

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da influência de fatores ambientais na expressão de
genes de saxitoxina de cianobactérias**

Marta Vieira Mendes Gamboa dos Reis

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Elisabete Valério
Professora Doutora Teresa Rebelo

2019

Nota Prévia



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, sob a orientação da Mestre Carina Menezes e Doutora Elsa Dias.

As referências bibliográficas desta dissertação estão escritas de acordo com as normas da revista *Aquatic Toxicology*.

A escrita deste documento seguiu as regras do novo acordo ortográfico.

Este trabalho foi apresentado na seguinte comunicação em forma de poster:

- Marta Reis, Carina Menezes, Elsa Dias, Elisabete Valério. **Comparison of saxitoxin-genes expression and production profiles between *Aphanizomenon gracile* and *Cuspidothrix issatschenkoi* strains, isolated from freshwater reservoirs.** Apresentado no 2º Congresso Iberoamericano de Cianotoxinas / 6º Congresso Ibérico de Cianotoxinas (6CIC). Múrcia, Espanha, 3 a 5 de julho de 2019.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Doutora Elisabete Valério. Não só por me ter aceite e confiado em mim para a realização deste trabalho, mas por todas as ajudas que deu na elaboração do mesmo. Apesar de todos os contratemplos que foram surgindo (e não foram poucos!) consegui resolvê-los, juntamente com as minhas coorientadoras, sempre da melhor forma possível, tranquilizando-me. Obrigada por toda a paciência e por todos os ensinamentos, quer ao nível científico, quer pessoal. Há frases que levo comigo e umas delas essencial para uma vida profissional serena “pensamentos positivos atraem coisas positivas”. Esta frase não teria tido tanto impacto em mim se a Elisabete não tivesse dito da forma tão confiante como disse acompanhado por um grande sorriso. Isso fez-se acreditar piedosamente nessa frase “clichê” e a não desistir nos momentos mais complicados. Um muito obrigada Elisabete.

À minha orientadora interna, Professora Doutora Teresa Rebelo, pela prontidão nas respostas e por ter corrigido a dissertação.

Às minhas co-orientadoras Mestre Carina Menezes e Doutora Elsa Dias. Por todas as sugestões face aos problemas que foram surgindo, por estarem sempre do meu lado e nunca desistirem, e por todos os ensinamentos teóricos e práticos. Por toda a paciência disponibilizada ao longo do ano que me permitiu crescer e tornar-me independente. Por fim, obrigada por corrigirem a minha dissertação.

Aos colegas de laboratório, Sérgio Paulino, Tânia Rosado e Maria Vilares, por manterem a boa disposição no laboratório e pelas várias conversas motivadoras. Ao Sérgio também agradeço toda a paciência e toda a ajuda na utilização dos microscópicos e nos programas de fotografia. Sem ti a qualidade das fotografias não seria a mesma.

Ao INSA, por ter cedido as suas instalações e materiais indispensáveis para a concretização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado Adriana, André, Beatriz e Rita. Obrigada pela compreensão e ombro amigo nos momentos mais desesperantes. Pela hora de almoço/hora do café que se tornou um hábito essencial durante todos estes meses. Obrigada por todas as gargalhadas e parvoíces. Seria mais difícil sem a vossa presença.

Aos amigos de licenciatura, Constança, Gonçalo, Ivana, Rita, Silvia e Zé. Todos vocês têm sido fundamentais nesta minha aventura por Biologia. Espero que estejam presentes durante muito mais etapas importantes como esta foi. Tenho a certeza de que iremos fazer jus à frase “os amigos da faculdade são para toda a vida”.

Aos meus amigos de infância dos Olivais. Já são muitos anos e tenho a segurança de que serão muitos mais. Não sabem o bem que me fazem. Meus macaquinhos.

À minha família, em especial ao meu avô, aos meus pais, ao meu irmão e ao meu padrinho. Obrigada por terem ouvido as minhas lamentações, por celebraram comigo todas as vitórias e por me encaminharem sempre da melhor forma. Um agradecimento especial aos meus pais, Fátima e Gamboa, que providenciaram os melhores 23 anos em destaque estes últimos cinco anos académicos. Obrigada pela vossa dedicação e empenho. Espero nunca vos desiludir e também espero conseguir compensar-vos um dia por todos os esforços. São os meus pilares e orgulho.

Ao Diogo por todas as risadas, amizade, amor e paciência. Confio-te os meus pensamentos, ambições e sonhos por achar que és a pessoa mais genuína e sincera. Obrigada por ultrapassares mais uma etapa importante do meu lado e por manteres o sentido de humor que sem o qual já não sei viver. Um grande obrigada.

Resumo

As cianobactérias são seres procariotas fotossintéticos com uma longa história evolutiva, o que possibilitou o desenvolvimento de várias características que permitem a sua adaptação perante as alterações climáticas e as modificações antropogénicas que se verificam nos sistemas aquáticos. Algumas cianobactérias, perante condições favoráveis, atingem elevadas densidades celulares originando os *blooms*. Este fenómeno está frequentemente associado à produção de toxinas. Dentro do grupo das cianotoxinas, a saxitoxina (STX) e os seus análogos têm ganho algum destaque uma vez que a sua ocorrência nos corpos de água doce representa um fenómeno mundial com um número crescente de casos nos últimos dez anos.

A STX e os seus análogos são um grupo de alcalóides que são conhecidos por bloquear principalmente os canais de sódio das membranas dos axónios dos neurónios, afetando assim o sistema nervoso de vários animais, incluindo o Homem. Pode causar severas paralisias, levando inclusive a uma falha respiratória, e conseqüentemente provocar a morte. Estas toxinas são produzidas por uma via biossintética única, sendo o *cluster sxt* responsável por codificar as proteínas que permitem a síntese e o transporte das toxinas SXTs para o meio extracelular. A presença destas toxinas nos corpos de água representa uma ameaça para a saúde humana, para a estabilidade do ecossistema e economia em todo o mundo. Muitos estudos laboratoriais têm mostrado que vários fatores ambientais afetam de diferentes formas a síntese de STXs. Perante o atual contexto de aquecimento global, as temperaturas médias das águas estão a aumentar pelo que muitas cianobactérias estão a expandir a sua distribuição geográfica, especialmente algumas espécies produtoras de STXs. Neste contexto torna-se particularmente importante perceber de que modo a temperatura pode influenciar o crescimento de cianobactérias produtoras de STXs e a sua respetiva síntese. A nível molecular, os efeitos que a própria temperatura tem sobre os níveis de transcrição de genes pertencentes ao *cluster sxt* encontram-se ainda pouco elucidados, estando descritos apenas numa espécie.

De modo a providenciar novos conhecimentos nesta área, este trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre três temperaturas diferentes (10, 20 e 30 °C) e parâmetros relacionados com o crescimento [taxa de crescimento, densidade celular e formação de células especializadas (heterócitos e acinetos)], a produção de STXs, e os níveis de expressão de genes que permitem sua síntese (*sxtA*) e o transporte de SXTs (*sxtM* e *sxtPer*) em duas estirpes de cianobactérias, *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31, isoladas em albufeiras portuguesas.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer, para ambas as estirpes, uma relação entre as taxas de crescimento e a temperatura, sendo que este primeiro parâmetro foi menor nas culturas que cresceram a 10 °C e maior a 20 °C. A 30 °C nenhuma das culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 cresceu. À temperatura de 20 °C, também se verificou que *C. issatschenkoi* LMECYA31 produziu duas vezes mais STXs totais (*toxin quota cell*) ao longo das fases do crescimento do que *A. gracile* LMECYA40. Em ambas as espécies, a maior produção de STXs ocorreu a 20 °C na fase exponencial final.

Em *A. gracile* LMECYA40, a formação de um elevado número de heterócitos ocorreu nas fases antecedentes às fases de maior produção de SXTs totais. Detetou-se a formação de acinetos nas duas estirpes a 10 °C, e no que diz respeito a *C. issatschenkoi* LMECYA31, a formação de acinetos com grandes volumes coincidiu com uma menor produção de STXs.

Os níveis de expressão génica de *sxtM* e *sxtPer* foram influenciados pela temperatura e pela fase de crescimento correspondente nas duas estirpes. De uma forma geral, os dados obtidos sugerem que há uma regulação positiva destes genes à temperatura de 10 °C que foi acompanhada por o aumento de STXs totais, o que poderá implicar uma maior concentração de STXs extracelulares. Por outro lado, também se verificou que houve uma maior expressão génica nas fases do crescimento mais tardias.

Portanto, conclui-se, que a temperatura teve influência em todos os parâmetros analisados, afetando de forma diferenciada as estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31. Os

resultados obtidos neste estudo poderão ser incorporados em modelos preditivos ou empregues no desenvolvimento de novas técnicas de monitorização que permitam gerir o desenvolvimento de *blooms* e a produção de STXs, minimizando assim potenciais riscos para a saúde humana e animal.

Palavras-chave: *Aphanizomenon gracile*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, Saxitoxina, Temperatura, *RT-real-time-qPCR*, Heterócitos, Acinetos.

Abstract

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes with a long evolutionary history, which enabled them to adapt to climatic changes and more recently to anthropogenic modifications of aquatic environments. A few cyanobacterial species, under favorable conditions, form massive surface growths named ‘blooms’, which are often associated with the production of toxins. Within cyanotoxins, saxitoxin (STX) and its analogues have gained some prominence, since their occurrence in freshwater bodies represents a worldwide phenomenon with an increasing number of cases in the last ten years.

Saxitoxins are a group of carbamate alkaloid that are known to inhibit the sodium ion channels affecting the nervous system in vertebrates, which cause severe paralyses with respiratory failure ultimately ending in death. They are produced by a unique biosynthetic pathway, where the cluster *sxt* is responsible for encoding proteins that allow the synthesis and export of STXs. The presence of these toxins in water bodies represents a significant threat to human health, ecosystems stability and economy all over the world. Given these concerns, several environmental factors have attracted attention due to their potential impact on bloom formation and in the production of STXs. Many laboratory studies have shown that various environmental factors affect STXs synthesis in different ways. In the current context of global warming, where the average water temperatures are rising, many cyanobacteria are expanding their geographical distribution, especially STXs-producing species. It becomes therefore imperative to understand how temperature can influence the growth of STXs-producing cyanobacteria and their synthesis. Moreover, the effects of temperature on the transcription levels of genes belonging to the *sxt* cluster are poorly understood, being currently only described in one species.

The aim of this study was to assess the influence of three different temperatures (10, 20 and 30 °C) on STXs production and transportation during the several growth phases, in two strains producers of STXs, *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 and *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31, isolated from Portuguese freshwaters. The goal was to establish a relationship between several parameters such as growth, STXs production, production of specialized cells (heterocytes and akinetes) and expression levels of genes that allow synthesis (*sxtA*) and transport of SXTs (*sxtM* and *sxtPer*) in these two strains.

The results obtained allowed to establish a relation between the growth rates and the temperature in both strains. Specifically, the growth rate was lower in the cultures that grew at 10 °C and higher at 20 °C. None of the two isolates grew at 30 °C. At 20 °C, *C. issatschenkoi* LMECYA31 produced twice the amount of total STXs (toxin quota cell) throughout the growth stages when compared to the *A. gracile* LMECYA40. In both species the highest STXs production occurred in the final exponential phase at the temperature of 20 °C.

In *A. gracile* LMECYA40, the formation of a large number of heterocytes occurred in the phases preceding a higher production of total SXTs. Akinetes production was detected in both strains at 10 °C. In the case of *C. issatschenkoi* LMECYA31, the formation of akinetes with large volume was coincident with a lower production of STXs.

The expression levels of *sxtM* and *sxtPer* genes were influenced by temperature and growth phase in both strains. Overall, the data obtained suggest an over-regulation of these genes at 10 °C which was accompanied by an increase in total STXs. This may imply a higher concentration of extracellular STXs. On the other hand, the highest gene expression occurred in the late growth phases (exponential and stationary).

Therefore, it can be concluded that the temperature influenced all the parameters analyzed, although affecting differently the strains *A. gracile* LMECYA40 and *C. issatschenkoi* LMECYA31. The results obtained in this study may be incorporated into predictive models or employed in the development of new monitoring techniques to manage bloom development and STX production, thus minimizing potential risks for humans and animals.

Keywords: *Aphanizomenon gracile*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, Saxitoxin, Temperature, RT-real-time-PCR, Heterocytes, Akinetes

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract	iv
Índice geral.....	vi
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1 - Classificação, origem e <i>habitats</i> de cianobactérias.....	1
1.2 - <i>Blooms</i> cianobacterianos: características e fatores ambientais que influenciam a sua ocorrência..	2
1.3 - Cianotoxinas: produção e o impacto na saúde humana e animal	3
1.4 - STX e seus análogos: <i>cluster</i> de genes <i>sxt</i> e via biossintética.....	5
1.5 - Influência de fatores ambientais na síntese de STXs e na sua regulação génica	9
1.6 - Relação entre formação de células especializadas, temperatura e produção de STXs.....	15
2. Objetivos	17
3. Materiais e métodos.....	18
3.1 - Origem, caracterização e manutenção de culturas de cianobactérias.....	18
3.2 - Condições experimentais de incubação e plano de amostragem.....	18
3.3 - Cálculo da taxa de crescimento e tempo de duplicação	20
3.4 - Contagem celular	20
3.5 - Contagem de heterócitos	21
3.6 - Morfometria dos acinetos.....	21
3.7 - Quantificação de STXs	21
3.8 - Extração de ácidos nucleicos	22
3.8.1- Extração de <i>DNA</i>	22
3.8.2- Extração e purificação de <i>RNA</i>	22
3.9 - Seleção dos genes-alvo e de referência, respetivos <i>primers</i> e sua especificidade	23
3.9.1 - Descrição dos genes-alvo e de referência	23
3.9.2 - Descrição dos <i>primers</i> usados.....	24
3.9.3 - Testes de especificidade.....	24
3.10 - Quantificação da expressão génica	25
3.10.1 - Determinação dos parâmetros ótimos das retas padrão em <i>RT-real-time-qPCR</i>	25
3.10.2 - Ensaio de <i>RT-real-time-qPCR</i>	25
3.10.3 - Quantificação relativa da expressão génica	26

3.11 - Análise estatística.....	26
4. Resultados	28
4.1 - Definição dos pontos de análise.....	28
4.2 - Efeito da temperatura nas curvas de crescimento e morfologia das culturas de <i>A. gracile</i> LMECYA40 e <i>C. issatschenkoi</i> LMECYA31.....	28
4.2.1 - Avaliação dos efeitos da temperatura de 30 °C	28
4.2.2 - Avaliação dos efeitos das temperaturas de 10 e 20 °C.....	30
4.2.3 - Avaliação dos parâmetros de crescimento	32
4.3 - Variação temporal da concentração celular e da concentração de STXs.....	33
4.3.1 - Avaliação da concentração celular ao longo do tempo	33
4.3.2 - Avaliação da relação entre a concentração celular e a concentração de STXs totais ao longo do tempo.....	34
4.4 - Avaliação do número de heterócitos ao longo do tempo e relação com a concentração de STXs.....	37
4.4.1 - Produção de heterócitos ao longo do tempo.....	37
4.4.2 - Relação entre o número total de heterócitos e a concentração de STXs totais ao longo do tempo.....	38
4.5 - Avaliação da morfometria dos acinetos ao longo do tempo e relação com a concentração de STXs.....	40
4.5.1 - Morfometria dos acinetos ao longo do tempo.....	40
4.5.2 - Relação entre o volume celular de acinetos e a concentração de STXs totais ao longo do tempo.....	41
4.6 - Avaliação dos resultados de <i>RT-real-time-qPCR</i>	42
4.6.1 - Parâmetros das reações de <i>RT-real-time-qPCR</i>	42
4.6.2 - Verificação da estabilidade do gene de referência (<i>rRNA 16S</i>)	43
4.6.3 - Efeito da temperatura na expressão de genes pertencentes ao <i>cluster sxt: sxtA, sxtM e sxtPer</i>	44
4.6.4 - Avaliação da relação entre a expressão dos genes <i>sxtM e sxtPer</i> e a concentração de STXs totais	47
5. Discussão.....	49
5.1 - Seleção das temperaturas em estudo.....	49
5.2 - Efeito da temperatura nas curvas de crescimento e na morfologia	50
5.3 - Efeito da temperatura nas concentrações celulares e produção de STXs.....	51
5.4 - Efeito da temperatura na formação de células especializadas e a sua relação com a concentração de STXs.....	52
5.4.1 - Relação entre a formação de heterócitos e concentração de STXs	52
5.4.2 - Relação entre a formação de acinetos e concentração de STXs.....	54
5.5 - Ensaio de <i>RT-real-time-PCR</i> e relação com a concentração de STXs	55
6. Conclusões	58
7. Perspetivas futuras.....	60

