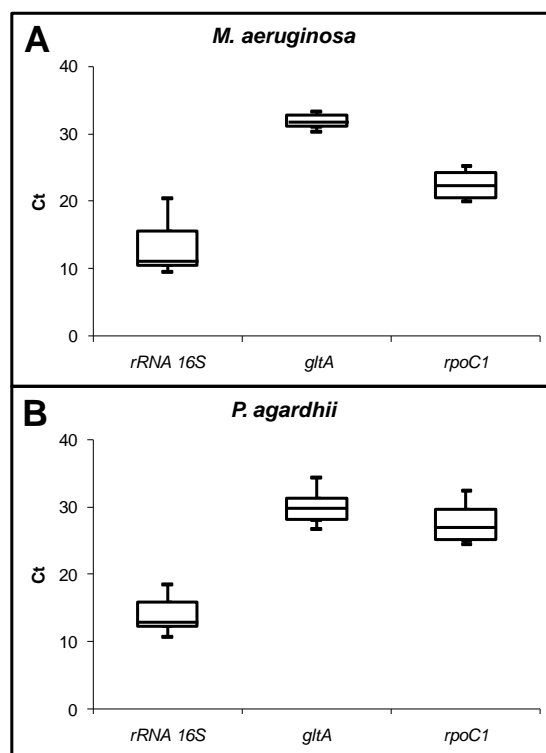
Gene	Organismo	Eficiência da reacção	Declive	Ordenada na origem	$R^2$
<i>mcyA</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,99	-3,337	42,907	0,984
	<i>Planktothrix agardhii</i>	1,14	-3,019	41,851	0,993
<i>rRNA 16S</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1,00	-3,324	36,824	0,991
	<i>Planktothrix agardhii</i>	0,82	-3,860	39,647	0,992
<i>gltA</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,86	-3,705	44,800	0,995
	<i>Planktothrix agardhii</i>	0,95	-3,441	43,460	0,994
<i>rpoC1</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,97	-3,396	39,303	0,994
	<i>Planktothrix agardhii</i>	0,82	-3,846	45,798	0,993

#### 4.4. Avaliação da estabilidade dos genes de referência

Para relacionar os níveis de expressão de cada gene de referência, compararam-se os valores de Ct obtidos nas várias reacções de RT-qPCR (Figura 16). O gene *rRNA 16S* teve o menor Ct médio (13,1 em *M. aeruginosa* e 13,7 em *P. agardhii*), o que corresponde ao mais alto nível de expressão, enquanto o gene *gltA* mostrou ter os níveis mais baixos de expressão, uma vez que apresentou o maior valor de Ct médio (31,8 em *M. aeruginosa* e 29,8 em *P. agardhii*). O nível de expressão do gene *rpoC1*

apresentou um valor intermédio, com um Ct médio de 22,6 em *M. aeruginosa* e 27,6 em *P. agardhii*.

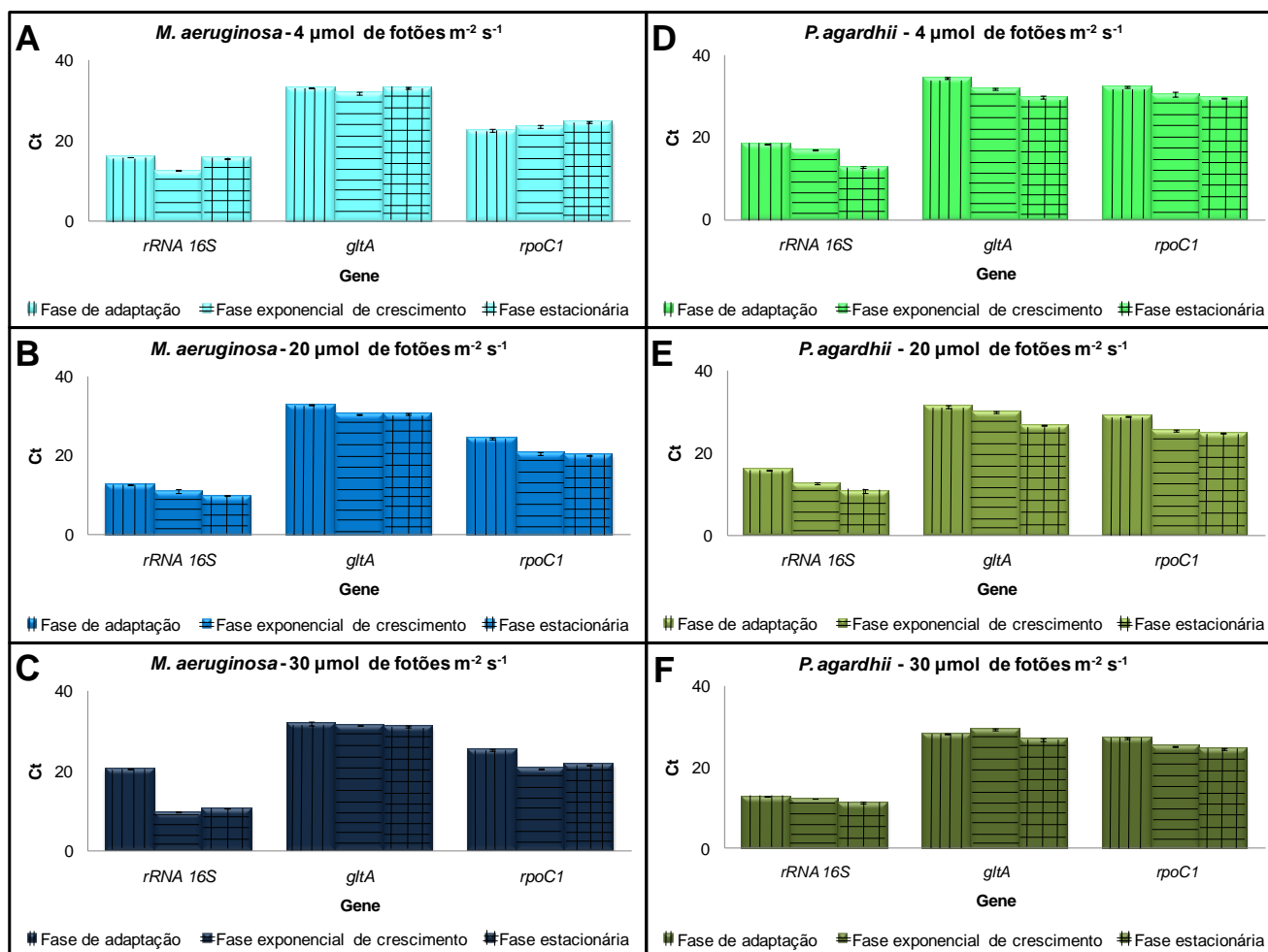
O nível de expressão do gene alvo *mcyA* (Ct médio de 22,9 em *M. aeruginosa* e 23,9 em *P. agardhii*) foi mais próximo do nível dos genes de referência *gltA* e *rpoC1* do que do nível do gene *rRNA 16S*.



**Figura 16** – Valores de Ct obtidos para os genes de referência *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1* nas espécies: A) *M. aeruginosa*. B) *P. agardhii*. A distribuição dos níveis de expressão dos genes de referência é mostrada pela mediana (linha preta), quartil inferior e superior (caixa) e pela gama de valores (bigodes) (n = 9).

### ***M. aeruginosa***

A estabilidade dos genes de referência em cada espécie e em cada intensidade de luz foi avaliada (Figura 17). Em *M. aeruginosa* percebeu-se que indiscutivelmente o gene de referência *rRNA 16S* foi o menos estável, uma vez que a sua expressão variou entre as várias intensidades de luz e entre as várias fases do crescimento (Figuras 17A, 17B e 17C). A expressão do gene *gltA* manteve-se praticamente inalterada entre as várias intensidades de luz e entre as várias fases do crescimento. Já a expressão do gene *rpoC1* variou ligeiramente entre as várias fases do crescimento, mas manteve-se semelhante entre as diferentes intensidades de luz.



**Figura 17** – Valores de Ct médios nas várias fases do crescimento (fase de adaptação, fase exponencial de crescimento e fase estacionária) dos genes de referência *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1* das reacções de RT-qPCR: A) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . B) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . C) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . D) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . E) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . F) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As barras de erro representam o desvio padrão.

### *P. agardhii*

Ao contrário de *M. aeruginosa*, em *P. agardhii* a expressão do gene *rRNA 16S* foi bastante semelhante entre as diferentes intensidades de luz, tendo variado ligeiramente apenas entre as várias fases do crescimento (Figuras 17D, 17E e 17F), ainda assim, essa estabilidade foi maior na cultura exposta a 30  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A expressão do gene *gltA* foi semelhante entre as várias intensidades de luz, alterando-se ligeiramente entre as várias fases do crescimento. A expressão do gene *rpoC1* variou moderadamente entre as diferentes intensidades de luz e as diferentes fases do crescimento.

Para confirmar e complementar os resultados representados na Figura 17 utilizaram-se três algoritmos matemáticos, *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*, para avaliar a estabilidade de expressão de cada gene de referência.

As informações obtidas com os algoritmos *geNorm* e *NormFinder* confirmaram que o gene de referência com a expressão menos estável em *M. aeruginosa* foi o *rRNA 16S* e em *P. agardhii* o *rpoC1*, ao apresentarem o maior coeficiente de estabilidade (Tabela 10). Já o melhor gene de referência para *M. aeruginosa* foi o *rpoC1*, e para *P. agardhii* o *rRNA 16S*, ambos manifestaram o menor coeficiente de estabilidade (sombreados a cinzento na Tabela 10).

**Tabela 10** – Coeficientes de estabilidade dos genes de referência *rRNA 16S*, *gltA* e *rpoC1*, resultantes da aplicação dos algoritmos *geNorm* e *NormFinder*.

Gene de referência	Coeficiente de estabilidade (M)			
	<i>M. aeruginosa</i>		<i>P. agardhii</i>	
	<i>geNorm</i>	<i>NormFinder</i>	<i>geNorm</i>	<i>NormFinder</i>
<i>16S rRNA</i>	2,703	1,774	0,922	0,222
<i>gltA</i>	2,225	1,211	1,010	0,494
<i>rpoC1</i>	1,829	0,468	1,150	0,701

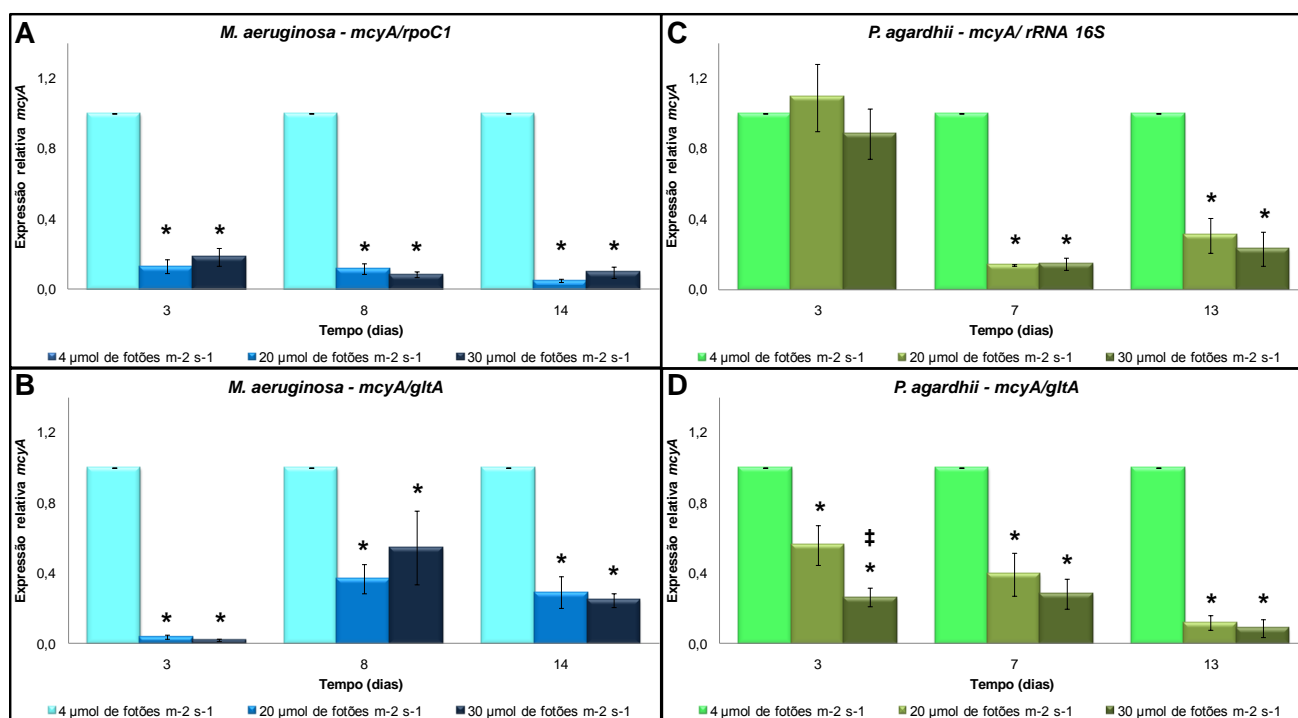
Também segundo o algoritmo *BestKeeper*, o gene *rRNA 16S* foi o menos estável em *M. aeruginosa* (Desvio padrão = 2,80; Coeficiente de variação = 21,29) e o *rpoC1* o menos estável em *P. agardhii* (Desvio padrão = 2,47; Coeficiente de variação = 8,96). Porém, ao contrário dos dois algoritmos anteriores, em que o melhor gene de referência divergiu entre as duas espécies, neste caso o gene *gltA* foi considerado o mais estável quer em *M. aeruginosa* (Desvio padrão = 0,89; Coeficiente de variação = 2,8) quer em *P. agardhii* (Desvio padrão = 1,87; Coeficiente de variação = 6,28). Aplicando-se a correlação de *Pearson* do referido software aos possíveis pares de genes de referência, verificou-se que o melhor par a utilizar na normalização em *M. aeruginosa* seria *gltA* e *rpoC1* (Coeficiente de correlação = 0,810) e em *P. agardhii* seria *rRNA 16S* e *gltA* (Coeficiente de correlação = 0,946).