8. Referências	61
9. Anexos.....	69
Anexo I.....	69
Anexo II.....	70
Anexo III	73
Anexo IV	74
Anexo V	75
Anexo VI.....	76

Índice de figuras

Figura 1.1 - Exemplo de <i>blooms</i> em sistemas aquáticos.....	1
Figura 1.2 - Estrutura química da STX.....	6
Figura 1.3 - Representação esquemática dos <i>clusters</i> de genes <i>sxt</i> de cinco espécies de cianobactérias produtoras de STXs.....	7
Figura 1.4 - Via biossintética das STXs.....	8
Figura 1.5 - Distribuição geográfica das espécies <i>Aphanizomenon gracile</i> e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	9
Figura 3.1 - Fotografias das cianobactérias em estudo da coleção ESSACC: <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31.....	18
Figura 3.2 - Representação esquemática dos pontos de análise estabelecidos ao longo do crescimento cianobacteriano.....	19
Figura 3.3 - Representação esquemática das condições de cultura iniciais das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 sob as diferentes temperaturas testadas.....	19
Figura 3.4 - Representação esquemática do processo de contagem celular.....	21
Figura 4.1 - Curvas de crescimento de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 à temperatura de 20 °C.....	28
Figura 4.2 - Curvas de crescimento de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 à temperatura de 30 °C.....	29
Figura 4.3 - Fotografias que apresentam os aspetos macroscópicos e microscópicos das culturas <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 expostas às temperaturas de 20 e 30 °C.....	29
Figura 4.4 - Curvas de crescimento de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 às duas temperaturas em estudo (10 e 20 °C).....	31
Figura 4.5 - Fotografias que representam os aspetos macroscópicos das culturas expostas às temperaturas de 10 e 20 °C.....	32
Figura 4.6 - Concentrações celulares de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 às duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento.....	33
Figura 4.7 - Concentrações celulares de <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 às duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento.....	34
Figura 4.8 - Relação entre a concentração celular e a concentração de STX total produzida pelas estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento.....	35
Figura 4.9 - Concentração de STXs por célula produzida nas culturas de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento.....	36
Figura 4.10 - Heterócitos de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e de <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31.....	37
Figura 4.11 - Parâmetros que representam a evolução da produção de heterócitos nas espécies <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31.....	38
Figura 4.12 - Relação entre o número de heterócitos e a concentração de STXs totais produzida pelas estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento.....	39

Figura 4.13 - Acinetos livres de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e um filamento com acineto de <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31.....	40
Figura 4.14 - Caracterização morfológica de acinetos nas culturas de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 expostas à temperatura de 10 °C.....	41
Figura 4.15 –Relação entre o volume de acinetos e concentração de STXs totais nas culturas de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 ao longo das quatro fases de crescimento.....	42
Figura 4.16 - Estabilidade do gene de referência (<i>rRNA 16S</i>) para as estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 sob as duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento.....	44
Figura 4.17 - Expressão relativa dos genes <i>sxtM</i> e <i>sxtPer</i> em <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 durante o crescimento a 10 e 20 °C, usando como condição controle o nível de expressão a temperatura 20 °C (Expressão = 1).....	45
Figura 4.18 - Expressão relativa dos genes <i>sxtM</i> e <i>sxtPer</i> em <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 durante o crescimento a 10 e 20 °C, usando como condição controle o nível de expressão na fase de adaptação (Expressão = 1)	46
Figura 4.19 - Relação entre a concentração de STXs e os níveis de expressão dos genes <i>sxtM</i> e <i>sxtPer</i> ao longo do tempo.....	47
Figura 4.20 - Relação entre a concentração de STXs e os níveis de expressão dos genes <i>sxtM</i> e <i>sxtPer</i> a 10 °C.....	48

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Fatores ambientais que têm influência na produção de STXs totais em diferentes espécies de cianobactérias e que fase do crescimento cianobacteriano associada.....	12
Tabela 1.2 - Estudos realizados sobre a influência de fatores ambientais nos níveis de expressão de genes pertencentes ao <i>cluster sxt</i> (<i>sxtA</i> , <i>sxtM</i> e <i>sxtPer</i>) em diferentes espécies de cianobactérias.....	14
Tabela 1.3 - Espécies de cianobactérias e temperaturas que induziram a formação de acinetos.....	16
Tabela 3.1 - Descrição da função dos genes-alvo (<i>sxtA</i> , <i>sxtM</i> e <i>sxtPer</i>) e do gene de referência (<i>rRNA 16S</i>).....	24
Tabela 3.2 - Genes em estudo, respectivos <i>primers</i> , e as suas sequências de nucleótidos e tamanho do fragmento amplificado (<i>bp</i>).....	24
Tabela 4.1 - Parâmetros de crescimento de <i>Aphanizomenon gracile</i> LMECYA40 e <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> LMECYA31 sob as duas condições de temperatura (10 e 20 °C).....	32
Tabela 4.2 - Dados relativos aos parâmetros de validação, de cada gene em estudo, obtidos a partir das retas-padrão realizadas nos ensaios de <i>RT-real-time-qPCR</i>	43

Lista de abreviaturas

CO₂ - Dióxido de carbono
Ct - *Threshold cycle*
dcGTXs - Goniautoxinas descarboxiladas
dcneoSTXs - Neosaxitoxinas descarboxiladas
dcSTX – Saxitoxinas descarboxiladas
DMT - *Drug/Metabolite Transporter*
DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DO - Densidade ótica
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ESSACC - Coleção de Culturas de Cianobactérias Estela Sousa e Silva
Fe - Ferro
GTXs – Goniautoxinas
HRP - *horseradish peroxidase*
MATE - *Multidrug And Toxic Compound Extrusion*
mRNA - RNA mensageiro
N₂ - Nitrogénio
NeoSTX - Neosaxitoxinas
O₂ - Oxigénio
P - Fósforo
PST - *Paralytic Shellfish Toxins*
PSP - *Paralytic Shellfish Poisoning*
PKS - *Polyketide Synthase*
PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
ROS – Espécies reativas ao oxigénio (*Reactive oxygen species*)
RNA - *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
RT-real-time-qPCR - *Reverse Transcription Real-Time Quantitative PCR*
rRNA - RNA ribossomal
STXs - Saxitoxinas
UV - Ultravioleta

1. Introdução

1.1 - Classificação, origem e *habitats* de cianobactérias

As cianobactérias são seres procariotas autotróficos e possuem uma parede celular do tipo gram-negativa, apesar da camada peptidoglicana ser consideravelmente mais espessa que nos organismos gram-negativo típicos (Castenholz & Envelope, 2015) .

Como seres fotossintéticos produzem vários pigmentos como clorofila *a*, ficobilina, ficocianina e ficoeritrina (Whitton & Potts, 2012). A presença destes pigmentos em cianobactérias confere vantagens na realização de fotossíntese e permite que exibam uma impressionante gama de cores e de vários tons, entre os quais o verde, vermelho, castanho, amarelo e rosa (Huisman *et al.*, 2018). As cianobactérias apresentam diversas morfologias, apresentando formas filamentosas, unicelulares ou coloniais (Gupta *et al.*, 2013). Por vezes ocorrem associadas a diversos organismos eucarióticos estabelecendo uma relação simbiótica com plantas, fungos e protistas (Gupta *et al.*, 2013).

Estima-se que as cianobactérias tenham aparecido na Terra há cerca de 3500 milhões de anos atrás durante o Pré-Câmbrico (Gupta *et al.*, 2013). A sua proliferação e o resultado da sua atividade fotossintética contribuíram de forma significativa para o enriquecimento de oxigénio (O₂) na atmosfera e consequente evolução da vida animal e vegetal mais complexa (Paerl & Paul, 2012).

Tendo em conta a longa história evolutiva das cianobactérias infere-se que estas foram expostas a grandes mudanças geoquímicas e climáticas, como longos períodos frios ou quentes, vulcanismo e mudanças na radiação solar, que possibilitaram a formação da Terra tal como a conhecemos hoje (Paerl *et al.*, 2001, 2018). Perante a superação destas condições e a sua sobrevivência, as cianobactérias desenvolveram diversas estratégias adaptativas e ecofisiológicas de tal forma eficazes que lhes facultaram a capacidade de colonizar vários tipos de *habitats* e resistir a condições ambientais extremas. Observa-se a sua presença em todos os *habitats* terrestres, incluindo rochas de desertos onde são expostas a grandes amplitudes térmicas, ou no outro extremo em solos antárticos (Paerl & Paul, 2012; Rindi, 2007). Também se desenvolvem em diferentes tipos de *habitats* aquáticos, quer em águas marinhas, doces ou salobras, com diversas condições de temperatura ou pH (águas quentes, frias, alcalinas ou ácidas) (Gupta *et al.*, 2013).

Na maior parte dos corpos de água existe uma relação entre os fatores bióticos, físicos e químicos que determinam a grande diversidade de fitoplâncton e o seu desenvolvimento proporcional (Paerl *et al.*, 2001). No entanto, em determinadas condições ambientais, favoráveis para as cianobactérias, ocorre um desequilíbrio do ecossistema estas são capazes de atingir elevadas concentrações celulares formando *blooms* (Figura 1.1).



Figura 1.1 – Exemplos de *blooms* em sistemas aquáticos (Fotografias de Carina Menezes, 2012).

1.2 - *Blooms* cianobacterianos: características e fatores ambientais que influenciam a sua ocorrência

Atualmente, muitos estudos demonstram que os *blooms* cianobacterianos estão a aumentar na sua frequência e disseminação global na maior parte dos sistemas aquáticos (Huisman *et al.*, 2018). Um *bloom* cianobacteriano é um fenómeno geralmente caracterizado pela grande produção de biomassa num curto período de tempo e está correlacionado com uma diminuição da diversidade fitoplanctónica (Merel *et al.*, 2013). É descrito como sendo visível a olho nu nos corpos de água, podendo ser composto por uma ou várias espécies dominantes de cianobactérias (Christoffersen *et al.*, 2002). Os *blooms* cianobacterianos são frequentemente constituídos pelos géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* e *Trichodesmium* (Huisman *et al.*, 2018).

A maioria destes géneros possuem acinetos que possibilitam a sobrevivência a condições adversas (Cirés *et al.*, 2013a), pigmentos acessórios fotoprotetores (Paerl, 2018) e compostos absorventes de radiações UV (ultravioleta) que lhes permite a sobrevivência perante condições de radiações extremas (Paerl & Paul, 2012). Têm também vesículas gasosas que permitem alterar a sua posição na coluna de água, otimizando assim o acesso à luz e nutrientes (Huisman *et al.*, 2018). Alguns deles possuem heterócitos que lhes permitem fixar diretamente o nitrogénio atmosférico (N₂) podendo assim ultrapassar situações onde há uma limitação deste nutriente (Gupta *et al.*, 2013; Paerl, 2018).

Ao longo dos últimos séculos tem-se assistido a uma intensificação de fatores ambientais como a temperatura, a precipitação, o pH e a concentração de nutrientes principalmente devido à ação do Homem (Paerl & Paul, 2012). Para além das estratégias de adaptação descritas anteriormente, a alteração dos padrões destes fatores tem sido descrita como a grande responsável pela expansão global das cianobactérias, promovendo o aumento da sua frequência e permanência ao longo do tempo em muitos dos sistemas aquáticos em todo o mundo (Corbel *et al.*, 2014; Huisman *et al.*, 2018; O'Neil *et al.*, 2012; Paerl & Huisman, 2009).

As alterações climáticas, em especial o aquecimento global em associação com a alteração dos padrões de precipitação, afetam fortemente a taxa de crescimento e a formação de alguns *blooms* cianobacterianos (Paerl, 2018; Paerl & Paul, 2012). As altas temperaturas promovem o crescimento da maioria das cianobactérias uma vez que as suas taxas de crescimento são ótimas a temperaturas acima dos 25 °C (Mehnert *et al.*, 2010), ao contrário do que acontece com os organismos fitoplanctónicos eucarióticos, cuja temperatura ótima é inferior (tipicamente entre 15-25 °C) (Paerl & Paul, 2012).

Elevadas temperaturas também afetam os processos físico-químicos dos sistemas aquáticos. Neste contexto verifica-se uma estratificação vertical acentuada das massas de água com profundidade e uma diminuição da viscosidade da água (Paerl & Huisman, 2009). Ambas as condições serão ideais para as cianobactérias flutuarem, recorrendo às suas vesículas gasosas, e se deslocarem para a superfície dos corpos de água. Nesta nova posição obtêm elevados níveis de radiação otimizando as suas necessidades fotossintéticas (Paerl & Paul, 2012).

O conceito de alterações climáticas também está associado a mudanças nos padrões de intensidade e duração de precipitação e sucessivas secas prolongadas. Apesar das tempestades serem prejudiciais para a formação de *blooms* cianobacterianos, por impedirem que ocorra uma estratificação vertical das massas de água, a longo prazo esse mesmo efeito torna-se benéfico. Tais movimentos de água enriquecem os corpos de água, e se estes eventos forem seguidos por longos períodos de seca, estas águas eutróficas reúnem as condições ideais para a proliferação das cianobactérias (Huisman *et al.*, 2018; Paerl & Huisman, 2009; Paerl & Paul, 2012). O aumento do *input* de nutrientes nos ambientes aquáticos (particularmente de N₂ e fósforo - P) de origem

antropogénica provenientes de atividades como a agricultura, a indústria e o desenvolvimento urbano também promovem a eutrofização das águas (Paerl & Huisman, 2009).

Perante todas estas condições, as cianobactérias competem de forma mais eficiente face a organismos fitoplanctónicos eucarióticos estabelecendo a sua dominância (Paerl & Huisman, 2009). Os *blooms* cianobacterianos não são potenciados apenas por um único fator ambiental, mas sim por múltiplos fatores que ocorrem simultaneamente (O’Neil *et al.*, 2012), estabelecendo-se uma relação sinérgica entre todos eles (Paerl & Paul, 2012).

O desenvolvimento dos *blooms* cianobacterianos aumenta a turbidez da água impossibilitando a penetração da luz nas zonas mais profundas dos ecossistemas aquáticos. Este facto suprime o crescimento de macrófitas e de microalgas benthicas aquáticas importantes para o estabelecimento da flora e fauna sub-aquáticas (Paerl & Paul, 2012). Por outro lado, a própria senescência dos *blooms* induz uma situação de hipoxia e de anoxia, devido à atividade microbiana. Como efeito, induz a morte de peixes e invertebrados benthicos (Huisman *et al.*, 2018).

Para além de afetar todo o ecossistema aquático, a ocorrência de *blooms* também tem sido associada a perdas económicas (O’Neil *et al.*, 2012). A alteração das características organolépticas da água (Fernandes *et al.*, 2009) tem impacto negativo na qualidade da água para consumo humano e custos acrescidos no seu tratamento e monitorização (Merel *et al.*, 2013), bem como impacto negativo nas atividades de lazer e turismo (El-Shehawey *et al.*, 2012).

O impacto mais significativo dos *blooms*, a nível ambiental, económico e de saúde pública deve-se ao facto de muitas espécies de cianobactérias produzirem toxinas, sendo estas designadas por cianotoxinas (Mantzouki *et al.*, 2018; Merel *et al.*, 2013)

1.3 - Cianotoxinas: produção e o impacto na saúde humana e animal

As cianotoxinas afetam bactérias, protozoários, zooplâncton, peixes, aves e mamíferos, incluindo os humanos (Holland & Kinnear, 2013; Huisman *et al.*, 2018). Foi descrito que as cianotoxinas são ativamente produzidas durante o crescimento cianobacteriano e mantidas dentro das células (Chorus & Bartram, 1999). A excreção das toxinas para o exterior das células ocorre maioritariamente na fase de senescência celular. Isto significa que nas primeiras fases do crescimento a concentração de toxina é mais elevada a nível intracelular contrariamente ao que se verifica nas fases estacionária e de senescência, onde a concentração de toxina é mais elevada no meio extracelular (Chorus & Bartram, 1999).

A sua função não está completamente conhecida, mas existem várias suposições. Coloca-se a hipótese de que a toxicidade providencia uma vantagem ecológica às estirpes tóxicas comparativamente às não tóxicas (Pearson *et al.*, 2016) sendo útil para a proteção contra os predadores (Huisman *et al.*, 2018) ou para ganhar vantagem competitiva face a outras espécies de cianobactérias (Holland & Kinnear, 2013). Estudos recentes demonstram uma possível relação entre as cianotoxinas e o metabolismo primário celular, como por exemplo a sua participação na sinalização celular (*quorum sensing*), na absorção de nutrientes, na manutenção da homeostase e na proteção contra o *stress* oxidativo (Holland & Kinnear, 2013).

O grupo das cianotoxinas inclui mais de 100 compostos que diferem entre si ao nível da estrutura química e das propriedades toxicológicas (Merel *et al.*, 2013). As cianotoxinas dividem-se em quatro grandes grupos, cada um deles definido em função do órgão-alvo principal e consequentes sintomas que produzem nos animais (Chorus & Bartram, 1999). Um dos grupos inclui as citotoxinas que têm a capacidade de danificar especificamente alguns tipos de células. Neste grupo inclui-se a cilindrospermopsina que é um inibidor da síntese proteica em mamíferos (Corbel *et al.*, 2014). As dermatotoxinas são toxinas que induzem reações alérgicas na pele dos seres vivos, e incluem a aplisiatoxina e a lingbiatoxina (Merel *et al.*, 2013). As hepatotoxinas têm

como órgão-alvo o fígado, podendo levar à morte de animais e humanos, quer por choque hipovolêmico (isto é, diminuição do fluxo sanguíneo), quer por insuficiência hepática (Carmichael, 1992, 1994). Neste grupo encontram-se as microcistinas, nodularinas e, novamente a cilindrospermopsina (Pearson *et al.*, 2016). As neurotoxinas interferem com o funcionamento do sistema nervoso induzindo paralisia muscular, designadamente dos músculos respiratórios. Neste grupo incluem-se as toxinas PST [*paralytic shellfish toxins*, onde se encontra a saxitoxina (STX) e os seus análogos], anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(S) e a β -metilamino-L-alanina (Chorus & Bartram, 1999).

Atualmente, as cianotoxinas são um problema crescente a nível ambiental e de saúde pública uma vez que têm sido associadas a numerosos envenenamentos quer de animais (aquáticos, selvagens e domésticos) quer de humanos (Chorus & Bartram, 1999; Merel *et al.*, 2013). Já foram reportados casos de intoxicação humana na América do Norte e do Sul, África, Oceânia e Europa (Chorus & Bartram, 1999). Existem quatro possíveis vias de exposição humana a estes metabolitos: 1) a ingestão de alimentos contaminados, especialmente de marisco contaminado com cianotoxinas, uma vez que estes organismos possuem a capacidade de filtrar a água e acumular as toxinas no seu interior; 2) através de contacto dérmico e ingestão/inalação de águas contaminadas e respetivos aerossóis durante atividades recreativas; 3) ingestão de água inadequadamente tratada (Merel *et al.*, 2013) uma vez que, em casos onde os *blooms* cianobacterianos são intensos, os processos de tratamento podem ser inadequados e as toxinas mantêm-se presentes nos reservatórios de água tratada (Carmichael, 2001); 4) por último, a via parentérica, sendo o caso mais conhecido o que ocorreu no Brasil, no centro de diálise de Caruaru, onde 70 pacientes morreram devido à presença de cianotoxinas nas águas de hemodiálise (Carmichael, 2001).

Considera-se que, a nível mundial, aproximadamente 75% dos *blooms* são constituídos por espécies tóxicas (Wejnerowski *et al.*, 2018). Estes *blooms* são constituídos por géneros fixadores de N₂ tais como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium* e géneros não fixadores de N₂, como *Microcystis* e *Planktothrix* (Paerl & Paul, 2012).

A produção de cianotoxinas a partir destes *blooms* é muito variável no espaço e no tempo (Huisman *et al.*, 2018). Os *blooms* cianobacterianos nem sempre estão associados à ocorrência de toxinas, uma vez que nem todas as espécies daqueles géneros são tóxicas (Merel *et al.*, 2013). Para além disso, sabe-se que os *blooms* tóxicos podem ser formados por estirpes tóxicas e não tóxicas pertencentes à mesma espécie ou a espécies diferentes. Assim sendo, mesmo que se identifique uma determinada espécie não tóxica num *bloom*, este pode ser tóxico se também existirem estirpes tóxicas dessa mesma espécie (Carmichael, 2001). Por outro lado, a presença de estirpes tóxicas não significa obrigatoriamente que as cianobactérias estejam sempre a produzir toxinas, uma vez que se constatou que têm a possibilidade de ativar ou desativar determinados genes responsáveis pela síntese da toxina dependendo das condições ambientais (Merel *et al.*, 2013).

Muitos estudos laboratoriais têm mostrado que vários fatores ambientais afetam de diferentes formas a síntese de cianotoxinas (Huisman *et al.*, 2018). No entanto, a falta de consistência nos resultados experimentais tem dificultado uma compreensão acerca da forma como estes dois parâmetros se interligam (Mantzouki *et al.*, 2018). O mesmo se verifica ao nível molecular, pois os conhecimentos sobre os fatores ambientais que controlam a expressão dos genes responsáveis pela síntese das cianotoxinas, em estirpes tóxicas, continuam a ser escassos e controversos (Mantzouki *et al.*, 2018; Merel *et al.*, 2013). Estas informações seriam úteis não só no sentido de compreender a ecologia e biologia das diferentes espécies de cianobactérias, mas também providenciaria conhecimentos sobre quais as melhores formas de prever e de gerir os

blooms tóxicos nos sistemas de água doce (Holland & Kinnear, 2013), permitindo assim minimizar os riscos para a saúde associados às cianotoxinas (Brentano *et al.*, 2016).

Deste modo, é necessário realizar-se mais estudos sobre os fatores ambientais que causam a produção de cianotoxinas ao nível de cada estirpe tóxica (Merel *et al.*, 2013). Poucos estudos têm sido realizados sobre a forma como a produção de anatoxinas, STXs e citotoxinas e de que forma a sua produção é afetada pelas condições ambientais (Visser *et al.*, 2016). De destacar, que a ocorrência de STXs nos corpos de água doce representa um fenómeno mundial com um número crescente de casos nos últimos dez anos (Cirés *et al.*, 2017).

1.4 - STX e seus análogos: *cluster* de genes *sxt* e via biossintética

A STX e os seus 57 análogos (STXs), também conhecidas como PSTs (Cirés *et al.*, 2017), são substâncias alcalóides neurotóxicas cuja estrutura se baseia numa perhidropurina tricíclica (Casero *et al.*, 2014; Pearson *et al.*, 2010, 2016; Wiese *et al.*, 2010). Estes análogos surgem devido à variação que ocorre nos diferentes grupos funcionais em quatro locais (R1 – R4) (Figura 1.2) (Pearson *et al.*, 2016; Wiese *et al.*, 2010).

As STXs mais comuns são classificadas como não sulfatadas, como a STX e a neosaxitoxina (neoSTX), mono-sulfatadas, como as goniautoxinas (GTXs 1-6) ou dissulfatadas (C1-4 toxinas) (Pearson *et al.*, 2016; Wiese *et al.*, 2010). Também existem variantes descarboxiladas destes análogos e isto inclui as STXs descarboxiladas (dcSTX, dcneoSTX), as goniautoxinas descarboxiladas (dcGTXs 1-6) e os derivados *13-deoxy-decarbamoyl* (doSTX, doGTX) (Wiese *et al.*, 2010). A toxicidade pode variar drasticamente dependendo do tipo de STXs; as não sulfatadas são as mais tóxicas, seguidas pelas mono-sulfatadas e dissulfatadas (Pearson *et al.*, 2016). São responsáveis pela síndrome PSP (*paralytic shellfish poisoning*) que tipicamente ocorre após a ingestão de moluscos ou de água contaminada com SXTs (Mihali *et al.*, 2009). De entre as STXs, a STX é a mais estudada e uma das toxinas naturais mais potentes (Llewellyn, 2006).

As STXs ligam-se aos canais de sódio nas membranas dos axónios dos neurónios, impedindo a passagem dos iões sódio através da membrana celular (Casero *et al.*, 2014). Como tal, há um bloqueio na transferência dos impulsos nervosos. Esta ação vai resultar numa perturbação na propagação do potencial de ação nas células neuronais (Kellmann *et al.*, 2008). Também se observou que as STXs são capazes de bloquear os canais de cálcio nos miócitos ventriculares de rato, induzindo uma grande diminuição do fluxo de iões de cálcio, comprometendo o processo de contração do coração (Su, 2004). Adicionalmente, as STXs afetam os canais de potássio das células cardíacas, estabilizando a configuração fechada do canal de potássio, bloqueando assim o fluxo de potássio. Tal efeito conduz a uma arritmia cardíaca fatal (Wang *et al.*, 2003).

Os sintomas iniciais, após 30 minutos da ingestão de STXs, incluem um formigueiro nos lábios, na língua e garganta alastrando-se para todo o rosto, transpiração, vômitos e diarreia. Em casos mais extremos verifica-se que o formigueiro atinge o pescoço e as extremidades corporais progredindo para uma fraqueza muscular, perda de coordenação motora e por fim paralisia. Uma dose letal de STXs normalmente resulta numa falha cardiovascular devido à paralisia dos músculos respiratórios (Pearson *et al.*, 2010). Os análogos de STX mais tóxicos exibem um LD₅₀ de 10 Micrograma/Kg depois de serem injetados (i.p.) no murganho (Merel *et al.*, 2010). Atualmente a STX encontra-se classificada como potencial Agente TZ (designação de arma química), devido à sua elevada toxicidade (https://eurobiotox.eu/science_of_toxins/24/index.html). Encontra-se incluída na lista da

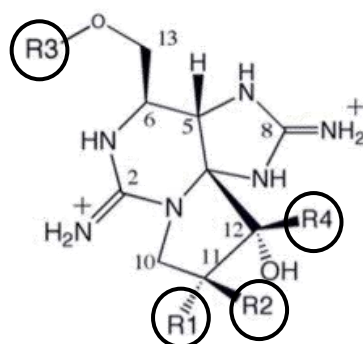


Figura 1.2 - Estrutura química da STX. Os círculos representam os grupos funcionais variáveis (R1 – R4) (imagem adaptada de Mihali *et al.*, 2011).

As STXs são produzidas por organismos pertencentes a dois reinos diferentes, dinoflagelados eucarióticos e cianobactérias procarióticas, aparentemente pela mesma via biossintética (Kellmann *et al.*, 2008). Apesar das STXs serem o segundo grupo de cianotoxinas com mais artigos publicados, a maior parte da literatura referente à produção destas está associada aos dinoflagelados e pouco se encontra descrito no que diz respeito às cianobactérias (Merel *et al.*, 2013). Os *blooms* cianobacterianos produtores de STXs são um fenómeno mundial, e muitos desses *blooms* possuem elevadas concentrações de toxinas, tendo inclusive causado mortes em animais domésticos por consumo de água contaminada (Casero *et al.*, 2014). Até à data não houve nenhuma descrição de intoxicação humana devido à presença de STXs em água doce (van Apeldoorn *et al.*, 2007). No entanto, é importante realçar que para além destas toxinas serem solúveis e estáveis na água, sendo capazes de persistir por mais de 90 dias em água doce, análogos menos tóxicos vão sendo progressivamente degradados em análogos mais tóxicos (Merel *et al.*, 2010).

O *cluster* de genes que é putativamente responsável pela síntese de STX e seus análogos foi identificado em cinco espécies diferentes de cianobactérias (Murray *et al.*, 2011), mais especificamente em *Anabaena circinalis* AWQC131C, *Aphanizomenon gracile* NH-5 (Mihali *et al.*, 2009), *Cylindrospermopsis raciborskii* T3, *Lyngbya wollei* (Mihali *et al.*, 2011) e *Raphidiopsis brookii* D9 (Stucken *et al.*, 2010).

Os *clusters* de genes *sxt* encontrados nestas espécies variam no seu tamanho (25,7 kb a 35 kb) e no seu número de genes (26 a 31) (Cirés *et al.*, 2017). Nas cinco cianobactérias onde este foi caracterizado, existem 14 genes em comum, sendo que os restantes genes *sxt* variam entre as espécies (Ballot *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2011). Relativamente à composição dos genes *sxt* e à sua organização, *A. gracile* NH-5 é mais semelhante *A. circinalis* AWQC131C do que com *C. raciborskii* T3, *R. brookii* D9 e *L. wollei* (Ballot *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016). Isto é justificado devido ao facto de *A. gracile* e *A. circinalis* estarem filogeneticamente mais próximas relativamente às restantes espécies. As diferenças verificadas na composição dos genes poderão explicar diferentes perfis tóxicos (Murray *et al.*, 2011) (Figura 1.3).

Os estudos comparativos entre os *clusters* de genes *sxt* têm sido conduzidas sobretudo a um nível interespecífico, sendo limitadas ao nível intraespecífico em diferentes estirpes (Ballot *et al.*, 2016). Até ao presente, a sequenciação e a caracterização do *cluster* de genes *sxt* noutras espécies produtoras de STXs como *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Cylindrospermum stagnale*,

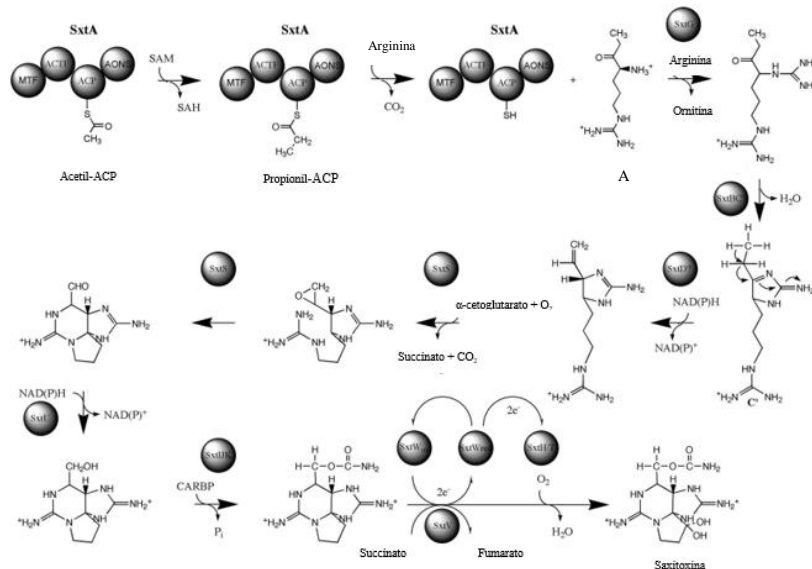


Figura 1.4 - Via biossintética das STXs (esquema adaptado de Kellmann *et al.*, 2008).