Em suma, dos três genes de referência estudados, em *M. aeruginosa* o melhor foi o *rpoC1* (indicado por dois dos três algoritmos aplicados - *geNorm* e *NormFinder*), mas também o *gltA* (seleccionado por um dos três algoritmos - *BestKeeper*). Em *P. agardhii* o melhor gene de referência foi o *rRNA 16S* (determinado por dois dos três algoritmos aplicados - *geNorm* e *NormFinder*), assim como o *gltA* (apurado por um dos três algoritmos - *BestKeeper*).

## 4.5. Expressão relativa do gene alvo *mcyA*

### 4.5.1. Avaliação da expressão do gene *mcyA* em cada fase do crescimento

Para avaliar a expressão do gene *mcyA*, em cada fase do crescimento fixou-se como condição controlo o nível de expressão na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e utilizaram-se como genes de referência para a normalização o *rpoC1* e *gltA* para *M. aeruginosa* e o *rRNA 16S* e *gltA* em *P. agardhii* (Figura 18).



**Figura 18** – Expressão relativa média do gene *mcyA* em cada fase do crescimento, usando como condição controlo o nível de expressão na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Expressão = 1). A) Expressão nas culturas de *M. aeruginosa* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *rpoC1*. B) Expressão nas culturas de *M. aeruginosa* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *gltA*. C) Expressão nas culturas de *P. agardhii* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *rRNA 16S*. D) Expressão nas culturas de *P. agardhii* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *gltA*. O \* denota as diferenças estatisticamente significativas (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) na expressão de *mcyA* relativamente à condição controlo. O ‡ assinala as diferenças estatisticamente significativas (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) na expressão de *mcyA* relativamente à intensidade de 20  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados da expressão relativa do gene *mcyA* obtidos quer pela normalização com o gene de referência *rpoC1* (Figura 18A), quer pela normalização com o gene *gltA* (Figura 18B) foram equiparáveis em *M. aeruginosa*, tal como sucedeu

com os genes de referência *rRNA 16S* (Figura 18C) e *gltA* (Figura 18D) em *P. agardhii*.

#### ***M. aeruginosa***

Em *M. aeruginosa*, os níveis de expressão de *mcyA* nas intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram sempre inferiores aos níveis da intensidade controle de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para além disso, nas três fases estudadas existiram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão de *mcyA* na intensidade controle e os níveis de expressão nas intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão de *mcyA* foi sempre muito semelhante, não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas.

#### ***P. agardhii***

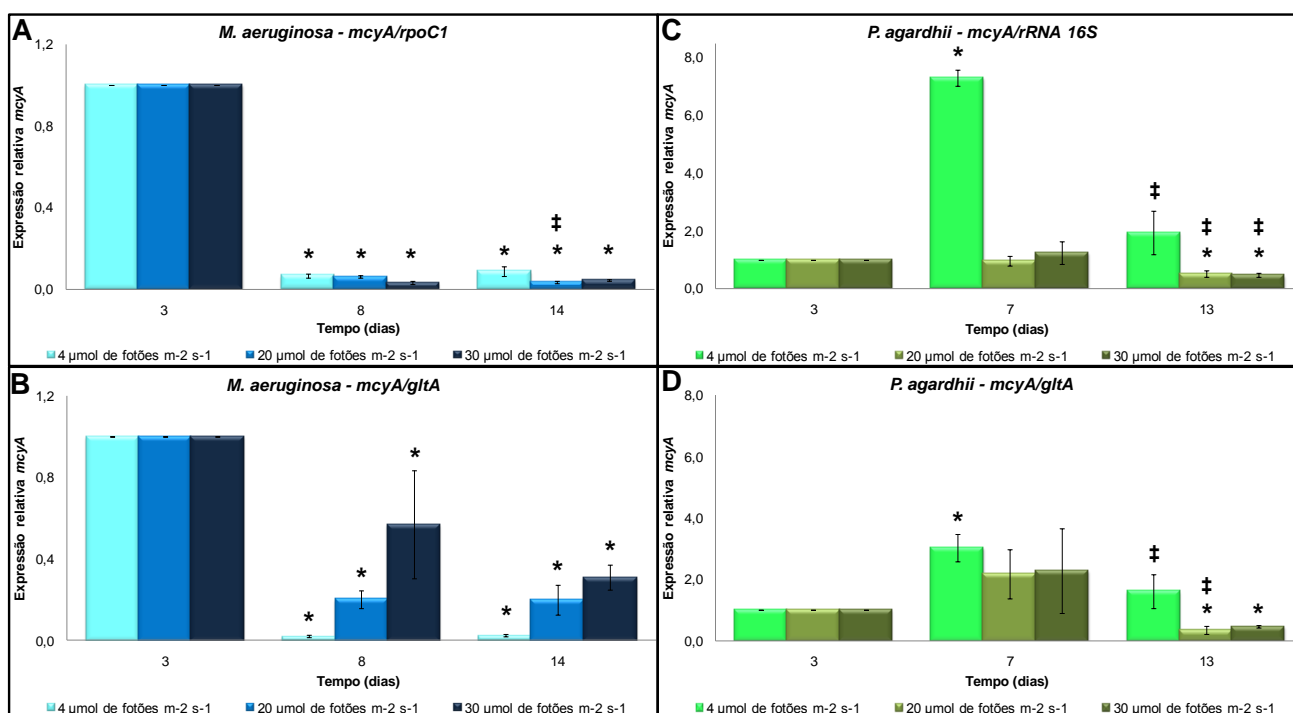
Relativamente a *P. agardhii*, na fase de adaptação (terceiro dia) as alterações observadas na expressão de *mcyA* entre as diferentes intensidades de luz dependeram do gene de referência utilizado na normalização. Tendo em consideração o gene de referência *rRNA 16S*, não ocorreram diferenças significativas na expressão de *mcyA* entre as várias intensidades de luz. Por outro lado, tendo em conta o gene *gltA* como referência, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na expressão entre as três intensidades de luz. Na fase exponencial de crescimento e fase estacionária (sétimo e 13º dia respectivamente) existiram diferenças estatisticamente significativas entre a intensidade controle de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Mas entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão foi bastante idêntica. Nas duas últimas fases do crescimento a maior expressão de *mcyA* ocorreu na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### **4.5.2. Avaliação da expressão do gene *mcyA* ao longo do tempo de exposição**

Para se analisar a evolução ao longo do tempo da expressão do gene *mcyA*, estabeleceu-se como condição controle os níveis de expressão no terceiro dia de exposição (fase de adaptação), e utilizaram-se na mesma os genes *rpoC1* e *gltA* para *M. aeruginosa* e o *rRNA 16S* e *gltA* em *P. agardhii* como referências para a normalização (Figura 19).

Também para esta avaliação, os resultados da variação da expressão relativa do gene *mcyA* foram idênticos quer tenham sido normalizados com o gene de referência *rpoC1* (Figura 19A), quer com o gene *gltA* (Figura 19B) em *M. aeruginosa*.

O mesmo aconteceu usando o gene de referência *rRNA 16S* (Figura 19C) e *gltA* em *P. agardhii* (Figura 19D).



**Figura 20** – Evolução da expressão relativa média do gene *mcyA* ao longo do tempo, tendo como condição controlo os níveis de expressão no terceiro dia de exposição (Expressão = 1). A) Expressão nas culturas de *M. aeruginosa* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *rpoC1*. B) Expressão nas culturas de *M. aeruginosa* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *gltA*. C) Expressão as culturas de *P. agardhii* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *rRNA 16S*. D) Expressão as culturas de *P. agardhii* expostas às intensidades de luz de 4, 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando como gene de referência – *gltA*. O \* denota as diferenças estatisticamente significativas (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) na expressão de *mcyA* relativamente à condição controlo. O ‡ assinala as diferenças estatisticamente significativas (Teste *t-Student*,  $P \leq 0,05$ ) na expressão de *mcyA* relativamente ao sétimo/oitavo dia de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão.

### *M. aeruginosa*

Nas culturas de *M. aeruginosa*, a evolução da expressão do gene *mcyA* ao longo do tempo teve o mesmo comportamento nas três intensidades de luz (Figuras 19A e 19B). Em todas as intensidades de luz observou-se uma diminuição (estatisticamente significativa) nos níveis de expressão de *mcyA* do terceiro para o oitavo dia e do terceiro para o 14<sup>o</sup> dia. Já entre o oitavo e o 14<sup>o</sup> dia observou-se uma manutenção dos níveis de transcrição a 4 e a 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Na cultura exposta a 20  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  os níveis de expressão de *mcyA* foram sempre

diminuindo ao longo do crescimento, tendo estas diferenças sido estatisticamente significativas.

#### ***P. agardhii***

Ao contrário do constatado anteriormente em *M. aeruginosa*, em *P. agardhii* a evolução da expressão do gene *mcyA* ao longo do tempo não teve o mesmo comportamento entre as três intensidades de luz. Na cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão do gene *mcyA* aumentou significativamente de forma acentuada entre o terceiro e o sétimo dia, tendo diminuído de forma significativa entre o sétimo e 13º dia. Nas culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verificou-se uma semelhança nos níveis de expressão de *mcyA* entre o terceiro e o sétimo dia. Entre este último e o 13º dia existiu uma diminuição, estatisticamente significativa em ambas as intensidades. A expressão do gene *mcyA* na intensidade de luz de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi máxima no sétimo dia, correspondente à fase exponencial de crescimento, e nas intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão também foi ligeiramente maior nessa mesma fase.

#### 4.5.3. Avaliação da correspondência entre a expressão do gene *mcyA* e a concentração de microcistina por célula

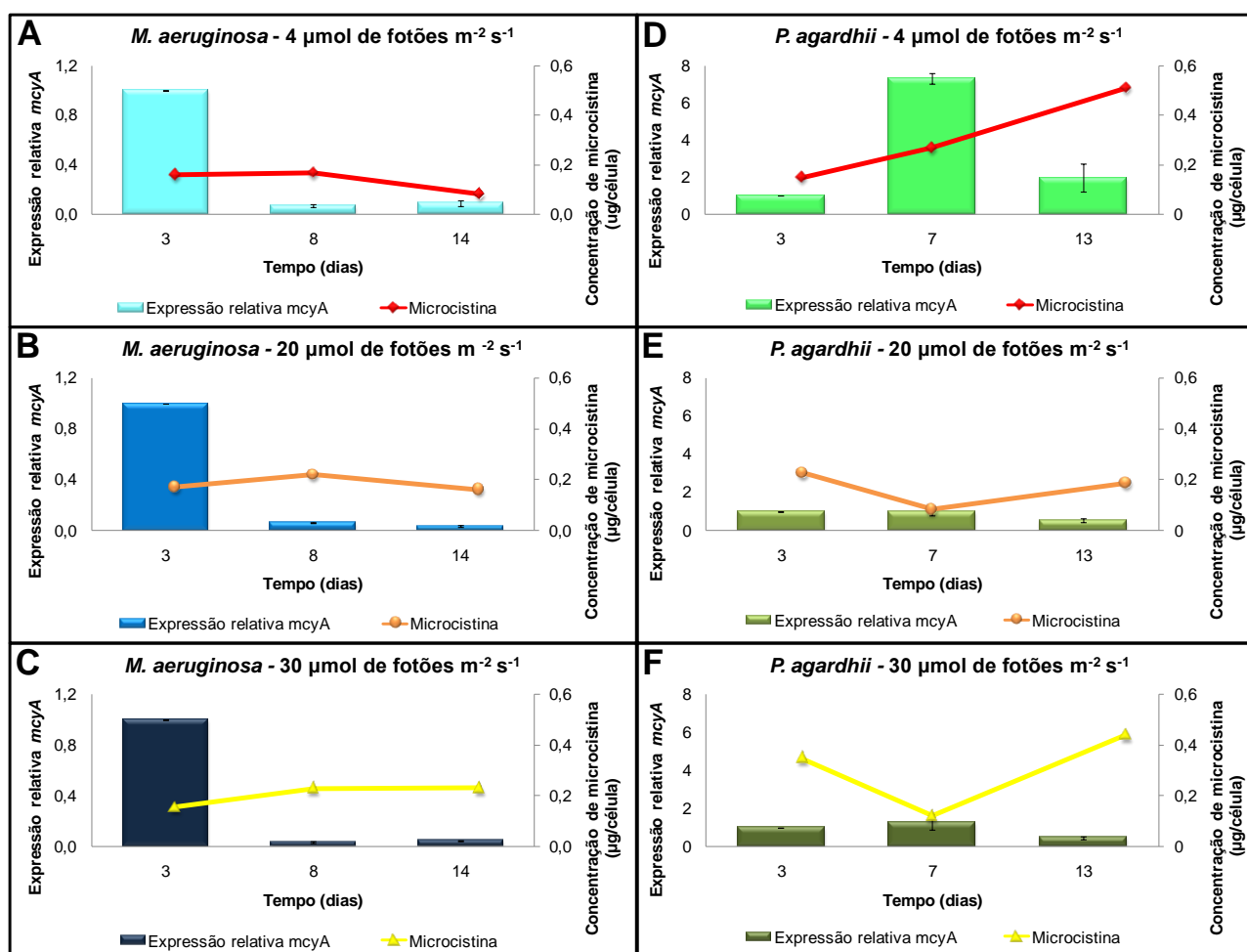
Estabelecido o nível de expressão do gene *mcyA* ao longo do tempo e a quantidade de microcistina por célula, procurou-se averiguar a possível relação entre a expressão do gene *mcyA* e a concentração de microcistina por célula. Para isso, procedeu-se à comparação dos resultados obtidos na expressão, normalizada com os melhores genes de referência (*rpoC1* para *M. aeruginosa* e *rRNA 16S* para *P. agardhii*) com a concentração de microcistina por célula (Figura 20).

#### ***M. aeruginosa***

Em *M. aeruginosa* não se verificou, em nenhuma intensidade de luz, ligação entre expressão de *mcyA* e a concentração de microcistina produzida por célula. Na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ocorreu uma acentuada diminuição da expressão de *mcyA* do terceiro para o oitavo dia, e uma manutenção entre este e o 14º dia. Já a concentração de microcistina por célula, foi constante entre terceiro e oitavo dia, mas não entre o oitavo e o 14º dia (Figura 20A). Na cultura exposta a 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  existiu uma diminuição da expressão de *mcyA* ao longo do tempo, contudo a concentração de microcistina por célula aumentou entre o terceiro e oitavo dia, e diminuiu entre este último e 14º dia (Figura 20B). A 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  observou-se primeiro uma diminuição da expressão e posteriormente uma manutenção desta entre o oitavo e o 14º dia. Apesar disso, a concentração de toxina



por célula aumentou entre o terceiro e o oitavo dia, mantendo-se depois constante até ao 14<sup>o</sup> dia (Figura 20C).



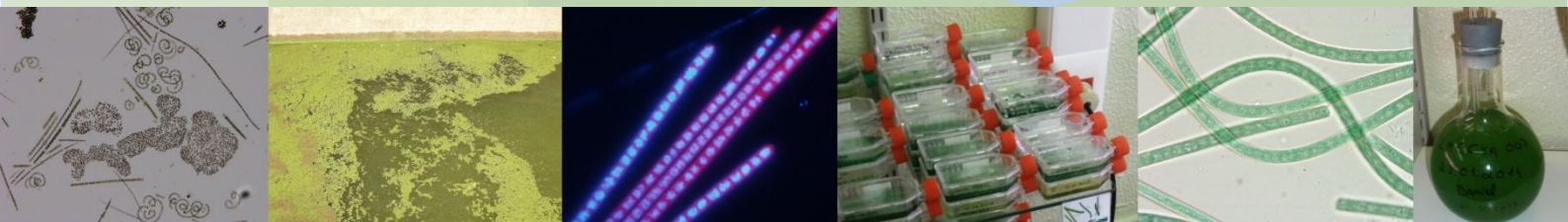
**Figura 20** – Evolução temporal da expressão relativa média do gene *mcyA* (normalizada com o gene de referência *rpoC1* para *M. aeruginosa* e com o gene *rRNA 16S* para *P. agardhii*) e da concentração de microcistina por célula: A) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . B) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . C) Cultura de *M. aeruginosa* exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . D) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . E) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . F) Cultura de *P. agardhii* exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As barras de erro representam o desvio padrão.

### *P. agardhii*

Em *P. agardhii*, também não foi possível estabelecer uma correspondência entre expressão de *mcyA* e a concentração de microcistina por célula. Na intensidade de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o aumento da expressão de *mcyA* entre o terceiro e sétimo dia correspondeu a um aumento da quantidade de toxina por célula. Contudo entre o sétimo e o 13<sup>o</sup> dia apesar da marcada diminuição da expressão, houve um aumento

da concentração de toxina por célula (Figura 20D). Nas culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  existiu uma manutenção da expressão de *mcyA* entre o terceiro e o sétimo dia, e uma posterior diminuição na fase final. Já a concentração de toxina por célula primeiro diminuiu entre as duas primeiras fases, tendo aumentado entre o sétimo e o 13<sup>o</sup> dia (Figuras 20E e 20F). Apesar da não correspondência entre os níveis de expressão e a concentração de toxina por célula ao longo do tempo, importa realçar que os maiores níveis de transcrição de *mcyA* e a maior quantidade de microcistina por célula observados no sétimo e 13<sup>o</sup> dia aconteceram a 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

# 5. Discussão



### **5.1. Avaliação das condições experimentais testadas**

Numa primeira abordagem, utilizou-se o método de microplaca de 96 poços para avaliar o crescimento das cianobactérias ao longo do tempo. Cada microplaca foi inoculada com um isolado e exposta durante nove dias a diferentes intensidades de luz: 15, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Diariamente mediu-se o crescimento das culturas nos poços, e de três em três dias retiraram-se amostras para extracção de *RNA*. Desta metodologia resultaram vários problemas, designadamente a evaporação acentuada do meio, dificuldade de homogeneização e reduzida quantidade de cultura para efectuar a extracção de *RNA*, e também dois outros parâmetros que se pretendiam determinar: a contagem celular e quantificação das microcistinas. Assim, preferiu-se ao fim de vários ensaios abandonar este método e desenvolver um mais completo e que permitisse ultrapassar os entraves anteriormente referidos. A nova metodologia adoptada e descrita nas páginas 18 e 19 deste trabalho, utilizando frascos de cultura de 80  $\text{cm}^2$ , proporcionou diversas vantagens, nomeadamente uma área de exposição maior das culturas, uma boa homogeneização das mesmas, facilitada pelo fluxo de ar contínuo (permitindo medições de densidade óptica com erros menores), um volume de cultura suficiente para as várias operações e, por fim, uma reduzida evaporação (11-14%) que não influenciou significativamente os resultados. Para além das alterações do desenho experimental, repensaram-se também as intensidades de luz a que os frascos estariam expostos, tendo-se optado por 4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A escolha de 4 em vez de 15  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  deveu-se ao facto desta ser a intensidade de luz a que as culturas estão habitualmente expostas na câmara de manutenção, crescendo saudavelmente. Já a escolha das intensidades de luz mais altas de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  teve em consideração duas principais razões. A primeira, que as intensidades estudadas fossem o mais próximas possível das intensidades de luz a que estas cianobactérias estão expostas no meio ambiente. Por exemplo uma intensidade de luz de 40  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pode ser encontrada a cerca de um metro de profundidade em águas com *blooms*, quando a intensidade medida na superfície é de 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Kaebernick *et al.*, 2000). Por outro lado, avaliando os dados descritos na bibliografia verificou-se que o estudo de Utkilen & Gjølme (1992), usando *M. aeruginosa*, refere que a taxa de produção de microcistina aumentava até à intensidade de luz de 40  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e diminuía em intensidades mais altas. Já Hesse & Kohl (2001) perceberam que o ponto de saturação de luz para as culturas formadoras de colónias nesta espécie seria de 80  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e para as culturas não formadoras seria de 50  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Acima deste ponto de

saturação pode ocorrer fotoinibição, ou seja, a redução da capacidade fotossintética, como resultado da exposição a intensidades de luz superiores às necessárias para saturar o processo de fotossíntese (Walsh *et al.*, 1997). Relativamente a estudos de expressão génica, recentemente El Semary (2010) percebeu que os níveis expressão de um outro gene também pertencente ao *cluster mcy* (*mcyB*) foram máximos na fase estacionária em intensidades de luz baixas/médias (2,8 e 14  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Em *P. agardhii*, Sivonen (1990) apurou que a maior concentração de microcistinas acontecia em intensidades de luz baixas, designadamente em 12 e 24  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para além disso, sabe-se ainda as cianobactérias pertencentes a este género preferem baixas intensidades de luz para crescer (Sivonen & Jones, 1999). Tendo em conta estes dados, optou-se por utilizar duas intensidades de luz intermédias (20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), nem muito altas nem muito baixas para ambos, que permitissem averiguar o efeito da intensidade de luz nas duas espécies.

## **5.2. Efeito da intensidade de luz no crescimento**

Ao longo do ensaio de exposição, as culturas de *M. aeruginosa* e de *P. agardhii* variaram o seu aspecto. Nos primeiros dias de exposição apresentaram uma tonalidade esverdeada e eram pouco densas, enquanto na fase final as culturas de *M. aeruginosa*, nas intensidades de luz de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  exibiram um certo grau de "palidez" e as de *P. agardhii* uma cor amarelada/acastanhada em condições semelhantes. O aspecto final resultou, possivelmente, da exposição prolongada às intensidades de luz mais altas, que conseqüentemente induziram danos às células e causaram diminuição da clorofila. Ao diminuir a quantidade de clorofila perdeu-se a característica cor verde das culturas saudáveis (Sivonen, 1990). De certa forma, estes resultados estão de acordo com o que se verificou na curva de crescimento na intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em *M. aeruginosa*. Inicialmente, a intensidade de luz mais alta estimulou o crescimento da cultura, mas a exposição prolongada levou a que fase exponencial de crescimento fosse menor, atingindo mais rapidamente a fase estacionária e de morte celular do que nas outras intensidades de luz. Em *P. agardhii* não foram claras as fases estacionária e de morte celular nas curvas de crescimento, embora facilmente se tenha notado morte celular nas observações microscópicas e até no próprio aspecto macroscópico da cultura na fase final do ensaio. Apesar disso, o valor da densidade óptica medido continuou a aumentar ao longo dos últimos dias, não como resultado de crescimento mas devido ao aumento da absorção por compostos resultantes da lise celular.

Para além das diferenças no aspecto das culturas, verificaram-se também diferenças, estatisticamente validadas, entre as três curvas de crescimento em cada espécie, sobretudo entre a curva de crescimento das culturas expostas a 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as culturas expostas a 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os resultados indicaram assim uma relação entre o aumento da taxa de crescimento e o aumento da intensidade de luz, nas duas espécies testadas. A associação entre o crescimento e a intensidade de luz em *M. aeruginosa*, já tinha sido identificada em estudos anteriores. Utkilen & Gjølme (1992) referiram primeiramente que a luz foi factor limitante do crescimento até à intensidade de 75  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na estirpe *M. aeruginosa* CYA 228/1, propagada em cultura contínua. Mais tarde, Kaebernick *et al.* (2000) verificaram que as diferentes intensidades de luz estudadas (16, 31 e 68  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) tiveram efeito sobre o crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7806, embora as diferenças entre as intensidades mais baixas não tenham sido óbvias. Hesse *et al.* (2001) estudando a mesma estirpe, indicaram que o factor intensidade de luz influenciou o crescimento até ao ponto de saturação de luz de 32  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , onde a taxa de crescimento foi máxima. Wiedner *et al.* (2003) relataram um efeito da intensidade da luz sobre a taxa de crescimento na mesma estirpe dos dois estudos anteriores, mas neste trabalho o efeito foi verificado até à intensidade PAR (radiação fotossinteticamente activa) de 80  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e não apenas até aos 32  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Contrariamente ao descrito para a estirpe *M. aeruginosa* PCC 7806, El Semary (2010) aplicando o coeficiente de *Pearson* às contagens celulares, verificou uma boa correlação entre o crescimento das cianobactérias e a temperatura, mas não entre o crescimento e a luz.

A pesquisa da influência da intensidade de luz no crescimento de *P. agardhii* tem sido reduzida ao longo dos anos, acabando por existir apenas dois estudos com resultados contraditórios. Sivonen (1990) não verificou efeito da intensidade de luz no crescimento da estirpe *P. agardhii* 97, uma vez que o crescimento nas quatro intensidades de luz estudadas (12, 24, 50 e 95  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi semelhante. Já na investigação de Tonk *et al.* (2005) o crescimento da estirpe *P. agardhii* 126/3 foi directamente influenciado pela intensidade de luz até, pelo menos, à intensidade de 60  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As intensidades superiores a 100  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inibiram o crescimento. A correlação encontrada no estudo aqui apresentado está de acordo com os resultados obtidos por Tonk *et al.* (2005).

Analisando detalhadamente as diferenças no crescimento entre as várias intensidades de luz em cada espécie, observou-se que a menor taxa de crescimento/maior tempo de duplicação aconteceu na cultura de *P. agardhii* na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a maior taxa de crescimento/menor tempo de

duplicação em *M. aeruginosa* na intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As diferenças nestes dois parâmetros do crescimento foram bastante mais acentuadas entre a cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Entre estas duas últimas intensidades verificou-se uma grande semelhança. As amplitudes das diferenças nas taxas de crescimento/tempo duplicação entre intensidades de luz foram maiores em *M. aeruginosa* do que em *P. agardhii*. Pode-se supor que este comportamento esteja relacionado com o facto de que a primeira espécie cresce melhor em intensidades de luz mais altas e da segunda preferir crescer em intensidades baixas, embora temporariamente se consiga adaptar bem às intensidades de luz mais altas, uma vez que no meio ambiente podem habitar os primeiros metros de lagos e lagoas, podendo ser temporariamente expostos a altas intensidades de luz (Oberhaus *et al.*, 2007; Sivonen & Jones, 1999).

### **5.3. Efeito da intensidade de luz na concentração celular e produção de microcistina**

As maiores concentrações celulares nas duas primeiras fases do crescimento em *M. aeruginosa* aconteceram na cultura exposta à intensidade de 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  enquanto que na última fase ocorreram na cultura exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já em *P. agardhii* as maiores concentrações celulares na fase de adaptação verificaram-se na cultura exposta à intensidade 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e nas duas últimas fases do crescimento na cultura exposta a 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em ambas as espécies, a maior concentração celular ocorreu nas culturas expostas às intensidades de luz mais elevadas. Esta observação pode ser atribuída ao facto das intensidades de luz mais altas estimularem mais a divisão celular, acabando por naturalmente afectar o ritmo de crescimento das culturas, como referiu Kaebernick *et al.* (2000).