O género *Aphanizomenon* tem atraído um grande interesse na comunidade científica (Cirés & Ballot, 2016). Várias espécies pertencentes ao género *Aphanizomenon* têm suscitado uma particular preocupação uma vez que têm sido descritos, em vários países, como responsáveis pela ocorrência de *blooms* tóxicos desde o final do século XIX. São capazes de produzir uma grande variedade de cianotoxinas, entre as quais as STXs (Cirés & Ballot, 2016; Cirés *et al.*, 2017). Adicionalmente, também têm expandido a sua distribuição geográfica, deslocando-se de latitudes tropicais para subtropicais e temperadas. Esta situação ocorre devido ao aumento da temperatura média das águas como consequência do aquecimento global (Cirés *et al.*, 2014, 2017). A Europa tem atraído alguma atenção uma vez que é uma das áreas de transição de uma zona tropical/subtropical para uma zona temperada. Vários estudos têm sido conduzidos na Europa do Norte e Central, mas poucos têm sido dirigidos na Europa do Sul (zona mediterrânea), nomeadamente em Portugal (Cirés *et al.*, 2014).

Em Portugal isolaram-se duas estirpes produtoras de STXs, *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Aphanizomenon issatschenkoi* LMECYA31 provenientes de albufeiras no distrito de Portalegre (Pereira *et al.*, 2000; 2004). A estirpe *Aphanizomenon issatschenkoi* LMECYA31 (Li *et al.*, 2003) é atualmente designada por *Cuspidothrix issatschenkoi*, no seguimento da revisão taxonómica com recurso a técnicas moleculares (Rajaniemi *et al.*, 2005). Por este motivo, alguns artigos que descrevem a ocorrência de *blooms* tóxicos do género *Aphanizomenon* incluem *C. issatschenkoi*, apesar desta atualmente já não pertencer a este género (Cirés & Ballot, 2016).

A presença destas espécies não se restringe exclusivamente a Portugal, apresentando uma ampla distribuição geográfica. *A. gracile* e *C. issatschenkoi* encontram-se dispersos pela Ásia, América do Norte, Europa e Oceânia (Cirés & Ballot, 2016) (Figura 1.5). Dada a importância toxicológica e biogeográfica das espécies *A. gracile* e *C. issatschenkoi*, são necessários estudos moleculares sobre a regulação da síntese e transporte de STXs por fatores ambientais.

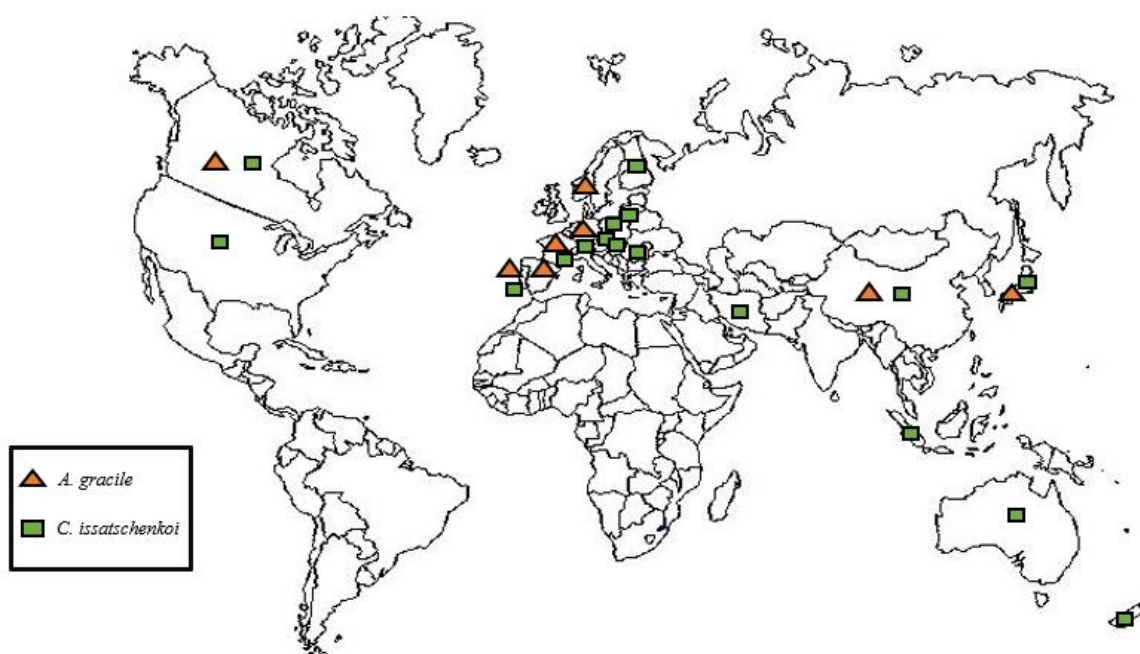


Figura 1.5 – Distribuição geográfica das espécies *Aphanizomenon gracile* e *Cuspidothrix issatschenkoi* (Cirés & Ballot, 2016).

1.5 - Influência de fatores ambientais na síntese de STXs e na sua regulação génica

Estudos laboratoriais documentam que as cianobactérias produzem preferencialmente STXs em condições mais favoráveis para o seu crescimento (Pomati *et al.*, 2004). Vários ensaios experimentais demonstraram relações positivas entre o desenvolvimento de cianobactérias e fatores ambientais como por exemplo a temperatura, pH, intensidade luminosa, concentração de nutrientes e de cloreto de sódio (Brentano *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2010). Todavia, são escassos os estudos realizados no sentido de perceber quais destes fatores têm efeito na produção de STXs e consequente relação com os vários parâmetros de crescimento como consta na tabela 1.1.

No estudo de Dias *et al.* (2002), a produção de STXs duplicou aproximadamente a altas temperaturas (28 °C) em culturas de *Aphanizomenon* sp. LMECYA31 (atualmente reclassificada como *C. issatschenkoi*) face à condição de controlo (22 °C). Verificou-se o contrário em culturas de *A. gracile* UAM529 e *C. raciborskii* C10 cuja maior produção de STXs ocorreu a temperaturas abaixo das temperaturas ótimas de crescimento (a 15 e 19 °C respetivamente) (Casero *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2004). Paralelamente, nestes trabalhos, constatou-se que o aumento de produção de STXs não se correlacionou com o aumento das taxas de crescimento cianobacteriano (Castro *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2002). Em culturas de *C. raciborskii* T3 também se averiguou o efeito da intensidade luminosa, tendo-se observado que a maior produção de STXs ocorreu a 100 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ comparativamente às condições de 50 e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Carneiro *et al.*, 2009).

A concentração de nutrientes, como o P e o N_2 , também é um parâmetro a ter conta no crescimento cianobacteriano (Kaebernick & Neilan, 2001). Relativamente à concentração de N_2 ,

as espécies *C. issatschenkoi* LMECYA31, *A. gracile* UAM531, *R. brookii* FURG001 e *A. circinalis* ANA-118A aumentaram a sua produção de STXs em condições onde as concentrações de N₂ eram baixas ou inclusive nulas (Casero *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2002; Velzeboer *et al.*, 2001; Yunes *et al.*, 2009). Nas culturas *C. issatschenkoi* LMECYA31, a diminuição da concentração de P não se traduziu em diferenças estatisticamente significativas na produção de STXs quando comparada com a condição controlo (Dias *et al.*, 2002). Em culturas de *C. raciborskii* uma elevada razão entre o N₂ e o P (122N:1P) aumentou a produção de STXs, comparativamente a uma razão baixa (7N:1P) ou normal (40N:1P) (Chislock *et al.*, 2014).

Perante diferentes estudos, *C. raciborskii* T3 respondeu da mesma forma ao aumento de concentração de cloreto de sódio (10 mM) refletindo-se num aumento de concentração de STXs (Carneiro *et al.*, 2013; Ongley *et al.*, 2016; Pomati *et al.*, 2004). O mesmo não se verificou nas culturas de *A. circinalis* AWQC131C e *R. brookii* D9 que quando expostas ao stress iónico (10 mM e 17 mM de cloreto de sódio, respetivamente) produziram menores quantidades de STXs (Ongley *et al.*, 2016; Soto-Liebe *et al.*, 2012).

Outros estudos laboratoriais demonstraram que culturas de *C. raciborskii* T3 expostas a um meio de cultura alcalino (pH=9) aumentaram a sua produção de STXs. O efeito contrário ocorreu quando as culturas de *A. circinalis* AWQC131C, sob as mesmas condições de pH, diminuíram a síntese de STXs (Ongley *et al.*, 2016).

Pela tabela 1.1 também se pode verificar que a maior produção de STXs ocorre essencialmente em duas fases do crescimento cianobacteriano: na fase exponencial e na fase estacionária, dependendo do fator ambiental em estudo e da espécie analisada.

Tem sido descrito na literatura que as quantificações de STXs podem ser comprometidas por questões analíticas devido à complexidade química desta toxinas, à sua baixa estabilidade sob a mudança de pH e devido à interconversão de análogos através de processos químicos que ocorrem durante o processo de extração (Casero *et al.*, 2014).

A caracterização do *cluster* de genes *sxt* em diferentes géneros de cianobactérias possibilitou o desenvolvimento de investigações acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na sua regulação (Pearson *et al.*, 2016). Recentemente tem-se recorrido ao método *RT-real-time-qPCR* (*Reverse Transcription-real-time-quantitative PCR*) para estudar a expressão de genes responsáveis pela produção de toxinas em cianobactérias. Informações quantitativas e qualitativas sobre a regulação dos *clusters* de genes ajudam na avaliação da produção de toxinas em resposta a várias condições ambientais (Kaushik & Balasubramanian, 2013). Perante este contexto, é importante estudar o *cluster* de genes *sxt* uma vez que há pouco conhecimento acerca da forma como os seus transcritos são regulados sob diferentes condições ambientais (Boopathi & Ki, 2014; Neilan *et al.*, 2013). Alguns estudos já foram feitos neste sentido como está apresentado na tabela 1.2.

O *cluster* de genes *sxt* inclui o gene *sxtA*, que é o mais conhecido (Casero *et al.*, 2014), sendo o responsável por codificar proteínas que participam no primeiro passo da via biossintética das STXs. Até agora este gene foi encontrado em todas as cianobactérias produtoras de STXs (Figura 1.3). Por todas estas razões, este gene tem sido escolhido para efetuar análises de transcrição e inferir se a sua expressão relativa se correlaciona com o aumento da concentração de STXs (Cirés *et al.*, 2017; Ongley *et al.*, 2016; Stucken *et al.*, 2014).

Para além deste gene que participa na síntese de STXs, é também importante estudar a expressão relativa de genes codificadores de proteínas transportadoras destas toxinas. Inicialmente considerava-se que as STXs eram estritamente endotoxinas, sendo apenas libertadas quando ocorresse a lise celular. As STXs intracelulares acabam por entrar em contacto com os organismos, não só quando ocorre a lise celular, mas também quando estes consomem

cianobactérias tóxicas. Evidências recentes demonstraram que o aumento de STXs no meio extracelular é concomitante à diminuição de toxinas intracelulares. Isto verifica-se nas fases exponenciais do crescimento cianobacteriano, sugerindo uma exportação dessas toxinas para o meio extracelular (Castro *et al.*, 2004; Negri *et al.*, 1997; Soto-Liebe *et al.*, 2013).

Vários estudos referem que as STXs extracelulares podem representar uma grande percentagem da toxina total, como foi observado em culturas de *A. gracile* UAM529/UAM531 (Casero *et al.*, 2014; Cirés *et al.*, 2017), *C. issatschenkoi* LMECYA31 (Dias *et al.*, 2002) e *R. brookii* D9 (Soto-Liebe *et al.*, 2012). As STXs extracelulares que entram em contacto direto com os organismos dos ecossistemas de água doce e com os utilizadores de águas recreativas antes das cianobactérias atingirem a fase estacionária e de morte (onde se inicia a lise celular) (Casero *et al.*, 2014; Cirés *et al.*, 2017). Deste modo, urge a necessidade de perceber que tipo de influência têm os fatores ambientais sobre a expressão relativa dos transportadores de STXs, o que inclui, por exemplo, os genes *sxtM* e *sxtPer*. Até 2016 foram feitos poucos estudos sobre as implicações de fatores ambientais na expressão génica dos genes *sxtA* e *sxtM* e a sua correlação com a concentração de STXs, limitando a sua análise a fatores como a concentração de cloreto de sódio, de N₂ e o pH (Tabela 1.2).

Em Stucken *et al.* (2014) foram testadas diferentes fontes de N₂ (nitrato, amoníaco e ureia) em culturas de *R. brooki* D9, e comparadas com a condição sem qualquer fonte deste nutriente. Verificaram que houve uma maior quantidade de STXs totais e de STXs extracelulares nas condições cujas fontes de nitrogénio eram o nitrato ou ureia, contudo isso nem sempre correspondeu a um maior nível de expressão dos genes *sxtA* e *sxtM* (Stucken *et al.*, 2014).

Ongley *et al.* (2016) observaram que na estirpe *A. circinalis* AWQC131C, o *stress* gerado pelo aumento de concentração de cloreto de sódio (10 mM) e a alteração de pH (=9) induziram a sub-expressão dos transcritos *SxtA* e *SxtM* que se refletiu numa menor concentração de STXs totais, apesar do aumento da concentração de STXs extracelulares. Observaram o contrário em *C. raciborskii* T3 cuja expressão dos mesmos transcritos aumentou em ambas as condições de *stress* iónico e de pH, o que correspondeu a elevados níveis de STXs totais e de STXs extracelulares.

Em Cirés *et al.* (2017), foi descrito pela primeira vez a influência da temperatura na expressão de um gene de síntese (*sxtA*) e em dois genes transportadores (*sxtM* e *sxtPer*) usando culturas de *A. gracile* UAM529. Este trabalho avaliou o efeito de três temperaturas (12, 23 e 30 °C) na expressão relativa dos genes *sxtA*, *sxtM* e *sxtPer* e a sua correlação com a concentração de STXs ao longo de oito dias. Os autores verificaram que ao longo do todo o tempo, os transcritos *SxtA* foram sobre-expressos nas temperaturas de 12 e 30 °C quando comparadas com a condição de controlo (23 °C). Detetou-se uma regulação positiva do gene *sxtA* a 30 °C que coincidiu com maior concentração de STXs totais. O mesmo efeito não observou a 12 °C onde os elevados níveis de expressão corresponderam a uma menor concentração de STX total. Relativamente aos transcritos *SxtM*, em ambas as temperaturas de teste (12 e 30 °C), as culturas de *A. gracile* UAM529 apresentaram um aumento significativo da expressão relativa comparativamente à temperatura de controlo ao longo do tempo. Esta regulação positiva do gene *sxtM* coincidiu com uma maior concentração de STXs extracelulares. No caso de *sxtPer*, o aumento dos níveis de transcritos a 30 °C não foi significativo, e, portanto, não pôde ser evidentemente correlacionado com o drástico aumento de STXs extracelulares.

Tabela 1.1 - Fatores ambientais que têm influência na produção de STXs totais em diferentes espécies de cianobactérias e que fase do crescimento cianobacteriano associada.