Determinada a concentração celular das várias culturas ao longo do tempo, pretendeu-se entender de que forma o crescimento se poderia relacionar com a concentração de microcistina absoluta produzida em cada intensidade de luz. Em *M. aeruginosa* na cultura exposta a 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o aumento da concentração celular ao longo do tempo não se traduziu num aumento dos níveis absolutos de toxina, que se mantiveram constantes ao longo do tempo para esta intensidade de luz. Nas culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o aumento do número de células correspondeu a um reduzido aumento da

quantidade total de toxina. A ausência de conexão entre o crescimento celular e a quantidade absoluta de microcistina vem contrariar estudos já realizados. Segundo Orr & Jones (1998), em condições limitantes de azoto a produção de toxina dependeu da taxa de crescimento, pois verificaram que uma diminuição do crescimento correspondeu a uma diminuição da quantidade de microcistina. Em Song *et al.* (1998), a produção absoluta de toxina acompanhou o crescimento numa cultura de *Microcystis viridis*, mantida a 25°C e a 15  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Mais tarde, também Wiedner *et al.* (2003) descreveram que o conteúdo de microcistina estava relacionado com o crescimento em *M. aeruginosa* PCC 7806, sob condições de PAR limitado (intensidades de luz inferiores a 80  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mas não sob condições de PAR saturante.

No estudo aqui apresentado, foi possível relacionar claramente o crescimento e a concentração de microcistina absoluta em *P. agardhii* na cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Contudo, nas culturas expostas às intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , essa correspondência observou-se apenas entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária. A conexão entre o crescimento celular e a quantidade absoluta de microcistina nesta espécie nunca foi estudada nos trabalhos já realizados.

Avaliando os níveis da concentração de microcistina absoluta, verificou-se que se obtiveram no início da fase estacionária em ambas as espécies estudadas. Estes resultados são opostos ao constatado por Song *et al.* (1998) na cultura de *Microcystis viridis*, em que as maiores concentrações de microcistina foram obtidas no início e meio da fase exponencial de crescimento. Podemos supor que este facto se pode dever às diferenças na estirpe aqui testada e no meio de crescimento utilizado.

A maior concentração de microcistina na fase estacionária pode ser explicada por duas razões principais, por existir um maior número de células produtoras neste estágio do crescimento e/ou pelo facto das cianotoxinas serem metabolitos secundários, que em condições normais aumentarão apenas após o metabolismo primário da célula estar satisfeito, podendo assim despende energia para a síntese destes compostos (O'Neil *et al.*, 2012; Schatz *et al.* 2007).

As concentrações de microcistina por célula entre intensidades de luz e fases do crescimento diferiram entre as duas espécies. Em *M. aeruginosa*, a concentração de microcistina por célula nas três culturas expostas às diferentes intensidades foi semelhante, sobretudo nas duas primeiras fases do crescimento. Apenas na fase estacionária as concentrações de toxina diferiram consideravelmente. Ainda assim, a evolução temporal da concentração de toxina em cada cultura foi ligeiramente



diferente. Na cultura exposta à intensidade de  $4 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a concentração de microcistina por célula primeiro aumentou e depois diminuiu, tendo sido esta a intensidade a que se verificaram os menores níveis de toxina por célula em todo o crescimento. Na cultura exposta à intensidade de  $20 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tal como se verificou na intensidade de  $4 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a concentração de microcistina primeiro aumentou e posteriormente diminuiu na fase estacionária. Já a cultura exposta à intensidade de  $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a concentração de microcistina aumentou entre as duas primeiras fases do crescimento, tendo-se mantido semelhante na fase final do mesmo. Foi nesta intensidade de luz que ocorreu a maior produção de microcistina por célula quer na fase exponencial de crescimento, quer na fase estacionária.

Tendo em conta as diferenças verificadas entre as concentrações de microcistina por célula nas culturas expostas às diferentes intensidades de luz, ainda que em menor amplitude do que em *P. agardhii*, conclui-se que existiu também alguma influência das intensidades de luz testadas ( $4$ ,  $20$  e  $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sobre a produção de microcistina. A influência da luz sobre a produção de microcistina nesta espécie já tinha sido identificada em estudos anteriores. van der Westhuizen & Eloff (1985) relataram uma influência da intensidade de luz na toxicidade de *M. aeruginosa* UV-006, ainda que reduzida. Verificaram que a concentração de microcistina tendia a ser maior em intensidades de luz mais elevadas ( $145$  e  $205 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) comparativamente às intensidades mais baixas ( $21$ ,  $35$ ,  $51$  e  $86 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). As alterações relativamente pequenas na toxicidade, produzidas pelo aumento da intensidade de luz, foram explicadas pelas adaptações fisiológicas que o género *Microcystis* apresenta para este factor, nomeadamente o aumento dos vacúolos e alteração na composição dos pigmentos. Utkilen & Gjølme (1992) observaram que um aumento da intensidade de luz até aos  $40 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se traduziu num aumento da taxa de produção de microcistina na estirpe *M. aeruginosa* CYA 228/1. Mais tarde, Utkilen & Gjølme (1995) prosseguindo trabalhos na mesma estirpe, perceberam um efeito da intensidade da luz na absorção do ferro e, conseqüentemente, sob a produção de toxina. Propuseram que a microcistina se ligaria ao ferro e a outros catiões, como forma de mantê-los em baixas concentrações no meio intracelular. Assim, diminuindo a intensidade de luz, diminuía igualmente a absorção de ferro e conseqüentemente a quantidade de microcistina produzida (que seria apenas necessária para manter baixos os níveis dos catiões). Também Song *et al.* (1998) identificaram um efeito da intensidade da luz sob a produção de microcistinas em *M. viridis*. A produção de microcistina-RR a  $15^\circ\text{C}$  foi maior numa cultura mantida a  $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  comparativamente a outras

mantidas a 15, 60 e 100  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já a 25°C a maior produção ocorreu numa cultura exposta a 15  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Adicionalmente, Wiedner *et al.* (2003) observaram que as intensidades de luz abaixo da intensidade PAR (80  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) afectaram a produção e teor celular de microcistina em *M. aeruginosa* PCC 7806. Estes verificaram que um aumento da intensidade se reflectia no aumento da produção e no conseqüente aumento do conteúdo celular, tendo as concentrações de microcistina sido 20 vezes maiores a 40  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  do que a 10  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Contrariamente a estes resultados, Hesse & Kohl (2001) mostraram que o conteúdo de microcistinas em três estirpes formadoras de colónias e em três estirpes não formadoras, propagadas em cultura contínua, não foi fortemente regulado pela intensidade de luz (testado 5 e 150  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ou disponibilidade de nutrientes.

Apesar destas contradições, importa ressaltar, que no trabalho aqui apresentado, a maior produção de microcistina por célula em *M. aeruginosa* aconteceu na mesma intensidade de luz a que se determinou a maior de taxa de crescimento (30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tal como referido em Sivonen & Jones (1999) e Carmichael (2001). Ambos os estudos referem que a maior produção de cianotoxinas acontece nas condições que são mais favoráveis para o crescimento do género (Carmichael, 2001; Sivonen & Jones, 1999).

Em *P. agardhii* houve algumas diferenças na produção de microcistina por célula entre intensidades de luz e fases do crescimento. Na cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verificou-se um aumento da concentração de microcistina por célula ao longo do crescimento. Enquanto nas duas culturas expostas às intensidades de luz mais altas, houve primeiro uma diminuição e depois um aumento da concentração de microcistina por célula na fase estacionária. Apesar da evolução semelhante nas últimas fases do crescimento, as concentrações de microcistina por célula foram diferentes, tendo sido maiores na cultura exposta à intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e menores na cultura exposta à intensidade de 20  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dadas as diferenças entre as concentrações de microcistina por célula nas culturas expostas às diferentes intensidades de luz ao longo do tempo, podemos afirmar que existe influência das intensidades testadas (4, 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sobre a produção efectiva de microcistina nesta espécie. Tal influência já tinha sido identificada em Sivonen, 1990. Nesse estudo a concentração de microcistinas foi maior em culturas expostas a intensidades de luz baixas (12 e 24  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) do que em culturas expostas a intensidades superiores (50 e 95  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Contrariamente ao constatado em *M. aeruginosa*, em *P. agardhii* a melhor intensidade de luz para a maior produção de microcistina por

célula ( $4 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) divergiu da intensidade a que se determinou a maior de taxa de crescimento ( $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), contrariamente ao que se presumia em Sivonen & Jones (1999) e Carmichael (2001). Isto pode ser explicado pela facto das culturas de *P. agardhii* expostas às intensidades de luz mais altas, tal como já se verificou em *M. aeruginosa* (Kaebernick *et al.*, 2000), aumentarem bastante a sua densidade, reduzindo a quantidade de luz que chega eficazmente a cada célula e que pode influenciar a produção de microcistina. Na cultura exposta à intensidade de  $4 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , esse intenso aumento de densidade não existe, continuando a luz a chegar eficazmente a cada célula nos filamentos e podendo continuar actuar sobre a produção/exportação de microcistina.

#### **5.4. Estabilidade dos genes de referência**

Um objectivo paralelo do trabalho consistiu na selecção e validação de genes de referência para a normalização da expressão génica usando a técnica de *RT-qPCR* em cianobactérias. Os estudos existentes são reduzidos e muitas vezes utilizam-se arbitrariamente genes de referência clássicos, sem grande averiguação da sua estabilidade nas espécies e nas condições utilizadas, faltando por isso muita informação sobre o tema (Huggett *et al.*, 2005).

Da informação disponível na literatura foram seleccionados três genes de referência, correspondente ao número mínimo aconselhável para normalização, que estivessem relacionados com vias independentes para evitar possíveis efeitos de co-regulação celular (Tran *et al.*, 2013). Um gene bastante utilizado e considerado uma referência clássica para a normalização - *rRNA 16S* (Botteldoorn *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013), um utilizado e avaliado apenas uma vez - *gltA* (Tran *et al.*, 2013) e por fim, um gene já utilizado mas ainda não avaliado - *rpoC1* (Alexova *et al.*, 2011; Ngwa *et al.*, 2014).

Recorreu-se a três algoritmos matemáticos: *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper* (Ayers *et al.*, 2007) para se obter informações precisas sobre a estabilidade dos genes de referência estudados. Apesar de pequenas diferenças entre os resultados obtidos nos vários algoritmos, que já seriam de esperar uma vez que cada software usa métodos matemáticos diferentes para determinar a estabilidade (Tran *et al.*, 2013), o gene *rRNA 16S* foi considerado pelos três como mais instável em *M. aeruginosa*, e o *rpoC1* como menos estável em *P. agardhii*.

O gene *rRNA 16S* apresentou um comportamento bastante divergente entre as duas espécies, se por um lado foi o gene de referência menos estável em *M. aeruginosa*, por outro foi o mais estável em *P. agardhii*. Nas duas únicas avaliações

realizadas a este gene como referência para a normalização em *RT-qPCR* em cianobactérias, os resultados também não foram consensuais. No estudo de Pinto *et al.* (2012), o *rRNA 16S* foi considerado o mais estável em três diferentes organismos: *Lyngbya aestuari*, *Nostoc* sp. e *Synechocystis* sp., usando diferentes condições de luz e azoto (luz contínua, regime luz/noite; meio com azoto e meio sem azoto). Resultados distintos obtiveram Tran *et al.* (2013), onde o gene *rRNA 16S* foi classificado como o menos estável em *P. agardhii* pelos algoritmos *geNorm* e *NormFinder*. Em suma, a utilização deste gene como referência na normalização de expressão génica é pouco consensual e deve ser avaliada individualmente em cada espécie antes da sua efectiva aplicação.

Tal como o *rRNA 16S*, também o gene *rpoC1*, manifestou um comportamento bastante diferente entre as duas espécies em estudo, tendo sido considerado como o mais estável em *M. aeruginosa* e o menos estável em *P. agardhii*. Este gene tem sido sobretudo utilizado no campo da ecologia das cianobactérias, especialmente na determinação de concentrações celulares por *RT-qPCR* (Churro *et al.*, 2012; Martins & Vasconcelos, 2005; Orr *et al.*, 2010). Ainda assim, nos últimos anos, já tem sido utilizado também como gene de referência na normalização da expressão génica (Alexova *et al.*, 2011; Ngwa *et al.*, 2014), embora ainda não tenha sido alvo de avaliação.

Apesar de nos dois algoritmos anteriores o melhor gene de referência ter divergido entre as duas espécies, no caso do algoritmo *BestKeeper*, o gene *gltA* foi classificado como o mais estável em ambas. Os resultados referentes à estabilidade do *gltA* estão de acordo com os obtidos em Tran *et al.* (2013), que utilizou pela primeira vez este gene. Nesse estudo, o gene *gltA* pertenceu ao grupo dos três mais estáveis em *P. agardhii*, sendo aconselhado como uma boa alternativa para a normalização da expressão em procariontes.

Avaliados os três genes de referência, optou-se por utilizar na normalização da expressão relativa de *mcyA* dois genes, em vez de apenas um, a fim de diminuir possíveis erros (Cruz *et al.*, 2009). Dada a estabilidade obtida para os genes *rpoC1* e *gltA* em *M. aeruginosa* e a estabilidade dos genes *rRNA 16S* e *gltA* em *P. agardhii*, foram estes os pares usados para efectuar a normalização da expressão do gene *mcyA*.

### **5.5. Efeito da intensidade de luz na expressão de *mcyA***

Avaliou-se a variação da expressão do gene alvo *mcyA* em cada fase do crescimento, tendo-se observado diferenças no efeito da luz entre as duas espécies.

Nas culturas de *M. aeruginosa*, a expressão do gene *mcyA* nas várias fases do crescimento foi sempre estatisticamente diferente entre a intensidade controlo de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os níveis de transcrição de *mcyA* nestas duas intensidades foram sempre inferiores ao nível de transcrição da condição controlo. Entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão de *mcyA* foi sempre muito semelhante, não tendo resultado por isso diferenças significativas entre ambas. A ocorrência de diferenças consideráveis na expressão entre a intensidade de controlo (4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e as duas outras intensidades testadas (20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mas não entre as intensidades 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pode dever-se ao facto das duas maiores intensidades de luz serem bastante próximas e por isso influenciarem de forma idêntica a expressão. Ainda assim, as diferenças encontradas sugerem que as intensidades de luz testadas tiveram influência sob os níveis de transcrição de *mcyA* em *M. aeruginosa*. Estes resultados estão de acordo com o observado por Kaebnick *et al.* (2000) utilizando o ensaio de protecção de RNase (RPA), em que apuraram um efeito da intensidade de luz nos níveis de transcrição de *mcyB* em *M. aeruginosa* PCC 7806. Estes verificaram que os níveis de expressão, usando intensidades de luz próximas das testadas neste trabalho, 16 e 31  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , foram idênticas. A expressão foi maior em intensidades de luz mais altas testadas (68 e 400  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) do que nas intensidades mais baixas (16 e 31  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Kim *et al.* (2005) empregando a técnica de *RT-qPCR*, descreveu um efeito da intensidade de luz também na transcrição de *mcyB* na mesma estirpe, tendo referido um aumento da expressão quando as culturas expostas à intensidade de luz de 7,53  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  passaram para uma exposição de 45,15  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Mais recentemente, El Semary (2010) aplicando igualmente a técnica de *RT-qPCR* concluiu que a expressão de *mcyB* foi semelhante entre as várias intensidades de luz por eles estudadas (2,8; 14; 32 e 40  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), quer em culturas mantidas a uma temperatura de 17°C quer em culturas mantidas a 25°C, não tendo existido por isso um efeito global significativo da luz sobre a expressão génica.

Nas culturas de *P. agardhii*, apenas nas duas últimas fases do crescimento a expressão do gene *mcyA* variou entre as várias intensidades de luz. Na fase de adaptação, valorizando os resultados da normalização com o gene de referência *rRNA 16S*, a expressão foi bastante semelhante entre as três intensidades. Já nas duas últimas fases do crescimento a expressão do gene *mcyA* foi estatisticamente diferente entre a intensidade controlo de 4  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol de fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os níveis de transcrição de *mcyA* nestas duas

intensidades de luz mais altas foram sempre inferiores ao nível de transcrição do controlo de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já entre as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão de *mcyA* foi muito idêntica, tal como se observou em *M. aeruginosa* e muito provavelmente devido à mesma razão, das intensidades testadas serem bastante próximas. Apesar disso, nota-se um efeito das intensidades de luz testadas sob os níveis de transcrição do gene *mcyA* nesta espécie. O efeito observado está de acordo com relatado em Tonk *et al.* (2005). Nesse trabalho houve um aumento da transcrição de *mcyA* até à intensidade de 60  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e uma diminuição em intensidades superiores a 100  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Por outro lado, a análise da evolução temporal da expressão do gene *mcyA* em cada intensidade de luz mostrou que em *M. aeruginosa*, de uma forma geral, a expressão variou sobretudo entre a fase de adaptação e a fase exponencial de crescimento. Nas intensidades de 4 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão primeiro diminuiu acentuadamente entre as duas primeiras fases do crescimento e depois manteve-se constante. Ainda assim os níveis de expressão na fase estacionária foram significativamente diferentes para os da fase de adaptação. Na intensidade de 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão diminuiu continuamente ao longo do tempo, tendo os níveis de transcrição sido significativamente diferentes entre as três fases do crescimento. A maior expressão de *mcyA* foi assim observada numa fase precoce do crescimento, ou seja, na fase de adaptação. Os resultados obtidos parecem ir de encontro com o observado por Kaebernick *et al.* (2000), que referiram que em intensidades de luz mais altas (68 e 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) os níveis de transcrição de *mcyB* foram maiores numa fase inicial ou média do crescimento e não numa fase tardia (fase estacionária). Contrariamente a isto, Schatz *et al.* (2007) relataram um maior número de transcritos do gene *mcyB* em células envelhecidas, sugerindo que a lise das células nessa fase induziu um aumento massivo de *mcyB* e estimulou a produção de microcistinas nas restantes células. Supondo assim que a microcistina pudesse desempenhar uma função química de informação e sinalização celular, indicadora de morte celular para as células ao redor das que estão a morrer, actuando possivelmente ao nível dos seus parâmetros fisiológicos/metabolismo como mecanismo de defesa. Mais recentemente, El Semaary (2010) verificou que a expressão de *mcyB* foi maior na fase estacionária do que na fase exponencial de crescimento nas várias condições testadas.

Em *P. agardhii*, os níveis de expressão de *mcyA* ao longo do tempo não variaram igualmente nas três intensidades de luz. Na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a expressão aumentou significativamente entre as duas primeiras fases do

crescimento, tendo-se atingido na fase exponencial de crescimento os maiores níveis de transcrição, embora na fase final se tenha verificado uma nova diminuição da expressão. Nas intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  os níveis de expressão de *mcyA* foram semelhantes entre a fase de adaptação e a fase exponencial de crescimento, mas não entre esta e a fase estacionária, onde houve uma diminuição estatisticamente significativa da expressão. Neste caso, a maior expressão de *mcyA* foi observada na fase exponencial de crescimento contrariamente ao notado em *M. aeruginosa*. O efeito da divisão celular/fase de crescimento na expressão de genes pertencentes ao cluster *mcy* nunca foi estudado em *P. agardhii*. Ainda assim, com as diferenças encontradas entre as várias fases do crescimento pode supor-se que a divisão celular/fase de crescimento possa afectar a transcrição destes genes, no entanto serão necessários mais estudos para o confirmar.

Neste trabalho, não se verificou uma correspondência entre expressão génica e a concentração de microcistina produzida por célula em nenhuma das condições testadas. Em *M. aeruginosa* as alterações verificadas na expressão de *mcyA* ao longo do tempo nas várias intensidades de luz não foram acompanhadas por variações no mesmo sentido da concentração de microcistina por célula. Observou-se que a expressão diminuiu acentuadamente entre as primeiras fases do crescimento, mas manteve-se posteriormente bastante semelhante, no entanto, a concentração de microcistina por célula primeiro aumentou e de seguida diminuiu ligeiramente. A falta de correspondência entre expressão e produção efectiva de microcistina identificada em *M. aeruginosa* neste trabalho está de acordo com a maioria dos estudos efectuados. Em Kaebernick *et al.* (2000), utilizando o ensaio de protecção de RNase (RPA), não observaram associação entre o aumento da expressão de *mcyB* e *mcyD* e a concentração de toxina celular. Sugerindo-se uma libertação da microcistina a partir da célula, por um transportador putativo (ainda desconhecido na época), em condições com intensidades de luz alta. Mais tarde, também Alexova *et al.* (2011) não relataram esta associação, empregando a técnica *RT-qPCR* no estudo da influência do ferro. As alterações observadas na concentração da microcistina não se traduziram nos níveis de transcrição de *mcyA*, que se mantiveram constantes. Mais recentemente, Horst *et al.* (2014) na investigação da influência do azoto por *RT-qPCR*, demonstrou que em condições limitantes existia uma redução da quantidade de microcistina produzida por célula, ao contrário do que detectava na expressão do gene *mcyB* nessas condições. Contrariamente a tudo isto, Sevilha *et al.* (2008) verificaram uma correlação, empregando também a técnica *RT-qPCR* no estudo da influência do ferro. Em

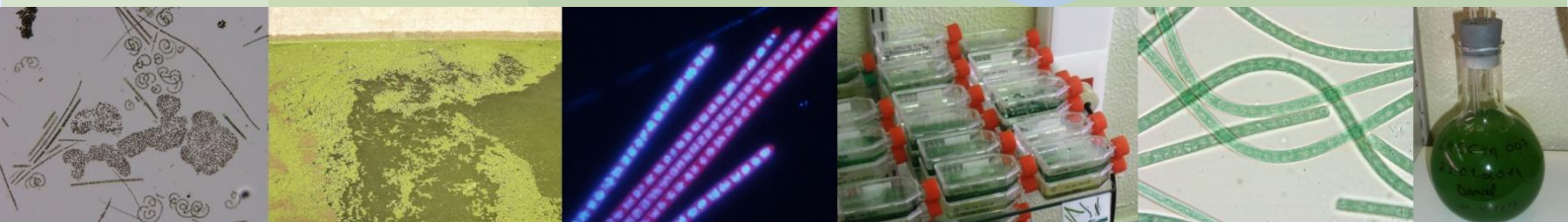
condições de deficiência, notaram um aumento da transcrição do gene *mcyD* tal como da quantidade de microcistina efectivamente produzida.

Tal como em *M. aeruginosa*, também em *P. agardhii* as variações da expressão de *mcyA* ao longo do tempo nas várias intensidades de luz não foram acompanhadas por modificações no mesmo sentido da concentração de microcistina por célula. Na intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apesar do aumento inicial da expressão de *mcyA* entre as duas primeiras fases do crescimento e a posterior acentuada diminuição, a concentração de microcistina por célula aumentou continuamente ao longo do tempo. Nas duas intensidades de luz mais altas a expressão de *mcyA* primeiro manteve-se constante (entre a fase de adaptação e fase exponencial de crescimento) e depois diminuiu. No entanto, a concentração de microcistina por célula primeiro diminuiu e depois aumentou. Ainda assim os maiores níveis de transcrição de *mcyA* e a maior quantidade de microcistina por célula na fase exponencial de crescimento e fase estacionária aconteceram na mesma cultura a 4  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A inexistência de relação entre estes dois parâmetros em *P. agardhii* constatada neste trabalho está em desacordo com os resultados descritos anteriormente. Tonk *et al.* (2005) notaram uma relação directa entre a taxa de transcrição de *mcyA* e a taxa de produção de microcistina nesta espécie, tendo existido um aumento de ambas até à intensidade de 60  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e uma diminuição em intensidades superiores a 100  $\mu\text{mol}$  de fotões  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A ausência de correspondência entre a expressão do gene alvo e a quantidade de toxina efectivamente produzida nas várias intensidades de luz nas duas espécies aqui analisadas, pode ser justificada pela hipótese de existirem mecanismos regulatórios na célula que actuam após a transcrição dos genes pertencentes ao cluster *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000) e acabem por interferir na construção da molécula de microcistina e por isso, independentemente da maior ou menor expressão, a quantidade de microcistina produzida pode não ser equivalente.



# 6. Conclusão



Como conclusões finais do trabalho realizado, pode afirmar-se que o factor intensidade de luz em *M. aeruginosa* influenciou o crescimento, tendo as diferenças entre intensidades de luz sido bastante maiores entre 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as duas intensidades mais altas. Verificou-se também um ligeiro efeito da intensidade de luz sob a concentração de microcistina por célula, principalmente na fase estacionária. A selecção de genes de referência para a normalização da expressão relativa de *mcyA* demonstrou que os mais estáveis nas condições testadas foram os genes *rpoC1* e *gltA*. Com sua utilização foi possível verificar um efeito da intensidade de luz na expressão do gene *mcyA*. Nas três fases do crescimento existiram sempre diferenças na expressão entre a intensidade mais baixa e as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , já a maior expressão deu-se a 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A expressão deste gene não foi apenas influenciada pela intensidade de luz mas também pela fase do crescimento, tendo ocorrido os maiores níveis de transcrição na fase de adaptação. Para além disso, verificou-se ainda uma ausência de correspondência entre a concentração de microcistina produzida por célula e a expressão de *mcyA* nesta espécie.

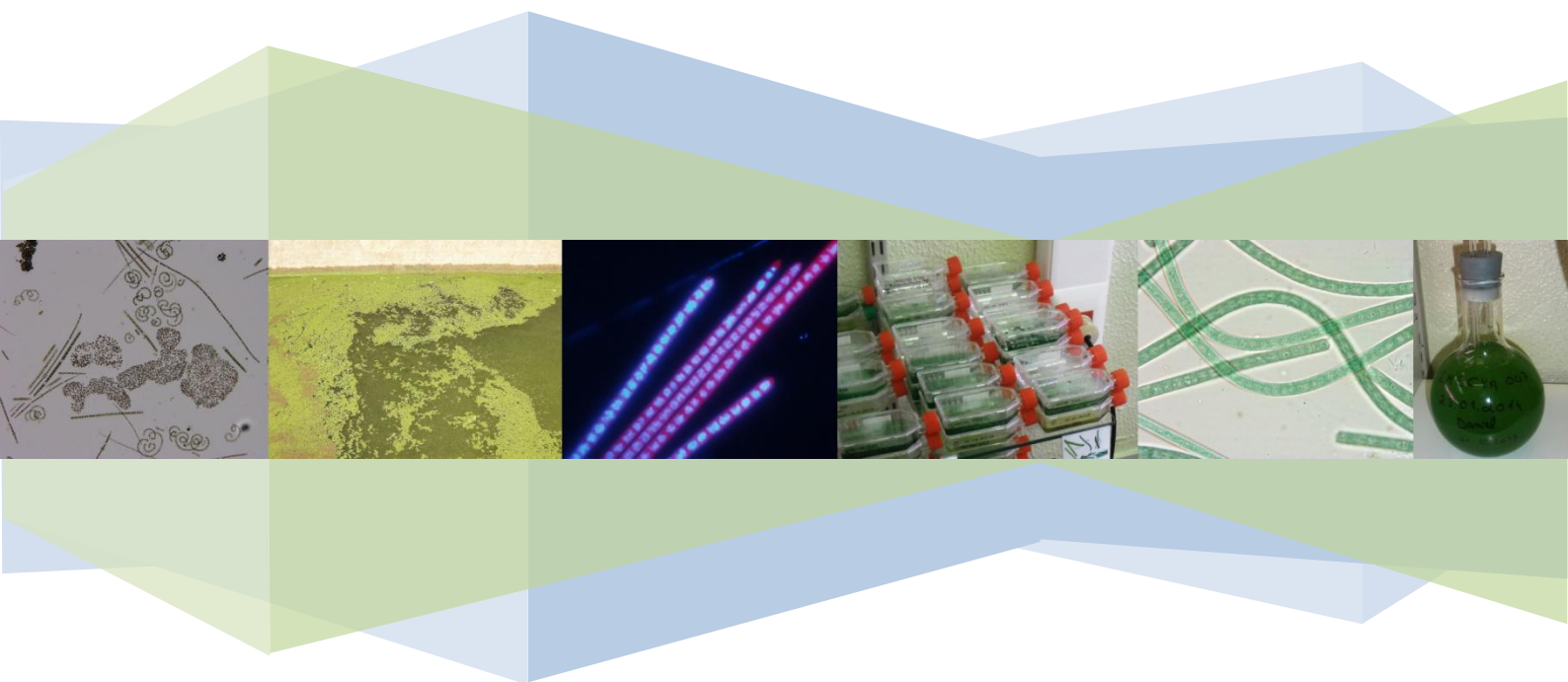
A intensidade de luz apresentou também em *P. agardhii* uma conexão com o crescimento, tendo as diferenças sido maiores entre a intensidade de 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as duas intensidades mais altas. Verificou-se que este factor influenciou também a concentração de microcistina por célula, pois a quantidade de toxina variou entre intensidades de luz e ao longo do crescimento. A selecção de genes de referência para a normalização da expressão relativa do gene *mcyA* nesta espécie evidenciou que os mais estáveis, nas condições de luz estudadas, foram os genes *rRNA 16S* e *gltA*. Com a utilização de ambos foi possível apurar a existência do efeito da intensidade de luz na expressão de *mcyA*. Apenas nas duas últimas fases do crescimento existiram diferenças entre a intensidade mais baixa e as intensidades de 20 e 30  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tendo ocorrido a maior expressão a 4  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Tal como na espécie anterior, a expressão deste gene não foi apenas influenciada pela intensidade de luz mas também pela fase do crescimento, observando-se os maiores níveis de transcrição na fase de crescimento exponencial. Verificou-se ainda uma falta de correspondência entre a quantidade de microcistina por célula e a expressão de *mcyA*.