Espécie	Estirpe	Fator ambiental	Maior produção de STXs totais	Fase do crescimento onde ocorreu maior produção de STXs	Referência
<i>Anabaena circinalis</i>	AWQC131C	pH 9 vs. Meio de cultura ¹ (controle)	Maior no controle (valor exato não descrito)	Exponencial	Ongley <i>et al.</i> , 2016
		Cloreto de sódio 10 mM vs. Meio de cultura ¹ (controle)	Maior no controle (valor exato não descrito)		
	ANA-1181	Nitrogénio 0,0028 mg/L e 28 mg/L vs. 0,28 mg/L ²	≅ 1,5x maior a 0,0028 mg/L	Estacionária	Velzeboer <i>et al.</i> , 2001
<i>Aphanizomenon gracile</i>	UAM529	Temperatura 12 °C e 30 °C vs. 23 °C ³	≅ 4x maior a 30 °C do que a 23 °C	Exponencial	Cirés <i>et al.</i> , 2017
		15 °C e 20 °C vs. 28 °C ³	Maior a 15 °C do que 20 °C e 28 °C (valor exato não descrito)	NA	Casero <i>et al.</i> , 2014
	UAM531	Nitrogénio Ausência ⁴ vs. Meio de cultura ³ (controle)	4x maior na ausência de nitrogénio	NA	
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	LMECYA31	Temperatura 28 °C vs. 22 °C ⁵	1,6x maior a 28 °C	Estacionária	Dias <i>et al.</i> , 2002
		Nitrogénio Ausência ⁶ vs. Meio de cultura ⁵ (controle)	3,6x maior na ausência de nitrogénio	Exponencial	
		Fósforo 0,10 mg/L e 0,55 mg/L vs. Meio de cultura ⁵ (controle)	NS	Estacionária	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	C10	Temperatura 19 °C vs. 25 °C ⁷	Maior a 19 °C	NA	Castro <i>et al.</i> 2004
	T3	pH 9 vs. Meio de cultura ¹ (controle)	Maior a pH 9 (valor exato não descrito)	Exponencial	Ongley <i>et al.</i> , 2016
		Cloreto de sódio 10 mM vs. Meio de cultura ¹ (controle)	Maior a 10 mM (valor exato não descrito)		
		5 mM e 10 mM vs. Meio de cultura ² (controle)	Maior a 10 mM (valor exato não descrito)	NA	Carneiro <i>et al.</i> , 2013
1 mM, 5 mM, 10 mM vs. Meio de cultura ² (controle)	Maior valor a 10 mM (valor exato não descrito)	NA	Pomati <i>et al.</i> , 2004		

		Intensidade luminosa 100 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ vs. 50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ²	Maior a 100 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (valor exato não descrito)	Estacionária	Carneiro <i>et al.</i> , 2009
	ND	Razão entre nitrogénio e fósforo (N:P) 7N:1P e 122N:1P vs. 40N:1P ⁸	Maior valor na razão 122N:P (valor exato não descrito)	NA	Chislock <i>et al.</i> , 2014
<i>Raphidiopsis brookii</i>	D9	Cloreto de Sódio 17 mM vs. Meio de cultura ⁷ (controlo)	Maior no controlo (valor exato não descrito)	NA	Soto-Liebe <i>et al.</i> , 2012
		Fontes de nitrogénio Nitrato, Amoníaco e Ureia vs. Ausência ⁷	Maiores valores nos meios de cultura com nitrato e amoníaco (valores exatos não descrito)	NA	Stucken <i>et al.</i> 2014
	FURGCY001	Nitrogénio 500 μM , 1000 μM ;1500 μM ²	Maior a 500 μM (valor exato não descrito)	Exponencial	Yunes <i>et al.</i> , 2009

Legenda:¹As culturas foram mantidas em meio *Jaworski* durante o ensaio experimental; ²As culturas foram mantidas em meio ASM-1 durante o ensaio experimental; ³As culturas foram mantidas em meio BG11 durante o ensaio experimental; ⁴As culturas foram mantidas em meio BG11₀ durante o ensaio experimental (corresponde ao meio BG11 sem fonte de nitrogénio); ⁵As culturas foram mantidas em meio Z8 durante o ensaio experimental; ⁶As culturas foram mantidas em meio Z8 sem fonte de NO_3^- durante o ensaio experimental; ⁷As culturas foram mantidas em meio MLA durante o ensaio experimental; ⁸O ensaio experimental decorreu *in situ*; NA – parâmetro não avaliado; NS - diferenças estatisticamente não significativas; ND - Não foi descrito.

Tabela 1.2 - Estudos realizados sobre a influência de fatores ambientais nos níveis de expressão de genes pertencentes ao *cluster sxt* (*sxtA*, *sxtM* e *sxtPer*) em diferentes espécies de cianobactérias.

Espécie	Estirpe	Fator ambiental	Efeitos nos níveis de expressão de genes do <i>cluster sxt</i> ¹			Referência
			<i>sxtA</i>	<i>sxtM</i>	<i>sxtPer</i>	
<i>Anabaena circinalis</i>	AWQC131C	pH 9 vs. Meio de cultura ² (controlo)	Sub-expressão (12x) a pH 9	Sub-expressão (59x) a pH 9	NA	Ongley <i>et al.</i> , 2016
		Cloreto de sódio 10 mM vs. Meio de cultura ² (controlo)	Sub-expressão (1,8x) a 10 mM	Sub-expressão (2,7x) a 10 mM	NA	
<i>Aphanizomenon gracile</i>	UAM529	Temperatura 12 °C e 30 °C vs. 23 °C ³	Sobre-expressão (4.3x) a 30° C Sobre-expressão (5.4x) a 12° C	Sobre-expressão (4,3x) a 30° C Sobre-expressão (3,8x) a 12° C	Sobre-expressão (2,1x) a 30° C NS a 12 °C	Cirés <i>et al.</i> , 2017
		Nitrogénio Ausência ⁴ vs. Meio de cultura ³ (controlo)	NS	NS	NS	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	T3	pH 9 vs. Meio de cultura ² (controlo)	Sobre-expressão a pH 9 (valor exato não descrito)	Sobre-expressão (24x) a pH 9	NP	Ongley <i>et al.</i> , 2016
		Cloreto de sódio 10 mM vs. Meio de cultura ² (controlo)	Sobre-expressão a 10 mM (valor exato não descrito)	Sobre-expressão (2,7x) a 10 mM	NP	
<i>Raphidiopsis brookii</i>	D9	Fontes de nitrogénio Amoníaco ⁵ , Ureia ⁶ , Ausência ⁷ vs. Meio de cultura ⁸ (controlo)	Sobre-expressão no meio de cultura com amoníaco ND no meio de cultura com ureia e ausência de nitrogénio	Sub-expressão no meio de cultura com amoníaco ND no meio de cultura com ureia e ausência de nitrogénio	NP	Chislock <i>et al.</i> , 2014

Legenda: ¹Todos os dados apresentados na tabela são referentes ao momento no qual de detetou maior produção de toxina total e extracelular; ²As culturas foram mantidas em meio *Jaworski* durante o ensaio experimental; ³As culturas foram mantidas em meio BG11 durante o ensaio experimental; ⁴As culturas foram mantidas em meio BG11₀ durante o ensaio experimental (corresponde ao meio BG11 sem fonte de nitrogénio); ⁵As culturas foram mantidas em meio MLA durante o ensaio experimental, mas a fonte de nitrogénio foi modificada de nitrato para amoníaco; ⁶As culturas foram mantidas em meio MLA durante o ensaio experimental, mas a fonte de nitrogénio foi modificada de nitrato para ureia; ⁷As culturas foram mantidas em meio MLA durante o ensaio experimental, mas a fonte de nitrogénio foi retirada; ⁸As culturas foram mantidas em meio MLA durante o ensaio experimental; NA – gene não analisado no respetivo estudo; NS - diferenças estatisticamente não significativas; NP - gene não presente nas espécies referidas; ND – Valores da expressão relativa dos transcritos não detetados.

1.6 - Relação entre formação de células especializadas, temperatura e produção de STXs

Os heterócitos e os acinetos são células especializadas que algumas cianobactérias são capazes de produzir e que providenciam vantagens competitivas relativamente aos organismos fitoplanctônicos eucarióticos (Huisman *et al.*, 2018). Perante determinadas condições ambientais desfavoráveis, as espécies de cianobactérias diazotróficas em estudo, *A. gracile* e *C. issatschenkoi* produzem heterócitos e acinetos.

Os heterócitos têm a capacidade de fixar N₂ proveniente da atmosfera (Huisman *et al.*, 2018), possuindo no seu interior o complexo enzimático nitrogenase, cuja ação é inibida pela presença de oxigénio (Visser *et al.*, 2016). Esta é a razão pela qual surge a necessidade de separar espacialmente o processo fotossintético do processo de captação de N₂ (Huisman *et al.*, 2018). Os heterócitos, para além destas diferenças, também possuem uma parede espessa de glicolípidos que diminui a difusão de O₂ para o interior das células, mantendo um influxo suficiente de N₂ para a fixação do mesmo. Contudo, a camada de glicolípidos não é totalmente impermeável, e, inevitavelmente, o O₂ difunde-se para o interior dos heterócitos, desta forma, é importante que as suas taxas de respiração aumentem para manter as condições de anóxia no seu interior. A baixas temperaturas, a taxa de respiração diminui não tendo, o heterócito, a capacidade de contrariar o influxo de O₂. Assim, as cianobactérias que se encontram em ambientes frios, desenvolveram uma camada glicolípida mais eficiente possibilitando um menor influxo de O₂, mas também de N₂ (Visser *et al.*, 2016). Esta situação traduz-se numa menor produção de biomassa não só porque têm uma menor fixação de N₂, mas também porque a formação da camada glicolípida mais eficaz presumivelmente requererá uma maior energia para ser sintetizada (Stal, 2009; Visser *et al.*, 2016).

Para além disto, o próprio processo de fixação de N₂ é energeticamente dispendioso. Após a fixação deste nutriente, este é reduzido a amoníaco dentro do heterócito e é transferido para as células vegetativas e este fenómeno pode refletir-se numa menor taxa de crescimento (Willis *et al.*, 2015). De acordo com Padisák (1997) a produção de heterócitos ocorre quando há uma deficiência de N₂ no ambiente. No entanto, Bittencourt-Oliveira *et al.* (2012) descreveram outros parâmetros, como a temperatura e intensidade luminosa, que também podem influenciar a sua ocorrência.

A temperatura também é um fator ambiental implicado na diferenciação de acinetos (Cirés *et al.*, 2013b). Os acinetos são células capazes de sobreviver a longos períodos de condições adversas, germinando quando as condições são favoráveis (Cirés *et al.*, 2013b). Possuem uma parede espessa constituída por várias camadas e contêm elevadas quantidades de substâncias de reserva como grânulos de glicogénio (reserva de carbono) e de cianoficina (reserva de N₂) (Sukenic *et al.*, 2015). *A. gracile* e *C. issatschenkoi*, pertencentes à ordem Nostocales, possuem um ciclo anual complexo e produzem acinetos que permitem a sua sobrevivência durante o inverno (Cirés *et al.*, 2013a).

Apesar da importância que a temperatura tem na produção de acinetos, existem poucos estudos no que diz respeito a este tópico (tabela 1.3). Pandey e Kashyap (1987) testaram a influência de duas temperaturas (25 e 30 °C) na estirpe *Anabaena doliolum* AdS. A presença de acinetos foi verificada em ambas as condições, com uma maior frequência a 30 °C. No estudo de Pandey (1989) avaliaram-se três temperaturas (25, 32 e 38 °C) e observou-se a indução da diferenciação de acinetos a 25 e 32 °C. Apesar de não se ter feito uma análise comparativa entre a frequência de acinetos entre as duas temperaturas na espécie *Nodularia spumigena*, a diferenciação de acinetos iniciou mais precocemente a 32 °C (Pandey, 1989). No estudo de Cirés e Wormer (2013b), a estirpe *Aphanizomenon ovalisporum* UAM290 foi estudada a oito temperaturas (10, 15, 20, 25, 27.5, 30, 35 e 40 °C). Apenas se observou a presença de acinetos às temperaturas de 15, 20 e 25 °C sendo que a maior produção foi observada a 20 °C. De uma forma geral, os estudos anteriores referidos parecem demonstrar que existe uma maior produção de acinetos a temperaturas entre os 20 e 35 °C. O contrário foi reportado por Li *et al.* (1997) que avaliaram

o efeito de cinco temperaturas (10, 15, 20, 30, e 35 °C) em sete estirpes de *Anabaena* spp. (*A. mucosa* TAC426; *A. crassa* TAC436; *A. spiroides* TAC443 e TAC444; *A. flos-aquae* TAC446; *A. ucrainica* TAC448 e TAC449) e constataram uma maior produção de acinetos a baixas temperaturas (10 e 15 °C).

Estas diferenças sugerem que o efeito da temperatura na diferenciação de acinetos é específica de espécie para espécie (Cirés *et al.*, 2013b). No entanto, certos estudos demonstraram que independentemente do fator ambiental que esteja a atuar, a formação de acinetos decresce com a diminuição da divisão celular. Deste modo, a sua maior abundância verifica-se durante a fase exponencial do crescimento celular. Durante o desenvolvimento dos acinetos há um aumento considerável no seu tamanho e na sua granulação (Adams & Carr, 1981). Para as espécies *A. gracile* e *C. issatschenkoi* os acinetos podem medir entre 7,8 - 14,7 µm de comprimento e 3,9 - 5,9 µm de largura e 6 - 20 µm de comprimento e 2 - 4,4 µm, de largura, respetivamente (Komárek, 2013).

Tabela 1.3 - Espécies de cianobactérias e temperaturas reportadas que induziram a formação de acinetos.

Espécie	Temperaturas	Referência
<i>Anabaena doliolum</i> AdS	25 e 30 °C	Pandey & Kashyap, 1987
<i>Anabaena</i> spp.	10 °C e 15 °C	Li <i>et al.</i> , 1997
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i> UAM290	15 °C, 20 °C e 25 °C	Cirés <i>et al.</i> , 2013b
<i>Nodularia spumigena</i>	25 °C e 32 °C	Pandey, 1989

Os heterócitos e os acinetos participam na fixação e na acumulação de reservas de N₂, respetivamente, sendo considerados recursos importantes deste nutriente para as cianobactérias. A síntese de STXs está relacionada com a concentração de arginina livre, um aminoácido que apresenta na sua constituição átomos de N₂. Durante a via biossintética destas toxinas, a arginina é recrutada em dois passos (Figura 1.4). No primeiro, a enzima SxtA catalisa a reação de *Claisen* entre a arginina e o produto formado anteriormente (Propionil-ACP), formando o composto A. De seguida, a enzima SxtG transfere o grupo amidina de uma segunda arginina para o composto A (Kellmann *et al.*, 2008). No final de todas as reações ocorre a formação da STX e dos seus análogos, que por serem substâncias alcalóides, as suas moléculas são altamente nitrogenadas (Stucken *et al.*, 2014).

Em dinoflagelados, a privação de N₂ tem sido reportada como uma possível causa responsável pela diminuição das reservas de N₂ intracelulares e, conseqüentemente, da diminuição dos níveis de arginina e síntese das STXs (Flynn *et al.*, 1994). No entanto, isto não se tem verificado no que diz respeito à síntese destas toxinas por cianobactérias, em que a maioria dos estudos revelou que pequenas concentrações de N₂, ou inclusive a sua ausência, promove o aumento destas toxinas. Dias *et al.* (2002) sugeriu que este facto podia ser explicado devido à capacidade que algumas cianobactérias têm de produzir heterócitos, tendo verificado que o aumento de STXs por célula foi acompanhado pelo aumento de frequência de heterócitos. Ainda em Dias *et al.* (2002), as culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31, perante uma condição de *stress* (limitação de P) produziram uma elevada quantidade de acinetos, com correspondente diminuição de STXs por célula. Nesse trabalho foi colocada a hipótese de haver uma menor produção de STXs quando ocorre a produção dos grânulos de cianoficina que fazem parte da constituição dos acinetos. Este facto talvez esteja ligado com uma menor disponibilidade de arginina livre para a síntese de STXs.

Pelo exposto, julgou-se também ser importante neste trabalho tentar perceber qual será o papel e a relação que estes dois tipos de células especializadas (heterócitos e acinetos) têm na síntese de STXs e vice-versa.

2. Objetivos

No atual contexto das alterações climáticas, o efeito do aquecimento global tem induzido um aumento das temperaturas média das águas, possibilitando a expansão geográfica de cianobactérias. Neste contexto, têm particular importância as espécies de cianobactérias produtoras de STXs e o modo como a temperatura pode influenciar o crescimento destas cianobactérias e a síntese de STXs. A nível molecular, os efeitos que a própria temperatura tem sobre os níveis de transcrição de genes pertencentes ao *cluster sxt* encontram-se também pouco elucidados, tendo sido, até agora, descritos apenas numa espécie. Presentemente, as publicações sobre este tema são escassas e os poucos estudos existentes são controversos.

Pretendeu-se neste trabalho contribuir para a elucidação dos pontos acima mencionados, tendo-se estabelecido os seguintes objetivos para esta dissertação:

- Avaliar a influência de três temperaturas diferentes (10, 20 e 30 °C) sobre o crescimento cianobacteriano nas estirpes *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31;
- Avaliar a influência de três temperaturas diferentes (10, 20 e 30 °C) sobre a produção de STXs nas estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 e apurar as respetivas diferenças nos níveis de transcrição de genes do *cluster sxt* (*sxtA*, *sxtM* e *sxtPer*), ao longo do crescimento;
- Averiguar a existência de uma relação entre a produção de STXs e formação de células especializadas (heterócitos e acinetos).

3. Materiais e métodos

3.1 - Origem, caracterização e manutenção de culturas de cianobactérias

Neste trabalho utilizaram-se duas espécies de cianobactérias, isoladas a partir de *blooms* que ocorreram em reservatórios de água doce portugueses, mantidas na Coleção de Culturas de Algas Estela Sousa e Silva (ESSACC) no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em Portugal. A estirpe *A. gracile* LMECYA40 (Figura 3.1 - A) foi isolada da albufeira do Crato, no distrito de Portalegre (Pereira *et al.*, 2004) e a estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31 (Figura 3.1 - B) da albufeira de Montargil (Pereira *et al.*, 2000), ambas no distrito de Portalegre.

As duas cianobactérias em estudo foram previamente identificadas a partir das suas características morfométricas e da sequenciação do gene *rRNA 16S* (Pereira *et al.*, 2004; Rajaniemi *et al.*, 2005).

Estas culturas não axénicas, são mantidas em meio Z8 (Skulberg & Skulberg, 1990) (Anexo I), com um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão, intensidade luminosa de $20 \pm 4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

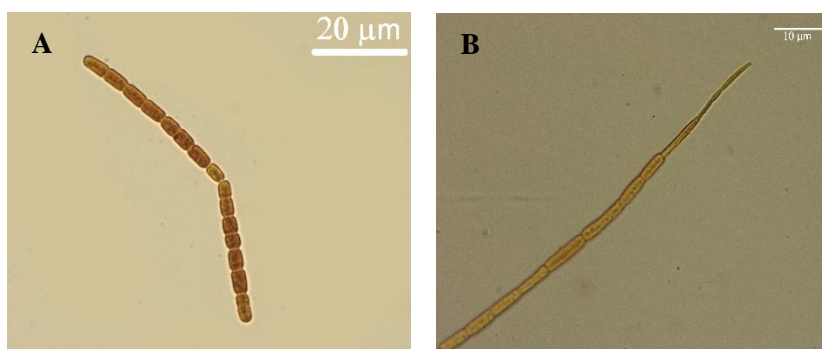


Figura 3.1 - Fotografias das espécies de cianobactérias alvo deste estudo e mantidas na coleção ESSACC: *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B) (amostras fixadas com Lugol).

3.2 - Condições experimentais de incubação e plano de amostragem

Numa primeira fase pretendeu-se estabelecer a curva de crescimento das estirpes em estudo, na situação de controlo (20°C), avaliando-se a sua densidade ótica (DO) a 450 nm. Identificaram-se as fases principais do seu crescimento celular – fase de adaptação, exponencial (inicial e final) e estacionária e determinaram-se as DOs correspondentes.

Para tal, partiu-se de culturas em fase de crescimento exponencial, e iniciou-se cada ensaio com uma $\text{DO} \cong 0,2$, inoculadas em frascos de culturas de 75 cm^2 com meio Z8 estéril num volume final de 100 mL. De seguida, as estirpes foram incubadas na câmara *Fitoclíma S 600*. Retiraram-se alíquotas diárias de 0,6 mL de cada cultura de forma a medir a absorvância em triplicado numa placa de 96 poços, usando o espectrofotómetro (*Multiskan Ascend - Thermo Labsystems*).

Após a construção das curvas de crescimento, e para os ensaios seguintes, selecionaram-se quatro pontos de análise (de acordo com as respetivas DOs) que permitissem abranger as fases do crescimento cianobacteriano descritas acima (Figura 3.2).

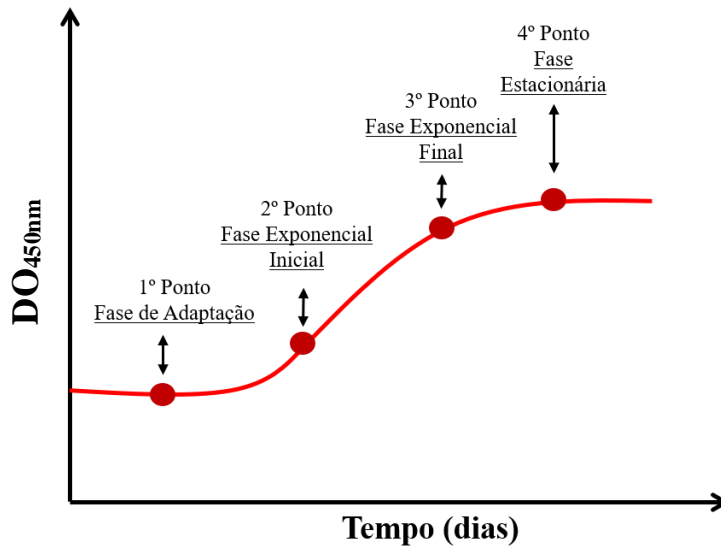


Figura 3.2 - Representação esquemática dos pontos de análise estabelecidos ao longo do crescimento cianobacteriano.

Após o estabelecimento dos pontos de análise, prepararam-se novos *T-flasks* de 75 cm² de cada cultura nas condições descritas no ponto anterior (Figura 3.3 - A). Para cada temperatura prepararam-se dois *T-flasks* de cada espécie de forma a assegurar duas amostras independentes ($n = 2$). Contudo, as amostras independentes nem sempre foram realizadas em simultâneo (Anexo II, tabela VI).

As culturas foram expostas a três temperaturas diferentes (10, 20 e 30 °C) e a uma intensidade de luz constante de 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.3 - B). Os testes das duas primeiras temperaturas (10 e 20 °C) foram realizados na câmara *Fitoclíma S 600* (Figura 3.3 - C), enquanto que a temperatura de 30 °C foi testada primeiramente numa estufa *Haraeus (Thermo Labsystems)*, e uma segunda vez num banho (*Memmert W200*) a 30 °C (Figura 3.3 - D).

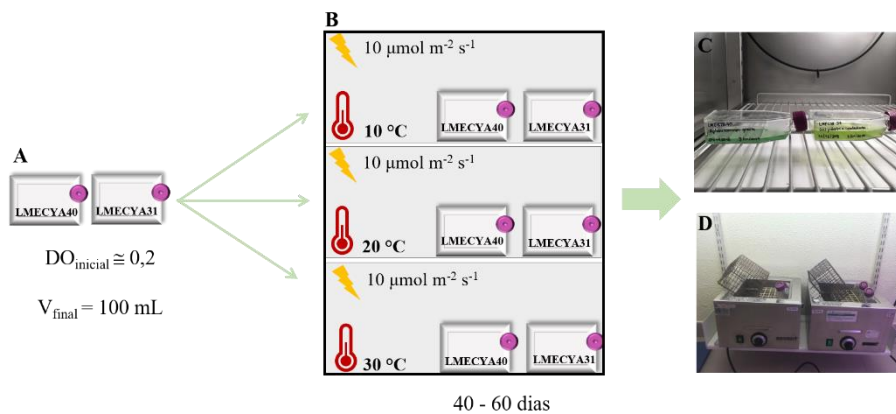


Figura 3.3 - Representação esquemática das condições de incubação das estirpes *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 sob as diferentes temperaturas testadas. (A) Concentração e volume de inóculo inicial; (B) Condições de luz e temperatura durante o crescimento das culturas; (C) Incubação a 10 e 20 °C na câmara *Fitoclíma*; (D) Incubação num banho a 30 °C.

Em cada temperatura, para cada estirpe recolheram-se de dois em dois dias alíquotas de 0,6 mL para determinar a DO espectrofotometricamente a 450 nm. Construíram-se as respetivas curvas de crescimento a cada temperatura. Quando a DO igualava o valor que foi estabelecido para cada fase de crescimento recolheram-se alíquotas com um volume total de 11,5 mL de cultura para extrair *RNA*, quantificar as STXs, efetuar contagens celulares (células vegetativas e de heterócitos) e por fim analisar a morfometria dos acinetos.

3.3 - Cálculo da taxa de crescimento e tempo de duplicação

De forma a avaliar o crescimento utilizaram-se dois parâmetros: a taxa de crescimento específica (μ_g) e o tempo de duplicação (t_D)¹. Primeiramente, elaborou-se um gráfico com os valores de $\ln DO$ correspondentes à fase exponencial do crescimento em função do tempo. A partir desse gráfico, traçou-se uma reta de regressão linear e o declive da reta obtida representava a taxa de crescimento específica (Lopes & Fonseca, 1996).

$$\ln DO_t = \ln DO_0 + \mu_g t \quad (3.1)$$

No que concerne ao tempo de duplicação foi aplicada a seguinte fórmula (Lopes & Fonseca, 1996):

$$t_D (\text{dia}^{-1}) = \frac{\ln 2}{\mu_g} \quad (3.2)$$

3.4 - Contagem celular

Para a determinação da concentração celular em cada fase do crescimento fixou-se uma alíquota de 1 mL das culturas com solução de Lugol 1% (Figura 3.4 - A). Depois de homogeneizada (Figura 3.5 - B), colocou-se uma pequena porção numa lâmina de poços (Figura 3.4 - C) para observação ao microscópio (*Olympus CK40*). A partir da densidade observada foi necessário recorrer a diluições entre 1:50 e 1:500 em água destilada. Colocou-se 1 mL de cultura fixada e diluída na câmara *Sedgwick-Rafter* e aguardou-se durante 20 a 30 minutos para que todas as células sedimentassem. Observou-se toda a câmara e selecionaram-se aleatoriamente 10 quadrículas consecutivas que representassem uma zona homogénea de filamentos (Figura 3.4 - D). Procedeu-se à medição, com o auxílio de uma escala ocular, de cada um dos filamentos que ocorriam nessas mesmas quadrículas numa ampliação de 100x.

Posteriormente, captaram-se fotografias dos filamentos das mesmas alíquotas (microscópio *Olympus BX60* equipado com câmara digital *Olympus PM-PB20*) e recorreu-se ao programa *ImageJ* (versão 1.52a) para se obter o comprimento médio de 40 células vegetativas (Figura 3.4 - E). Com estes dados calculou-se a concentração celular de cada fase do crescimento através das seguintes fórmulas²:

$$\text{Comprimento total dos filamentos } (\mu\text{m}) = \text{Soma dos comprimentos dos filamentos em 10 quadrículas (divisões da ocular)} \times \text{fator de conversão (de divisões em } \mu\text{m)} \quad (3.3)$$

Neste caso, o fator de ampliação da escala da objetiva de 10x corresponde a 10,3

$$\text{Número de células existentes em 10 quadrículas} = \frac{\text{Comprimento total dos filamentos } (\mu\text{m})}{\text{Comprimento médio das células } (\mu\text{m})} \quad (3.4)$$

$$\text{Concentração celular}_{\text{inicial}} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células existentes em 10 quadrados} \times 1000 \mu\text{L}}{10 \mu\text{L}} \quad (3.5)$$

$$\text{Concentração celular}_{\text{final}} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \text{Concentração celular}_{\text{inicial}} \times \text{fator de diluição} \quad (3.6)$$

^{1,2} Todos estes dados foram trabalhados no programa *Microsoft Office Excel*.

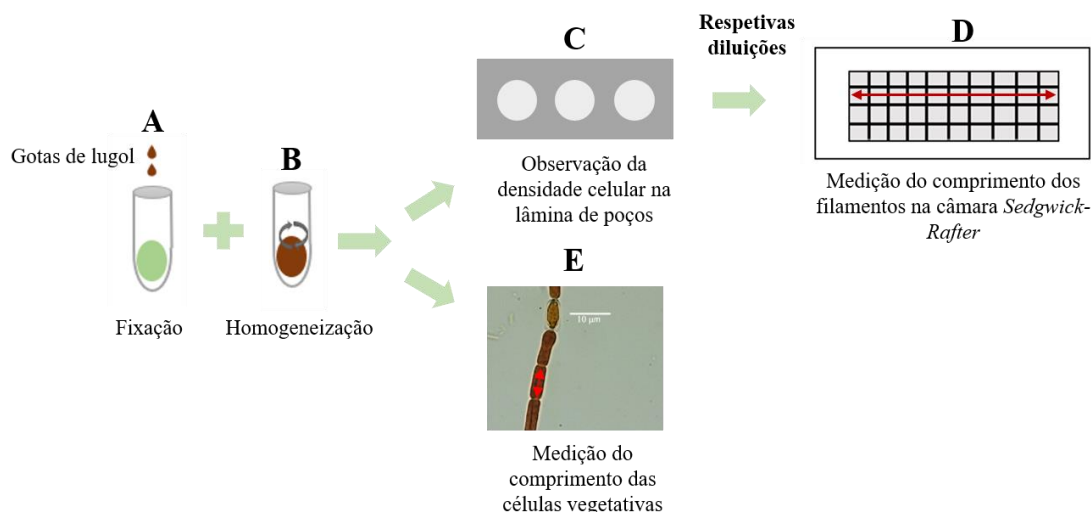


Figura 3.4 - Representação esquemática do processo de contagem celular das culturas: (A) Fixação das culturas com Lugol; (B) Homogeneização da alíquota; (C) Avaliação da densidade celular na lâmina de poços; (D) Medição dos filamentos em 10 quadrículas da câmara de *Sedgwick-Rafter*; (E) Medição do comprimento de 40 células vegetativas no programa *Image J*.

3.5 - Contagem de heterócitos

A partir das fotos obtidas anteriormente, para cada alíquota recolhida, observaram-se pelo menos 30 filamentos aleatórios e contabilizou-se o número de heterócitos por cada filamento. De seguida, calculou-se o número total de heterócitos e a percentagem de filamentos com heterócitos, para cada estirpe nas quatro fases do crescimento³.

3.6 - Morfometria dos acinetos

Os acinetos foram observados a partir das lâminas preparadas no ponto 3.4. Capturaram-se imagens de 30 acinetos aleatórios que foram analisadas no programa *ImageJ*. Procedeu-se à medição do comprimento e da largura dos acinetos, e no fim calculou-se o valor médio dessas mesmas medidas, por cada fase do crescimento cianobacteriano, em cada estirpe⁴.

Procedeu-se igualmente à determinação do volume médio dos acinetos (em μm^3) em cada alíquota, usando a forma geométrica cilíndrica. Deste modo, para se calcular o volume dos acinetos recorreu-se à seguinte fórmula:

$$\text{Volume } (\mu\text{m}^3) = \pi \cdot r^2 \cdot h = \pi \times 1/2 \text{ largura}^2 \times \text{altura} \quad (3.6)$$

Adicionalmente, dos 30 acinetos observados diferenciaram-se os acinetos ligados aos filamentos (designados acinetos ligados) dos acinetos dispersos no meio de cultura da amostra (designados acinetos livres). Desta forma, foi possível efetuar uma contagem discriminada relativamente a estes dois tipos de acinetos para cada alíquota permitindo, assim, calcular a percentagem de acinetos livres face ao número total de acinetos observados⁵.

3.7 - Quantificação de STXs

Para quantificação de STXs, foram recolhidas alíquotas com um volume de cultura de 4,5 mL (3.2), congeladas e mantidas a -20°C até análise por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Após

^{3,4,5} Todos estes dados foram trabalhados no programa *Microsoft Office Excel*.

o descongelamento das alíquotas e ruptura das células por sonicação (*Sonics Vibra-Cell VCX 750*), os ensaios foram conduzidos utilizando os kits *Saxitoxin ELISA Plate* (*Beacon Analytical Systems Inc.* ou *EuroProxima*). Estes kits baseiam-se num imunoenensaio competitivo direto em que as moléculas de STXs da amostra competem diretamente com a SXT conjugada HRP (*Horseradish peroxidase*) para se ligar ao anticorpo de STX, imobilizado no poço da microplaca de 96 poços. Após a adição do substrato cromogénico, este liga-se apenas à SXT conjugada HRP associada ao anticorpo de STX, levando à produção de cor e a leitura é feita num leitor de placas, a 450 nm (*Multiskan Ascent – Thermo LabSystems*). A absorvância medida será inversamente proporcional à concentração de STXs presente na amostra.