Para finalizar, a recente técnica de *RT-qPCR* utilizada na presente investigação demonstrou ser uma ferramenta com imensas vantagens, e imprescindível no estudo da expressão génica. Conjugando os dados resultantes desta técnica com as restantes informações, foi possível estudar globalmente a influência da intensidade de

luz, ao nível do crescimento, da quantidade de toxina produzida e da transcrição de um dos genes envolvidos na produção de microcistina.

A forma como a intensidade de luz influenciou diferencialmente o isolado tóxico de *M. aeruginosa* comparativamente ao de *P. agardhii*, revela que ainda há muitas questões em aberto, que necessitam de ser esclarecidas.

# 7. Perspectivas Futuras

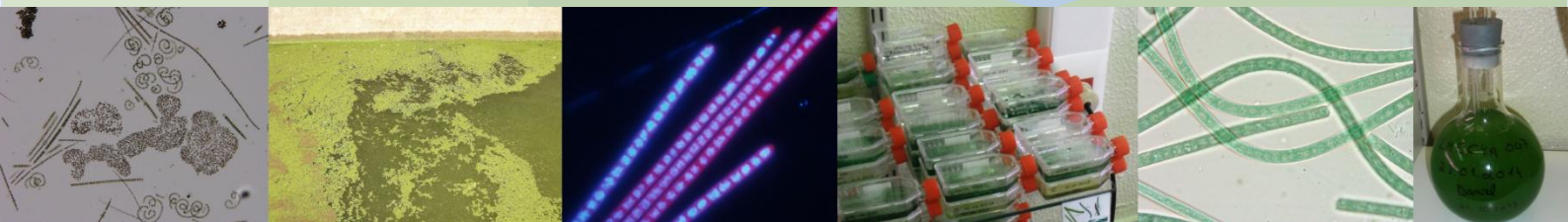


É sabido que a capacidade das cianobactérias produzirem cianotoxinas depende não só do seu património genético, mas também que a activação/regulação dos genes responsáveis pela sua síntese depende da influência dos factores ambientais. Os diversos estudos realizados até à data são por vezes discordantes, havendo também escassez na abrangência das condições testadas e das espécies de cianobactérias utilizadas, e até no recurso de técnicas inovadoras e recentes como o *PCR* em tempo real (*RT-qPCR*).

Os resultados obtidos neste trabalho, sobre a influência da intensidade da luz simultaneamente no crescimento, expressão génica e produção de toxina em duas espécies de cianobactérias revelou que há ainda muitas questões em aberto e que necessitam de ser esclarecidas. Seria relevante testar a metodologia aqui empregue num número mais alargado de estirpes da mesma espécie e até em várias outras espécies de cianobactérias. Fica ainda em aberto testar uma maior amplitude de intensidades de luz, ou até outros factores como o fotoperíodo, a temperatura e também a influência simultânea e complexa de vários factores, tal como acontece no meio ambiente.

Com a realização de novas investigações, poderão incorporar-se novos dados em modelos de prevenção de *blooms* tóxicos já existentes ou mesmo na criação de outros, com o objectivo de antever quais os períodos em que poderão existir uma maior incidência da toxicidade, e assim diminuir os riscos de exposição para os animais e seres humanos.

# 8. Referências Bibliográficas



- Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T., Ferrari, B., Neilan, B., 2011. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology* 13, 1064-1077.
- Andersen, C., Jensen, J., Ørntoft, T., 2004. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research* 64, 5245-5250.
- Ayers, D., Clements, D., Salway, F., Day, P., 2007. Expression stability of commonly used reference genes in canine articular connective tissues. *BMC veterinary research* 3, 1-10.
- Bartram, J., Carmichael, W., Chorus, I., Jones, G., Skulberg, O., 1999. Introduction. *In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London and New York, Cap. 1, pp. 1-13.
- Bellém, F., Nunes, S., Morais, M., Fonseca, R., 2012. Cianobactérias e Toxicidade: Impacto na Saúde Pública em Portugal e no Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Física* 06, 1374-1389.
- Bellém, F., Nunes, S., Morais, M., 2013. Cyanobacteria Toxicity: Potential Public Health Impacting South Portugal Populations. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 76, 263-271.
- Bittencourt-Oliveira, M., 2003. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae* 2, 51-60.
- Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Werbrouck, H., Haesebrouck, F., Donné, E., Herman, L., 2006. Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the *mntH* expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. *Journal of Microbiological Methods* 66, 125-135.
- Brandão, E., 2008. Cianobactérias e Saúde Pública no Brasil. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Bustin, S., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.
- Carmichael, W., 2001. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment* 7, 1393-1407.
- Carmichael, W., Azevedo, S., An, J., Molica, R., Jochimsen, E., Lau, S., Eaglesham, G., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental health perspectives* 109, 663-668.
- Carneiro, T., Leite, F., 2008. Cianobactérias e suas toxinas. *Revista Analytica* 32, 36-41.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E., 2003. Microcystin Biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, Evolution, and Manipulation. *Journal of Bacteriology* 185, 564-572.
- Chorus, I., Mur, L., 1999. Preventative Measures. *In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London and New York, Cap.8, pp. 235-273.

- Churro, C., Fernandes, A., Alverca, E., Sam-Bento, F., Paulino, S., Figueira, V., Bento, A., Prabhakar, S., Lobo, A., Martins, L., Pereira, P., 2010. Effects of tryptamine on growth, ultrastructure, and oxidative stress of cyanobacteria and microalgae cultures. *Hydrobiologia* 649, 195-206.
- Churro, C., Dias, E., Valério, E., 2012a. Risk Assessment of Cyanobacteria and Cyanotoxins, the Particularities and Challenges of *Planktothrix* spp. Monitoring. *In: Novel Approaches and Their Applications in Risk Assessment*. Dr. Yuzhou Luo. InTech, Cap. 4, pp. 59-84.
- Churro, C., Pereira, P., Vasconcelos, V., Valério, E., 2012b. Species-specific real-time PCR cell number quantification of the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Archives of Microbiology* 194, 749-757.
- Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural Crops. *Chemosphere* 96, 1-15.
- Codd, G., Morrison, L., Metcalf, J., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 264-272.
- Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR, 2003. [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/general/documents/cms\\_042486.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general/documents/cms_042486.pdf). Acedido a 5 de Abril 2014.
- Cruz, F., Kalaoun, S., Nobile, P., Colombo, C., Almeida, J., Barros, L., Romano, E., Grossi-de-Sá, M., Vaslin, M., Alves-Ferreira, M., 2009. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding* 23, 607-616.
- Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto. <http://dre.pt/pdf1s/2007/08/16400/0574705765.pdf>. Acedido a 13 de Janeiro 2014.
- Dittmann, E., Börner, T., 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 192-200.
- Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 7-17.
- Downing, T., Meyer, C., Gehringer, M., van de Venter, M., 2005. Microcystin Content of *Microcystis aeruginosa* Is Modulated by Nitrogen Uptake Rate Relative to Specific Growth Rate or Carbon Fixation Rate. *Environmental Toxicology* 20, 257-62.
- El Semy, N., 2010. Investigating factors affecting growth and cellular *mcyB* transcripts of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 using real-time PCR. *Annals of microbiology* 60, 181-188.
- El-Shehawy, R., Gorokhova, E., Fernández-Pinas, F., Campo, F., 2012. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Research* 46, 1420-1429.
- Fernandes, V., Cavati, B., Oliveira, L., Souza, B., 2009. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florescências. *Oecologia Brasiliensis* 13, 247-258.



- Figueiredo, D., Azeiteiro, U., Esteves, S., Gonçalves, F., Pereira, M., 2004. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 151-163.
- Fraga, F., Meulia, T., Fenster, S., 2008. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 10.3.1-10.3.33.
- Gan, S., Patel, K., 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1-3.
- Golubic, S., Abed, R., Palinska, K., Pauillac, S., Chinain, M., Laurent, D., 2010. Marine toxic cyanobacteria: Diversity, environmental responses and hazards. *Toxicon* 56, 836-841.
- Gupta, V., Ratha, S., 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.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hedges, S., Chen, H., Kumar, S., Wang, D., Thompson, A., Watanabe, H., 2001. A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* 1, 1-4.
- Hernández, J., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2009. Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: a risk intensified by global change. *Medical hypotheses* 72, 539-540.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Börner, T., 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180, 402-410.
- Hesse, K., J.-G., Kohl., 2001. Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*. In: *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, Cap. 3, pp. 152–158.
- Hesse, K., Dittmann, E., Börner, T., 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology* 37, 39-43.
- Hoiczky, E., Hansel, A., 2000. Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *Journal of Bacteriology* 182, 1191-1199.
- Horst, G., Sarnelle, O., White, J., Hamilton, S., Kaul, R., Bressie, J., 2014. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 54, 188-198.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 6, 279-284.
- Ismael, A., 2012. Benthic bloom of cyanobacteria associated with fish mortality in Alexandria waters. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38, 241-247.

- Jähnichen, S., Petzoldt, T., Benndorf, J., 2001. Evidence for control of microcystin dynamics in Bautzen Reservoir (Germany) by cyanobacterial population growth rates and dissolved inorganic carbon. *Archiv für Hydrobiologie* 150,177-196.
- Kaebnick, M., Neilan, B., Börner, T., Dittmann, E., 2000. Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3387-3392.
- Kaebnick, M., Neilan, B., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 1-9.
- Kahru, M., Leppänen, J., Rud, O., Savchuk, O., 2000. Cyanobacteria blooms in the Gulf of Finland triggered by saltwater inflow into the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 207, 13-18.
- Kim, H., Kim, C., Ahn, T., Yoo, S., Lee, D., 2005. Effects of Temperature and Light on Microcystin Synthetase Gene Transcription in *Microcystis aeruginosa*. *Key Engineering Materials* 277-279, 606-611.
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics* 54, 391-406.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., 2009. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. *Freshwater Reviews* 2, 31-50.
- Lee, S., Jang, M., Kim, H., Yoon, B., Oh, H., 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology* 89, 323-329.
- Lee, R., 2008. Cyanobacteria. *In: Phycology*. Cambridge University Press, New York, Cap. 2, pp. 33-80.
- Lopes, A., Fonseca, A., 1996. Crescimento de populações microbianas. *In: Biologia Microbiana*. Universidade Aberta, Lisboa, Cap. 7, pp. 135-145.
- Lukac, M., Aegerter, R., 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31, 293-305.
- Lun, Z., Hai, Y., Kun, C., 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences* 15, 166-171.
- Mankiewicz, J., Tarczyska, M., Walter, Z., Zalewski, M., 2003. Natural toxins from Cyanobacteria. *Acta Biologica Gracoviensia Series Botanica* 45/2, 9-20.
- Marôco, J., 2014. Testes Não Paramétricos. *In: Análise Estatística com o SPSS*. Report Number, Pêro Pinheiro, Cap. 7, pp.317-330.
- Martins, R., Pereira, P., Welker, M., Fastner, J., Vasconcelos, V., 2005. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 46, 454-464.
- Martins, A., Vasconcelos, V., 2011. Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Archives of Microbiology* 193, 615-627.