Todos os padrões e alíquotas foram realizados em duplicado. O protocolo experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em cada uma das alíquotas foi possível determinar a concentração total de STXs ($\mu\text{g/L}$) e posteriormente a concentração de STXs por célula (*toxin quota cell*) ($\mu\text{g/célula}$) através da fórmula⁶:

$$\text{Concentração de STXs por célula} = \frac{\text{Concentração total de STXs } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{Concentração celular } \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}}\right)} \quad (3.8)$$

3.8 - Extração de ácidos nucleicos

3.8.1- Extração de DNA

Procedeu-se à extração de DNA das estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31, a partir de culturas *stocks* em crescimento exponencial, mantidos na coleção ESSACC. Com este DNA, realizou-se um PCR convencional para otimizar todas as condições que permitem a hibridação dos *primers* com as respetivas sequências-alvo. Este DNA serviu também como controlo positivo para o PCR convencional de RNA para averiguar se as amostras continham uma possível contaminação de DNA. O protocolo de extração de DNA está descrito em detalhe no Anexo III e é uma adaptação do método utilizado em Santos & Phillips (2009).

Posteriormente, recorreu-se ao espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*) e determinaram-se as concentrações de DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e as razões de absorvância ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$ e $\frac{A_{260}}{A_{230}}$) para avaliar a pureza do ácido nucleico extraído. Para assegurar o grau de pureza adequado, as razões, $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ e $\frac{A_{260}}{A_{230}}$, devem ser aproximadamente 1.8 e 2.0, respetivamente (Desjardins & Conklin, 2011).

3.8.2- Extração e purificação de RNA

De forma a extrair o RNA de cada alíquota, retiraram-se 6 mL de cultura em cada ponto de recolha (descrito em 3.2) e o protocolo que se seguiu resultou da adaptação do método utilizado em Valério *et al.* (2016). Tal procedimento encontra-se descrito no Anexo IV. O RNA extraído foi sujeito a purificação usando o kit *High Pure Isolation* (*Roche*) de acordo com as instruções do fabricante.

Quantificou-se o RNA no espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*) e averiguou-se a concentração de RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) assim como as suas razões de absorvância ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$ e $\frac{A_{260}}{A_{230}}$). Para se considerar que o RNA extraído possuía um grau de pureza dentro dos limites aconselháveis, os valores de $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ e $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ tinham que ser ~ 2 (Desjardins & Conklin, 2011).

⁶ Todos estes dados foram trabalhados no programa *Microsoft Office Excel*.

3.9 - Seleção dos genes-alvo e de referência, respetivos *primers* e sua especificidade

3.9.1 - Descrição dos genes-alvo e de referência

O *Real-Time-qPCR* é uma técnica que partilha os mesmos princípios básicos do *PCR* convencional, no entanto possui uma tecnologia mais avançada que permite observar o *DNA* amplificado em tempo real. Isto só é possível devido ao uso de marcadores fluorescentes que são incorporados no produto de *PCR* ao longo de cada ciclo de amplificação. Pelo contrário, no *PCR* convencional só é possível observar a quantidade de *DNA* amplificado após a sua conclusão e posterior separação dos fragmentos em gel de agarose e coloração com um agente intercalante (Martins & Vasconcelos, 2011).

Para além disso, pode-se também realizar *RT-real-time-qPCR*, que inclui mais uma etapa em que a *Reverse Transcriptase* converte o *RNA* em *cDNA*, que é seguidamente amplificado no decorrer dos ciclos. Esta técnica possibilita quantificar os transcritos de *mRNA* e consequentemente estudar os perfis de expressão génica perante diferentes condições. Após a realização destes ensaios de *RT-real-time-qPCR* obtêm-se valores que representam o *threshold cycle* (Ct). O Ct corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável, ultrapasse a linha *threshold* e aumente de forma exponencial a partir desse ponto. A linha *threshold* corresponde ao limiar mínimo de deteção de fluorescência do equipamento que é interpretado como o “ruído de fundo” (Oliveira, 2010), a definição deste valor é equivalente a definir uma “linha de base”. Caso a amostra de interesse contenha elevadas quantidades do ácido nucleico a quantificar, serão necessários poucos ciclos de amplificação para que o sinal de fluorescência ultrapasse a linha *threshold*. Assim, o resultado será traduzido num valor de Ct baixo. Por outro lado, quando existe pouca quantidade dos ácidos nucleicos nas amostras, serão necessários mais ciclos de amplificação para a fluorescência ultrapassar a linha *threshold* resultando num elevado valor de Ct (Bio-Rad laboratories, 2006).

No método *RT-real-time-qPCR* existem duas formas de determinar a quantidade de ácidos nucleicos: através de uma quantificação absoluta ou de uma quantificação relativa. Na quantificação absoluta calcula-se apenas a quantidade de ácidos nucleicos da amostra, e é mais utilizada em casos onde se pretende descobrir uma propriedade intrínseca de uma amostra (por exemplo, o número de partículas virais no sangue) (Bio-Rad laboratories, 2006). Na quantificação relativa pretende-se comparar a quantidade de ácidos nucleicos entre várias amostras (Bio-Rad laboratories, 2006). A quantificação relativa dos transcritos dos genes-alvo é obtida através da comparação com os transcritos de um gene de referência (Pfaffl, 2001).

Neste estudo escolheu-se a quantificação relativa uma vez que se pretende perceber quais as diferenças verificadas ao nível da expressão génica dos genes-alvo (*sxtA*, *sxtM* e *sxtPer*) nas diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C) e ao longo do crescimento cianobacteriano (fase de adaptação, exponencial inicial, exponencial final e estacionária). Cada gene possui uma função diferente como está descrito na Tabela 3.1. Para se obter uma expressão relativa dos genes-alvo avaliou-se também a expressão de um gene de referência. Desta forma, consegue-se normalizar a quantificação e perceber se os resultados obtidos na expressão dos genes-alvo resultam de fatores prévios como a má pipetagem, integridade e quantidade de *RNA*, ou se são uma consequência direta das condições que se estão a avaliar (Applied Biosystems, 2008).

O gene *rRNA 16S*, que também se encontra descrito na Tabela 3.1, foi o considerado mais adequado para se estipular como um gene de referência. Várias razões justificam esta escolha, entre as quais ser um gene que foi usado como referência em estudos anteriores no laboratório; é expresso em elevadas quantidades em todas as células independentemente das condições ambientais e teve uma expressão constante em diferentes espécies de cianobactérias (Pinto *et al.*, 2012).

Tabela 3.1 - Descrição da função dos genes-alvo (*sxtA*, *sxtM* e *sxtPer*) e do gene de referência (*rRNA 16S*).

Gene	Função	Referência
<i>sxtA</i>	Catalisa a primeira reação da via biossintética	Kellmann <i>et al.</i> , 2008
<i>sxtM</i>	Exporta as STXs	Kellmann <i>et al.</i> , 2008
<i>sxtPer</i>	Exporta as STXs	Mihali <i>et al.</i> 2009
<i>rRNA 16S</i>	Sintetiza proteínas	Pinto <i>et al.</i> , 2012

3.9.2 - Descrição dos *primers* usados

Os *primers* usados neste estudo foram escolhidos com base em publicações prévias, como está descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Genes em estudo, respectivos *primers*, e as suas sequências de nucleótidos e tamanho do fragmento amplificado (*bp*).

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento amplificado (<i>bp</i>)	Referência
<i>sxtA</i>	jrtPKSF	GGAGTGGATTTC AACACCAGAA	147	Ongley <i>et al.</i> , 2016
	jrtPKSR	GTTTCCCAGACTCGTTTCAGG		
<i>sxtM</i>	qMgrF	GAAGCACGAGTCAGCCTACA	129	Cirés <i>et al.</i> , 2017
	qMgrR	CAAAGCACCACCAGCCAAAA		
<i>sxtPer</i>	qPERgrF	CTGGGCGAGACATTTGAGA	116	Cirés <i>et al.</i> , 2017
	qPERgrR	GCACAGAGACAGGCGAACTA		
<i>rRNA 16S</i>	CYA106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	258	Nübel <i>et al.</i> , 1997
	CYA359F ⁷	CCCATTGCGGAARATTCCCC		

3.9.3 - Testes de especificidade

Todos os *primers* dos genes em estudo foram sujeitos a testes de especificidade. O *DNA* extraído na alínea 3.8.1 foi sujeito a um *PCR* convencional com o intuito de se atingir dois objetivos: verificar a amplificação e especificidade dos *primers* através da amplificação de um único produto.

Estes *PCRs* foram executados num volume total de 25 µL contendo: 13,05 µL de água (*Invitrogen*), 2,5 µL *PCR Buffer* 10x (*Invitrogen*), 1,25 µL de W-1 a 1% (*Invitrogen*), 1 µL *dNTPs* a 1,25 mM (*VWR*), 1,25 µL de cada *primer* a 10 µM (*Thermo Fisher Scientific*), 0,2 µL *Taq DNA polimerase* (*Invitrogen*) e 3 µL de *DNA* a 50 ng/µL. Relativamente à quantidade de MgCl₂, esta difere mediante as diferentes otimizações para cada gene em estudo (descrito em Anexo V, Tabela XII). Posteriormente, colocou-se os respetivos tubos de *PCR* no termociclador *Tpersonal* (*Biometra*) em ciclos de temperatura diferente (descrito em Anexo V, Tabela XIII). Os produtos de *PCR* amplificados

⁷ Apesar de ser um *primer forward* utilizou-se o complementar reverso deste *primer reverse*.

foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% com 0,25x de *GelRed Nucleotic Acid Strain (Biotium)* incorporado e por fim visualizados através da exposição à luz UV.

Para confirmar que apenas os genes-alvo tinham sido amplificados, todos os produtos de *PCR* obtidos foram posteriormente purificados usando o kit *ilustra™ ExoProStar™ 1-Step*, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e sequenciados (Unidade de Tecnologias e Inovação, INSA). As sequências de nucleótidos obtidas foram submetidas no *Nucleotide BLAST* a partir da base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e verificou-se a correspondência com os respetivos genes-alvo.

3.10 - Quantificação da expressão génica

3.10.1 - Determinação dos parâmetros ótimos das retas padrão em RT-real-time-qPCR

Na quantificação relativa é necessária a construção de retas-padrão assegurando que estas possuam uma eficiência de amplificação entre 80% - 115% e um coeficiente de regressão linear (R^2) superior a 0,912, de forma a garantir posteriormente uma boa quantificação (Pinto *et al.*, 2012).

Para a construção das retas-padrão efetuaram-se diluições seriadas de 1:2; 1:10; 1:100 a partir de uma alíquota de *DNA* a 10 ng/ μ L. Recorreu-se ao kit *SensiMix SYBR no-ROX (Bioline)*, cujo volume final da mistura foi de 12,5 μ L contendo 1 μ L de água (*Invitrogen*), 6,25 μ L de *MasterMix (Bioline)*; 0,5 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM (*Bioline*); 0,125 μ L de cada *primer* a 10 μ M (*Thermo Fisher Scientific*) e 4 μ L de *DNA* com respetiva diluição. Cada amostra de *DNA* diluída foi sujeita a uma análise em triplicado. Por fim foram inseridas no *Rotor-Gene 3000 (Quiagen-Corbett)* e este foi configurado de acordo com o programa que está descrito na Tabela XIV do Anexo VI.

A *MasterMix* usada nestes ensaios contém *SYBR Green* como corante. Este possui a capacidade de se ligar a todas as cadeias-duplas de *DNA* existentes, e, portanto, há a possibilidade deste marcador fluorescente não se ligar apenas ao *DNA*-alvo, mas também a dímeros de *primers* que se possam eventualmente formar. Desta forma, a especificidade é assegurada através da análise da curva de *melting*, programada no final de todos os ciclos do *PCR* (Martins & Vasconcelos, 2011) e realizada a partir de um gradiente de temperatura ao longo do tempo, como está detalhado na Tabela XIV do Anexo VI.

3.10.2 - Ensaios de RT-real-time-qPCR

Antes de se prosseguir para a quantificação da expressão génica, foi necessário averiguar se as amostras de *RNA* não estavam contaminadas com *DNA*. Para isso realizou-se um *PCR* convencional que segue todos os procedimentos descritos anteriormente em 3.9.3, diferindo apenas no ácido nucleico adicionado na mistura de reação que neste caso era *RNA*.

A quantificação da expressão génica dos genes *sxtA*, *sxtM*, *sxtPer* e *rRNA 16S* foi realizada no equipamento *Rotor-Gene 3000 (Quiagen-Corbett)* usando o kit *SensiFAST SYBR no-ROX One-Step (Bioline)*. O ensaio de *RT-real-time-qPCR* foi realizado numa mistura de reação com volume final de 12,5 μ L contendo 1,5 μ L de água tratada com DEPC (*Bioline*), 6,25 μ L *MasterMix (Bioline)*, 0,5 μ L $MgCl_2$ a 50 mM (*Bioline*), 0,125 μ L de cada *primer (Thermo Fisher Scientific)* a 10 μ M, 0,25 μ L *RiboSafe RNase Inhibitor* a 10U/ μ L (*Bioline*) e 4 μ L de *RNA* a 5 ng/ μ L. Cada amostra de *RNA* foi sujeita a uma análise em triplicado. Esta mistura de reação foi submetida aos parâmetros de temperatura e de tempo descritos na Tabela XV do Anexo VI.

Para se verificar a especificidade do produto amplificado construiu-se uma curva de *melting* no final dos ciclos, com base de um gradiente de temperatura ao longo do tempo como está detalhado na Tabela XIV do Anexo VI.

No programa *Rotor-Gene 3000 series*, a linha de *threshold* foi fixada em 0,02 para todos os ensaios de *RT-real-time-qPCR*. No final obteve-se três valores de *Ct* para cada amostra, uma vez que se realizou três replicados, e calculou-se o respetivo valor de *Ct* médio⁸.

3.10.3 - Quantificação relativa da expressão génica

Existem vários modelos matemáticos que permitem fazer a análise dos valores de *Ct* médios obtidos na quantificação relativa da expressão génica (3.10.2), nomeadamente o método *Livak*, o método ΔCt e o método *Pfaffl* (Bio-Rad laboratories, 2006). Neste trabalho recorreu-se ao método *Pfaffl* uma vez que possui diversas vantagens face aos outros, sendo a mais relevante o facto de não necessitar que a eficiência de amplificação dos genes-alvo seja igual à eficiência de amplificação do gene de referência (Pfaffl, 2001).

Este modelo matemático segue a seguinte fórmula (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{(E_{\text{gene-alvo}})^{\Delta Ct_{\text{gene-alvo}}(\text{controlo-teste})}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta Ct_{\text{gene referência}}(\text{controlo-teste})}} \quad (3.8)$$

A incógnita **R** representa a taxa de expressão relativa do gene-alvo pretendido (*sxtA*, *sxtM* ou *sxtPer*) face ao gene de referência *rRNA 16S*. $E_{\text{gene-alvo}}$ e $E_{\text{gene referência}}$ representam as eficiências de amplificação dos genes-alvo e de referência respetivamente. Estes valores foram obtidos através das retas padrão determinadas anteriormente (3.10.1); $\Delta Ct_{\text{gene-alvo}}(\text{controlo} - \text{teste})$ representa a diferença entre o valor de *Ct* médio obtido nos genes-alvo na condição controlo e o valor obtido de *Ct* médio do gene-alvo na condição testada (*Ct* controlo – *Ct* teste, *Ct*s referentes ao gene referência); $\Delta Ct_{\text{gene referência}}(\text{controlo} - \text{teste})$ representa a diferença entre o valor obtido de *Ct* médio do gene referência na condição controlo e o valor obtido de *Ct* médio do gene referência na condição testada (*Ct* controlo – *Ct* teste, *Ct*s referentes ao gene referência).