- McDonald, J., 2009. Tests for one measurement variable. *In: Handbook of Biological Statistics*. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, U.S.A, pp. 118-202.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International* 59, 303-327.
- Mohamed, Z., 2008. Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia. *Toxicon* 51, 17-27.
- Mur, L., Skulberg, O., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. *In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London and New York, Cap. 2, pp. 15-40.
- Ngwa, F., Madramootoo, C., Jabaji, S., 2014. Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (*mcy*) E gene transcript levels, *mcyE* gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *Microbiology Open*, 1-15.
- Neilan, B., Pearson, L., Muenchhoff, J., Moffitt, M., Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental microbiology* 15, 1239-1253.
- Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fuji, K., Harada, K., Ochi, K., Shirai, M., 2000. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *Journal of Biochemistry* 127, 779-789.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G., 1997. PCR Primers To Amplify 16S *rRNA* Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3327-3332.
- Oberhaus, L., Briand, J., Leboulanger, C., Jacquet, S., Humbert, J., 2007. Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *Journal Phycologica* 43, 1191-1199.
- Oliver, R., Ganf, G., 2002. Freshwater Blooms. *In: The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London and Moscow, Cap. 6, pp.149-194.
- Oliveira, T., 2010. PCR em tempo real: métodos e aplicações. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal.
- O'Neil, J., Davis, T., Burford, M., Gobler, C., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14, 313-334.
- Orr, P., Jones, G., 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43, 1604-1614.
- Orr, F., Rasmussen, J., Burford, M., Eaglesham, G., Lennox, S., 2010. Evaluation of quantitative real-time PCR to characterise spatial and temporal variations in cyanobacteria, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju and cylindrospermopsin concentrations in three subtropical Australian reservoirs. *Harmful Algae* 9, 243-254.

- Owczarzy, R., Tataurov, A., Wu, Y., Manthey, J., McQuisten, K., Almabrazi, H., Pedersen, K., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N., Sailor, C., Dawson, R., Peek, A., 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research* 36, 163-169.
- Paerl, H., Hall, N., Calandrino, E., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment* 409, 1739-1745.
- Pantelic, D., Svircev, Z., Simeunovic, J., Vidovic, M., Trajkovic, I., 2013. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere* 91, 421-441.
- Paul, V., 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *In: Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer New York, Cap. 11, pp. 239-257.
- Paulino, S., Sam-Bento, F., Churro, C., Alverca, E., Dias, E., Valério, E., Pereira, P., 2009. The Estela Sousa e Silva Algal Culture Collection: a resource of biological and toxicological interest. *Hydrobiologia* 636, 489-492.
- Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Accoroni, S., Totti, C., Penna, A., 2011. New approach using the Real-Time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in marine environment. *PLoS ONE* 6, 1-9.
- Pfaffl, M., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2002-2007.
- Pfaffl, M., 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *In: A-Z of quantitative PCR*. S.A. Bustin, La Jolla, CA, USA, Cap. 3, pp. 87-112.
- Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26, 509-515.
- Pinto, F., Thapper, A., Sontheim, W., Lindblad, P., 2009. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Molecular Biology* 10, 1-8.
- Pinto, F., Pacheco, C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P., Tamagnini, P., 2012. Selection of Suitable Reference Genes for RT-qPCR Analyses in Cyanobacteria. *PLoS ONE*, 1-9.
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A., Humbert, J., 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 47, 5464-5479.
- Rasmussen, B., Fletcher, I., Brocks, J., Kilburn, M., 2008. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455, 1101-1104.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemela, S., 1997. Variation of Microcystins, Cyanobacterial Hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a Function of Growth Stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2206-2212.
- Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Assessment of Environmental Conditions That Favor Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena* spp. Strains Cultured under Light Limitation at Different Temperatures. *Microbial Ecology* 36,181-192.

RNA Quality Control. [http://biomedicalgenomics.org/RNA\\_quality\\_control.html](http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html). Acedido a 12 de Dezembro 2013.

Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K., 2004. Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 686-692.

Santos, M., Phillips, L., 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity* 34, 111-125.

Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E., Kaplan, A., 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9, 965-970.

Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M., Fillat, M., Peleato, M., 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology* 10, 2476-2483.

Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M., Peleato, M., Fillat, M., 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* 19, 1167-1173.

Singh, S., Sinha, R., Daiker, V., Häder, D., 2010. Quantitative and qualitative extraction of RNA from a filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Journal of Applied Phycology* 22, 113-116.

Sivonen, K., 1990. Effects of Light, Temperature, Nitrate, Orthophosphate, and Bacteria on Growth of and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2658-2666.

Sivonen, K., Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. *In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London and New York, Cap. 3, pp. 41-95.

Skulberg, R., Skulberg, M., 1990. Forskning med Algekulturer NIVAs Kultursamling av Alger (Research with Algal Cultures. NIVA's Culture Collection of Algae). Norsk Institutt for Vannforskning. Oslo, Norway.

Smith, C., Osborn, A., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67, 6-20.

Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M., Liu, Y., Kaya, K., 1998. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological Research* 46, 19-23.

Sotero-Santos, R., Silva, C., Verani, N., Nonaka, K., Rocha, O., 2006. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tiete River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 163-170.

Teixeira, M., Rosa, M., 2006. Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration. *Water Research* 40, 2837-2846.

- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Döhren, H., Börner, T., Neilan, B., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 7, 753-764.
- Tonk, L., Visser, P., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E., Wiedner, C., Mur, L., Huisman, J., 2005. The Microcystin Composition of the Cyanobacterium *Planktothrix agardhii* Changes toward a More Toxic Variant with Increasing Light Intensity. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5177-5181.
- Tonk, L., Welker, M., Huisman, J., Visser, P., 2009. Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. *Harmful Algae* 8, 219-224.
- Tran, T., Bernard, C., Ammar, M., Chaouch, S., Comte, K., 2013. Heat shock transcriptional responses in an MC-producing cyanobacterium (*Planktothrix agardhii*) and its MC-deficient mutant under high light conditions. *PLoS ONE* 8, 1-10.
- Understanding and measuring variations in DNA sample quality, 2011. [http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality). Acedido a 13 de Dezembro 2013.
- Utkilen, H., Gjølme, N., 1992. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* as a Function of Light in Continuous Cultures and Its Ecological Significance. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1321-1325.
- Utkilen, H., Gjølme, N., 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 797-800.
- Utkilen, H., Fastner, J., Bartram, J., 1999. Fieldwork: site inspection and sampling. *In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London and New York, Cap. 11, pp. 329-345.
- Valério, E., Chaves, S., Tenreiro, R., 2010. Diversity and Impact of Prokaryotic Toxins on Aquatic Environments: A Review. *Toxins* 2, 2359-2410.
- van der Westhuizen, A., Eloff, J., 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* 163, 55-59.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 1-12.
- Vasconcelos, V., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 249-254.
- Vasconcelos, V., 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25: 425-432.
- Vézic, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K., 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology* 43, 443-54.
- Walsh, K., Jones, G., Dunstant, R., 1997. Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry* 44, 817-824.

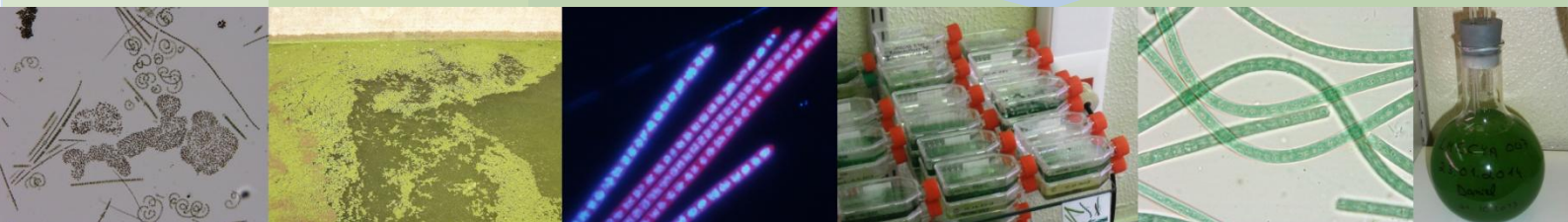
Wasmund, N., Nausch, G., Voss, M., 2012. Upwelling events may cause cyanobacteria blooms in the Baltic Sea. *Journal of Marine Systems* 90, 67-76.

Wiedner, C., Visser, P., Fastner, J., Metcalf, J., Codd, G., Mur, L., 2003. Effects of Light on the Microcystin Content of *Microcystis* Strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1475-1481.

Whitton, B., Potts, M., 2000. Introduction to the Cyanobacteria. *In: The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London and Moscow, Cap.1, pp. 1-10.

Zhang, T., Fang, H., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 281-289.

# 9. Anexos





## ANEXO I

**Composição do meio de cultura Z8**  
(Skulberg & Skulberg, 1990)



**Tabela I** - Composição do meio Z8 utilizado na cultura das cianobactérias de água doce. As quantidades apresentadas em cada solução stock foram adicionadas a 1 L de água bidestilada.

Solução stock	Componente	Quantidade
Solução A -10 mL	NaNO <sub>3</sub>	46,7 g/L água bidestilada
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,9 g/L água bidestilada
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5 g/L água bidestilada
Solução B -10 mL	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,1 g/L água bidestilada
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,1 g/L água bidestilada
Solução Fe-EDTA -10 mL	Fe-EDTA	(ver composição abaixo)
Solução de Micronutrientes -1 mL	Micronutrientes	(ver composição abaixo)

**Tabela II** - Composição da solução stock Fe-EDTA utilizada no meio Z8. As quantidades apresentadas de cada uma das soluções FeCl<sub>3</sub> e EDTA foram adicionadas a 1 L de água bidestilada.

Solução	Componente e quantidade
Solução FeCl <sub>3</sub> - 10 mL	2,8 g FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O em 100 mL de HCl 0,1 M
Solução EDTA - 9,5 mL	3,9 g EDTA-Na <sub>2</sub> em 100 mL de NaOH 0,1 M

**Tabela III** - Composição da solução stock de micronutrientes utilizada no meio Z8. As quantidades apresentadas de cada constituinte foram adicionadas a 1 L de água bidestilada.

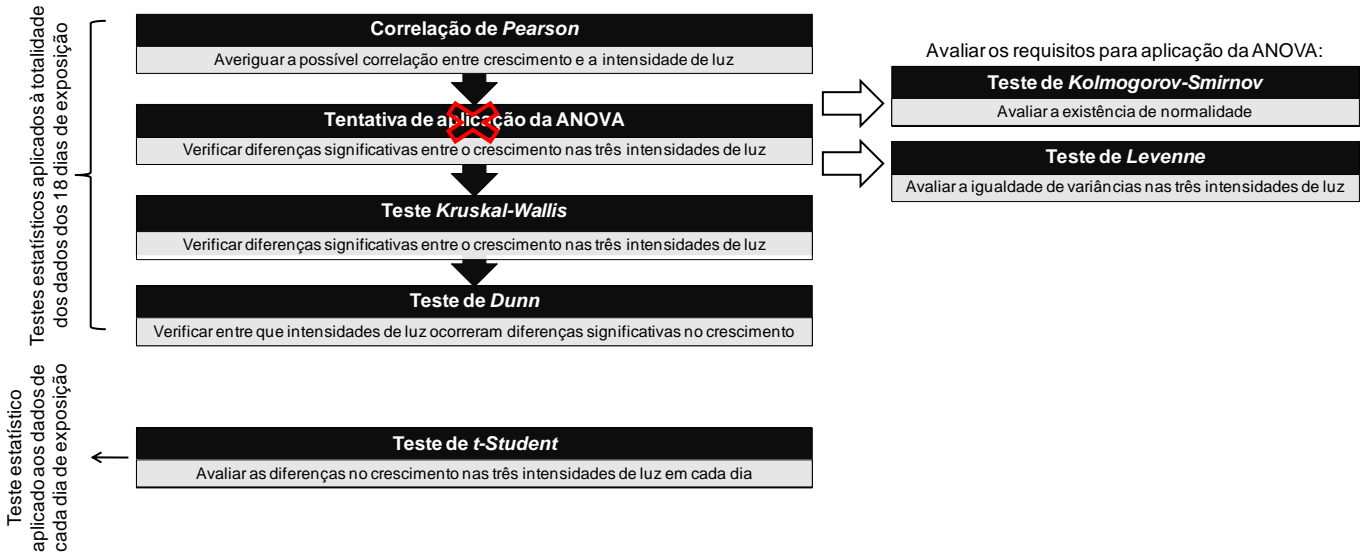
Componente	Quantidade
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,31000 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02870 g
MnSO <sub>4</sub>	0,22300 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0033 g
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,00089 g
Co(NO <sub>3</sub> ).6H <sub>2</sub> O	0,01460 g
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,04100 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00880 g
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .24H <sub>2</sub> O	0,04740 g
NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01980 g
KI	0,00830 g
KBr	0,01200 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01250 g
Cd(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	0,01550 g

## ANEXO II

## Análise estatística aplicada na avaliação do crescimento



Figura I - Representação esquemática da análise estatística aplicada na avaliação do crescimento.



### 1. Correlação de Pearson

A fim de averiguar a existência de uma associação entre o crescimento e intensidade de luz utilizou-se a análise de correlação simples – correlação de *Pearson* com uma margem de erro de 5% (El Semary, 2010). Esta análise permite perceber se duas variáveis estão ou não relacionadas (McDonald, 2009).

Para investigar tal relação, foi necessário avaliar uma hipótese nula *versus* uma hipótese alternativa:

<b>Hipótese nula</b>	O crescimento e a intensidade de luz são independentes
<b>Hipótese alternativa</b>	O crescimento e a intensidade de luz não são independentes

Se o *p-value* resultante for superior à margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula, não existindo nenhuma associação entre a intensidade de luz e o crescimento. Já se for inferior ( $P < 0,05$ ) rejeita-se a hipótese nula, havendo assim, uma associação/efeito entre a intensidade de luz e o crescimento.

### 2. Tentativa de Aplicação da ANOVA

Aferida a correlação anterior, pretendeu-se saber se existiram diferenças significativas entre o crescimento nas três intensidades de luz, ponderando-se aplicar a análise de variância simples - ANOVA. Antes de se poder aplicar a ANOVA foi necessário verificar os dois requisitos essenciais à sua aplicação (existência de normalidade e igualdade de variâncias nas três intensidades de luz).

### 2.1 Teste Kolmogorov-Smirnov

A existência de normalidade foi testada recorrendo-se ao teste não paramétrico de ajustamento *Kolmogorov-Smirnov*, com uma margem de erro de 5%, que permite apurar se uma população seguiu ou não uma determinada distribuição, neste caso concreto uma distribuição normal (Lilliefors, 1967). Para tal foi necessário testar a hipótese nula *versus* uma hipótese alternativa:

<b>Hipótese nula</b>	Distribuição relativa ao crescimento em cada intensidade de luz seguiu uma distribuição normal
<b>Hipótese alternativa</b>	Distribuição relativa ao crescimento em cada intensidade de luz não seguiu uma distribuição normal

Se o *p-value* obtido for superior à margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula, tendo a população uma distribuição normal, se for inferior ( $P < 0,05$ ) rejeitar-se a hipótese nula, não tendo a população uma distribuição normal.

### 2.2 Teste de Levene

A igualdade de variâncias (também designada de homogeneidade de variâncias) das três intensidades de luz foi testada utilizando o teste de *Levene* com a mesma margem de erro do teste anterior. O teste de *Levene* tem sido aplicado nas mais variadas áreas do conhecimento, possibilitando verificar os pressupostos de alguns testes estatísticos como a ANOVA (Gastwirth *et al.*, 2009). Foi indispensável, então, avaliar a hipótese nula *versus* uma hipótese alternativa:

<b>Hipótese nula</b>	As variâncias das três populações foram iguais
<b>Hipótese alternativa</b>	Pelo menos duas variâncias foram diferentes

Se o *p-value* obtido for superior margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula e, assim sendo, as três populações tiveram a mesma variância, se for inferior ( $P < 0,05$ ) rejeita-se a hipótese nula, sendo que existiram pelo menos duas variâncias diferentes.

## 3. Teste Kruskal-Wallis

Não satisfeitos os requisitos para uso da ANOVA, utilizou-se como alternativa o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* com uma margem de erro de 5%. O teste *Kruskal-Wallis* é frequentemente utilizado para comparar distribuições de três ou mais populações independentes, quando existe uma variável nominal (ex. intensidade de luz) e uma variável de medição (ex. crescimento) em estudo, que não reúne os pressupostos para aplicação da ANOVA, como foi o caso (Marôco, 2014; McDonald, 2009). Foi necessário testar a hipótese nula *versus* uma hipótese alternativa:

<b>Hipótese nula</b>	Todas as populações estudadas possuíam funções de distribuição iguais
<b>Hipótese alternativa</b>	Duas (ou mais) das populações estudadas possuíam funções de distribuição diferentes

Se o *p-value* resultante for superior à margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula, pelo que as três populações apresentaram a mesma função de distribuição, não existindo diferenças entre o crescimento das culturas expostas às diferentes intensidades de luz. Caso o *p-value* seja inferior ( $P < 0,05$ ) à margem de erro, rejeita-se a hipótese nula, dado que o crescimento de pelo menos duas culturas expostas às diferentes intensidades diferiu.

#### 4. Teste de Dunn

Notadas diferenças, importou perceber entre que intensidades de luz ocorreram essas desigualdades e, por isso, utilizou-se o teste *a posteriori* de comparações múltiplas - teste de *Dunn* com uma margem de erro de 5% (Marôco, 2014). Com a sua aplicação foi possível comparar o crescimento entre as diferentes intensidades de luz (analisando-se as intensidades duas a duas). Testou-se a hipótese nula versus uma hipótese alternativa:

<b>Hipótese nula</b>	O crescimento nas duas intensidades de luz foi semelhante
<b>Hipótese alternativa</b>	O crescimento nas duas intensidades de luz foi diferente

Se o *p-value* resultante for superior à margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula, pelo que o crescimento foi semelhante. Caso o *p-value* seja inferior ( $P < 0,05$ ) à margem de erro, rejeita-se a hipótese nula, ou seja, o crescimento diferiu.

#### Teste t-Student

Por fim empregou-se o teste *t-Student* com uma margem de erro de 5%, para avaliar as diferenças entre o crescimento nas três intensidades de luz em cada dia, agrupando as intensidades de luz duas a duas (McDonald, 2009). Investigou-se a hipótese nula versus a hipótese alternativa:

<b>Hipótese nula</b>	Valores médios iguais
<b>Hipótese alternativa</b>	Valores médios diferentes

Se o *p-value* obtido for superior à margem de erro de 5%, aceita-se a hipótese nula e os valores médios entre as duas intensidades de luz são iguais, se for inferior ( $P < 0,05$ ) rejeita-se a hipótese nula, e considera-se que as diferenças observadas foram significativamente diferentes entre si.

**Referências**

El Semy, N., 2010. Investigating factors affecting growth and cellular *mcyB* transcripts of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 using real-time PCR. *Annals of microbiology* 60, 181-188.

Gastwirth, J., Gel, Y., Miao, W., 2009. The Impact of Levene's Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice. *Statistical Science* 24, 343-360.

Lilliefors, H., 1967. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *Journal of the American Statistical Association* 62, 399-402.

Marôco, J., 2014. Testes Não Paramétricos. In: *Análise Estatística com o SPSS*. Report Number, Pêro Pinheiro, Cap. 7, pp.317-330.

McDonald, J., 2009. Tests for one measurement variable. In: *Handbook of Biological Statistics*. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, U.S.A, pp. 118-202.

**ANEXO III****Composição da solução de Lugol  
(solução de fixação)**  
(Utkilen *et al.*, 1999)

**Tabela IV** - Composição da solução de lugol utilizada na fixação das culturas de cianobactérias para contagem celular.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Iodeto de potássio (KI)	20 g em 200 mL de água destilada
Iodo sublimado	10 g
Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	20 mL

## ANEXO IV

### Protocolo de Extração de *DNA*

(Adaptado de Santos & Phillips, 2009)



✓ Material:

- Tubos de 1,5 mL e 2 mL
- Microesferas de vidro 425-600  $\mu\text{m}$
- Tampão de lise com PVPP
- Fenol
- Clorofórmio
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Gelo
- Água destilada *DNase/RNase free*
- Micropipetas e pontas

✓ Equipamento:

- *Hotte*
- Vórtex
- Centrífuga
- Sonicador

✓ Procedimento:

1. Colocar uma pequena quantidade de cultura previamente liofilizada em tubos de 2 mL.
2. Adicionar 0,2 g de microesferas de vidro 425-600  $\mu\text{m}$  (*SIGMA Life Science*).
3. Pesar a quantidade de PVPP (*polyvinyl polypyrrolidone*) pretendida e adicionar ao tampão de lise<sup>1</sup>.
4. Juntar 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lise com o PVPP aos tubos de 2 mL.
5. Sonicar durante 5 - 10 min (dependendo da quantidade de liofilizado).
6. Transferir as amostras para o gelo.
7. Adicionar 250  $\mu\text{L}$  de fenol e 250  $\mu\text{L}$  de clorofórmio.
8. Agitar no vórtex durante 20 min, à velocidade máxima.
9. Centrifugar durante 25 min, a 14500 rpm e a 4°C.
10. Transferir o sobrenadante para novo tubos de 1,5 mL.
11. Adicionar um volume de isopropanol frio igual ao volume de amostra transferido.
12. Agitar por inversão suave.
13. Centrifugar durante 10 min, a 14500 rpm e a 4°C.
14. Descartar o sobrenadante.
15. Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 70% frio.
16. Centrifugar durante 5 min, 14500 rpm e a 4°C.
17. Descartar o sobrenadante.
18. Secar o *pellet* com o tubo aberto e invertido à temperatura ambiente durante 5 -10 min.

19. Adicionar 50  $\mu$ L de água destilada *DNase/RNase free* (Gibco).
20. Conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

<sup>1</sup>**Tabela V** - Composição do tampão de lise utilizado na extração de DNA.

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	2%
SDS	1%
PVPP	1% (p/v)



## ANEXO V



### Protocolo de Extração RNA

(Adaptado de Pinto *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2010 e Tran *et al.*, 2013)

✓ Material:

- Seringas
- Filtros de Papel
- Filtros de plástico
- Microesferas de vidro 425-600  $\mu\text{m}$
- Reagente *Trizol*
- Clorofórmio
- Acetato de sódio 3M
- Isopropanol
- Etanol 75%
- Água *DNases/ RNases free*
- Azoto líquido
- Gelo
- Tubos de 1,5 mL e 2 mL
- Micropipetas e pontas

✓ Equipamento:

- *Hotte*
- Vórtex
- Centrifuga c/temperatura regulável

✓ Procedimento:

1. Recolher de cada frasco aproximadamente 4 mL de suspensão celular para dois tubos de 2 mL.
2. Neste ponto o procedimento a seguir para duas espécies é diferente:  
Cultura de *M. aeruginosa*: centrifugar os tubos com amostra durante 15 min, a 13000 rpm e a 4°C. Retirar o sobrenadante, ficando apenas o *pellet* de células.  
Cultura de *P. agardhii*: recolher a suspensão celular dos dois tubos de 2 mL para uma seringa de 10 mL. Passar a suspensão celular por um filtro de papel (previamente colocado num filtro de plástico encaixado na seringa), retendo apenas as células. Colocar o filtro de papel num novo tubo de 2 mL.
3. Adicionar 1 mL do Reagente *Trizol* ao *pellet* de células (cultura de *M. aeruginosa*) ou ao filtro de papel (cultura de *P. agardhii*).
4. Colocar as amostras no vórtex à velocidade média (para que as células fiquem completamente ressuspendidas no reagente).
5. Congelar em azoto líquido durante alguns segundos.
6. Descongelar as amostras num copo com água à temperatura ambiente.
7. Repetir os pontos cinco e seis três vezes.

8. Adicionar 0,2 g de microesferas de vidro 425-600  $\mu\text{m}$  (*SIGMA Life Science*).
9. Homogeneizar no vórtex à velocidade média, realizando seis ciclos alternados de 30 seg no vórtex e 1 min no gelo.
10. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e homogeneizar no vórtex à velocidade média, durante 30 seg.
11. Centrifugar durante 15 min, a 12500 rpm e a 4°C.
12. Transferir 500-600  $\mu\text{L}$  (máximo de 700  $\mu\text{L}$ ) da camada aquosa para novos tubos de 1,5 mL frios.
13. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3M e um volume de isopropanol igual ao volume de amostra transferida.
14. Misturar por inversão durante 30 seg e armazenar durante 10 min, a -20°C.
15. Centrifugar durante 5 min, a 12500 rpm e a 4°C.
16. Remover o sobrenadante por inversão e com pipeta.
17. Adicionar 1 mL de etanol 75% gelado para lavar o *pellet* de RNA.
18. Centrifugar durante 5 min, a 12500 rpm e a 4°C.
19. Remover o sobrenadante.
20. Secar o *pellet* com o tubo aberto e invertido à temperatura ambiente (em cima de gelo), durante 20-25 min aproximadamente.
21. Adicionar 30-50  $\mu\text{l}$  de água *DNases/RNases free* (*Gibco*).
22. Armazenar as amostras -80°C até serem utilizadas.

## ANEXO VI

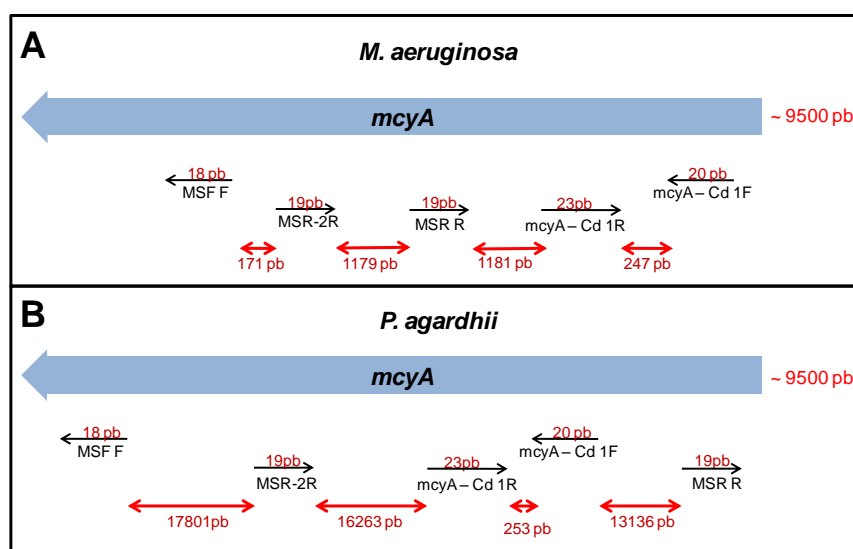
### Primers disponíveis para o gene *mcyA*



**Tabela VI** – Listagem dos *primers* universais disponíveis na literatura para o gene *mcyA*.

Espécie	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Referência Bibliográfica
Universal	MSF F 5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3'	1368	Tillett <i>et al.</i> , 2001
	MSR R 5'-TGCAGATAACTCCGCAGTTG-3'		
	MSF F 5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3'	189	Tillett <i>et al.</i> , 2001
	MSR-2R 5'-GCCGATGTTTGGCTGTAAAT-3'		Furukawa <i>et al.</i> , 2006
	mcyA-Cd 1F 5'-AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA-3'	291–297	Hisbergues <i>et al.</i> , 2013
	mcyA-Cd 1R 5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'		

**Figura II** - Representação esquemática da localização dos *primers* descritos na bibliografia e passíveis de serem utilizados na amplificação do gene *mcyA* nas espécies: A) *M. aeruginosa*. B) *P. agardhii*.



#### Referências:

Furukawa, K., Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T., Inamori, Y., 2006. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *Journal of bioscience and bioengineering* 102, 90-96.

Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Börner, T. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180, 402-410.

Tillett, D., Parker, D., Neilan, B., 2001. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and environmental microbiology* 67, 2810-2818.