Pretendeu-se analisar as diferenças nos níveis de expressão génica nas diferentes condições de temperatura e ao longo do tempo. Para se averiguar o efeito da temperatura estabeleceu-se como situação controlo a temperatura de 20 °C, e para investigar o efeito da progressão do tempo fixou-se como condição controlo a fase de adaptação.

3.11 - Análise estatística

De modo a estabelecer uma correlação entre o crescimento e a temperatura usou-se o teste de correlação de *Pearson*. Posteriormente, todos os grupos de dados obtidos foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste *Kolmogorov-Smirnov* (Lilliefors, 1967) e quanto à homogeneidade de variância pelo Teste de *Levene* (Gastwirth *et al.*, 2009), de forma a garantir que os pressupostos necessários para a aplicação de testes paramétricos eram cumpridos. Para se realizarem comparações a pares recorreu-se ao teste-*t*: para se avaliar diferenças estatisticamente significativas entre as duas condições de temperatura (10 e 20 °C) recorreu-se ao teste-*t* de amostras independentes; para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre as várias fases do crescimento cianobacteriano (fase de adaptação, exponencial inicial e final, e estacionária) utilizou-se o teste-*t* de amostras emparelhadas (Anexo II). Nesta avaliação estatística agruparam-se os dados, referentes às temperaturas e às fases do crescimento, dois a dois de forma a ver especificamente em quais grupos existiam essas diferenças (McDonald, 2009).

⁸ Todos estes dados foram trabalhados no programa *Microsoft Office Excel*.

Isto significa que se averiguou diferenças entre todas as fases do crescimento. À exceção da expressão génica em que a análise estatística foi somente realizada face às condições de controlo, ou seja, em relação à condição de 20 °C e à fase de adaptação.

O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de $p < 0,05$. Todos estes testes estatísticos foram conduzidos no programa *IMB SPSS Statistics* (versão 20).

4. Resultados

4.1 - Definição dos pontos de análise

De forma a estipular os pontos de análise acompanhou-se o crescimento das duas estirpes em estudo em condições de temperatura controlada (20 °C).

Ao avaliar-se as curvas de crescimento da estirpe *A. gracile* LMECYA40 estabeleceram-se como DOs representativas da fase de adaptação, exponencial inicial, exponencial final e estacionária os seguintes valores: 0,400; 0,6863; 1,2753; 1,600, respetivamente. Quanto à estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31 definiram-se como DOs equivalentes a 0,4350; 0,8910; 1,400; 1,8483. Detetou-se que na fase de adaptação, as duas estirpes apresentaram um comportamento semelhante refletindo-se em pontos de análise com DOs muito próximas. Nas fases finais já diferiram ligeiramente, sendo que a fase exponencial (inicial e final) e estacionária foi atingida em DOs mais baixas em *A. gracile* LMECYA40 do que em *C. issatschenkoi* LMECYA31 (Figura 4.1).

Por conseguinte, quando as culturas expostas a diferentes temperaturas atingissem os valores de DO referidos acima recolhiam-se as alíquotas de modo a analisar todos os parâmetros estabelecidos neste estudo.

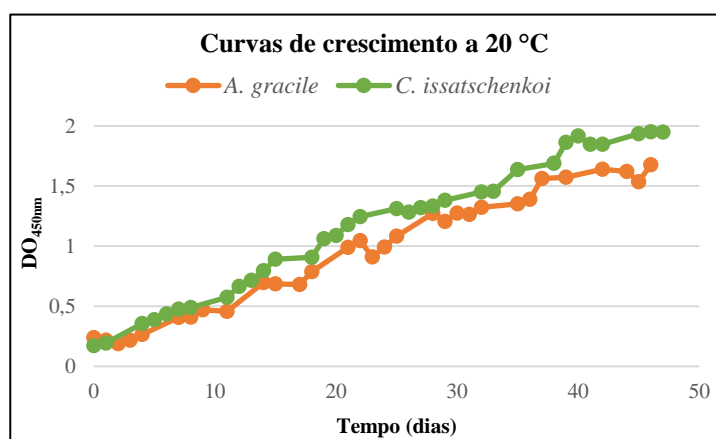


Figura 4.1 - Curvas de crescimento de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (laranja) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (verde) à temperatura de 20 °C.

4.2 - Efeito da temperatura nas curvas de crescimento e morfologia das culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31

4.2.1 - Avaliação dos efeitos da temperatura de 30 °C

As culturas das estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 não atingiram nenhuma das fases de crescimento pretendidas quando colocadas a uma temperatura de 30 °C. Este efeito foi observado nos dois locais de incubação testados, na estufa e no banho. Relativamente às culturas incubadas no banho a 30 °C, a estirpe *A. gracile* LMECYA40 atingiu aproximadamente uma DO máxima de aproximadamente 0,35 ao 15º dia, voltando a decrescer nos dias consecutivos. Já a estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, ao longo de 27 dias, nunca apresentou uma DO superior a 0,2 (Figura 4.2).

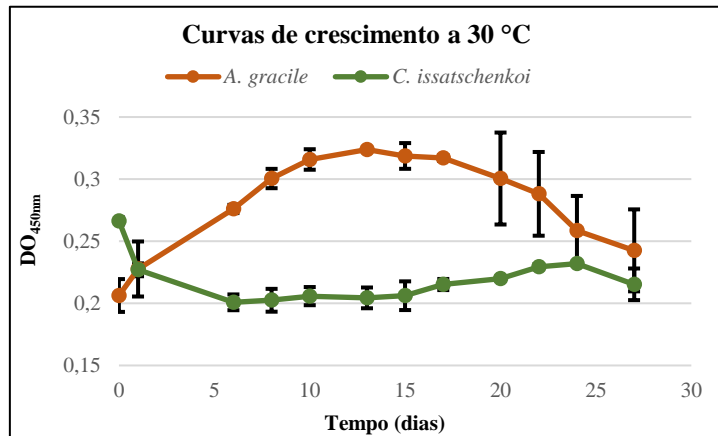


Figura 4.2 - Curvas de crescimento de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (laranja) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (verde) à temperatura de 30 °C. Os dados representam os valores médios de densidade ótica e as respetivas barras de erro indicam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$).

A observação macroscópica das culturas ao 27º dia após a inoculação, denotava que as culturas das duas estirpes apresentavam um aspeto muito pouco denso e uma cor verde-esbranquiçada (Figura 4.3 - A) comparativamente às culturas expostas à temperatura de 20 °C, que exibiam uma cor verde (Figura 4.3 - B). Uma vez que as culturas apresentaram este aspeto macroscópico, fora do esperado, foi também avaliado o aspeto microscópico a partir de alíquotas retiradas dos *T-flasks* correspondentes. Ambas as estirpes em estudo apresentavam filamentos fragmentados com conteúdo intracelular irregular (Figura 4.3 - C e D) comparativamente às células das culturas expostas a 20 °C (Figura 4.3 - E e F), para um momento de amostragem similar. Para além disso, a estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31 exibiu células vegetativas com uma morfologia atípica, observando-se mais estreitas e prolongadas que o normal (Figura 4.3 - D vs F).

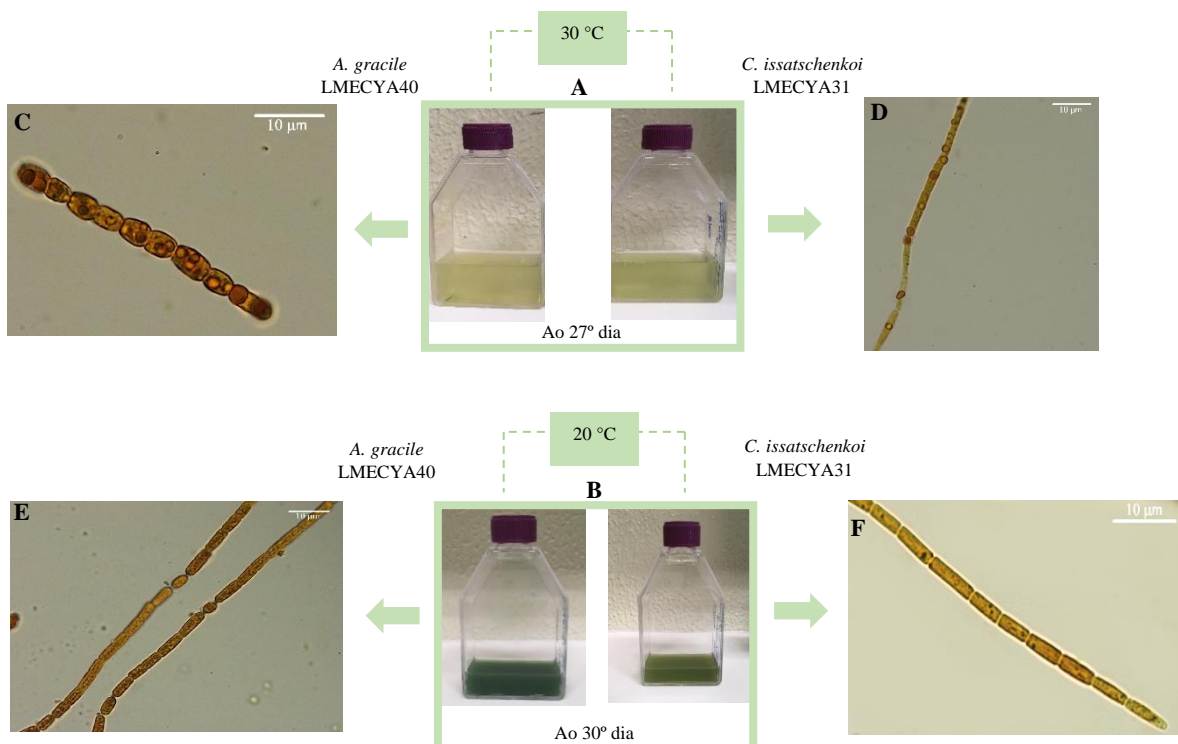


Figura 4.3 - Fotografias que representam os aspetos macroscópicos das culturas *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 a 30 °C (A) e 20 °C (B) e respetivos aspetos microscópicos das culturas *A. gracile* LMECYA40 (C) *C. issatschenkoi* LMECYA31 (D) a 30 °C e das culturas *A. gracile* LMECYA40 (E) *C. issatschenkoi* LMECYA31 (F) a 20 °C.

Tendo em conta que nenhuma das espécies conseguiu desenvolver-se nesta condição de temperatura, a partir deste ponto do trabalho apenas se vai considerar uma temperatura de teste (10 °C) e a temperatura de controlo (20 °C).

4.2.2 - Avaliação dos efeitos das temperaturas de 10 e 20 °C

As culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C atingiram as quatro fases do crescimento cianobacteriano esperadas durante um período de 60 dias. Foram observadas DOs médias superiores nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 relativamente às de *A. gracile* LMECYA40 para as duas temperaturas testadas (Figura 4.4).

As culturas de *A. gracile* LMECYA40 mostraram um padrão de crescimento diferente nas duas temperaturas tratadas (10 e 20 °C). Em ambas as condições, foram identificadas as diferentes fases do crescimento (fase de adaptação, exponencial inicial, exponencial final e estacionária), contudo, como era expectável, as culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas a 10 °C demoraram mais tempo a atingir cada uma das fases descritas anteriormente.

A análise estatística dos dados obtidos demonstrou a existência de uma relação entre o crescimento e a temperatura (teste de correlação de *Pearson*; $p \leq 0,05$). Os pressupostos para a aplicação do teste-*t*, foram verificados [os dados apresentaram uma distribuição normal ($p > 0,05$; Teste *Kolmogorov-Smirov*)] e a mesma variância ($p > 0,05$; Teste de *Levene*). Concluiu-se que o crescimento a 20 °C foi significativamente maior do que a 10 °C ($p \leq 0,05$; Teste-*t*).

Foi também avaliada a diferença no tempo de cultura. Denotaram-se diferenças estatisticamente significativas em todos os dias ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) à exceção do dia zero, que corresponde ao início dos ensaios (em que se inocularam propositadamente as culturas com a mesma DO inicial). Nos últimos dias de crescimento das culturas expostas à temperatura de 10 °C não foi possível fazer-se esta avaliação estatística, uma vez que as culturas expostas a 20 °C atingiram a fase estacionária mais precocemente (Figura 4.4 - A).

As curvas de crescimento das culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 podem ser observadas na figura 4.4 - B, onde se identificaram as quatro fases do crescimento cianobacteriano. De forma semelhante ao tratamento estatístico efetuado para a estirpe *A. gracile* LMECYA40, em *C. issatschenkoi* LMECYA31 identificou-se uma relação entre o crescimento e as diferentes temperaturas ($p \leq 0,05$). Os dados relativos ao crescimento a 10 e 20 °C apresentaram ter uma distribuição normal ($p > 0,05$; Teste *Kolmogorov-Smirov*) e a mesma variância ($p > 0,05$; Teste de *Levene*). Deste modo aplicou-se o teste-*t* e não se apuraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no crescimento entre as duas temperaturas analisadas, apesar das culturas expostas a 10 °C apresentarem DOs inferiores às expostas a 20 °C.

Nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 também se tentou perceber se houve diferenças estatisticamente significativas entre o tempo de cultura em diferentes condições de temperatura. E constatou-se que a partir do 27º dia inclusive, todos os valores de DO apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.4 - B).

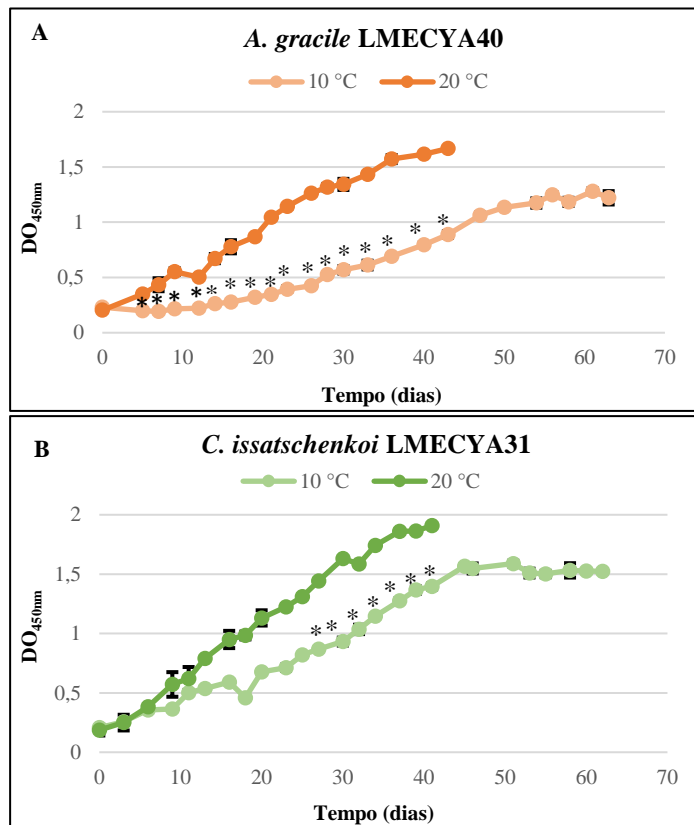


Figura 4.4 - Curvas de crescimento de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (**A**) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (**B**) às duas temperaturas em estudo (10 e 20 °C). Os dados representam os valores médios de densidade ótica e as respectivas barras de erro indicam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Asterisco (*) indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em cada dia face à temperatura de controlo (20 °C).

Ao contrário do que se verificou a 30 °C, a 10 e 20 °C, estas estirpes apresentaram uma cor indicativa de um bom estado de viabilidade. As culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C (Figura 4.5 - A, B, C e D) exibiram uma cor verde escura e as de *C. issatschenkoi* LMECYA31 (Figura 4.5 - E, F, G) apresentavam uma cor verde clara.

Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, a temperatura e o tempo de cultura não induziram uma variação na coloração (Figura 4.5 - A, B, C e D). O mesmo não se verificou com as culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31. Para ambas as temperaturas, as culturas passaram de verdes claras na fase de adaptação (Figura 4.5 - E e G), para verde-acastanhada na fase estacionária (Figura 4.6 – F e H). Este efeito ocorreu nas duas temperaturas.

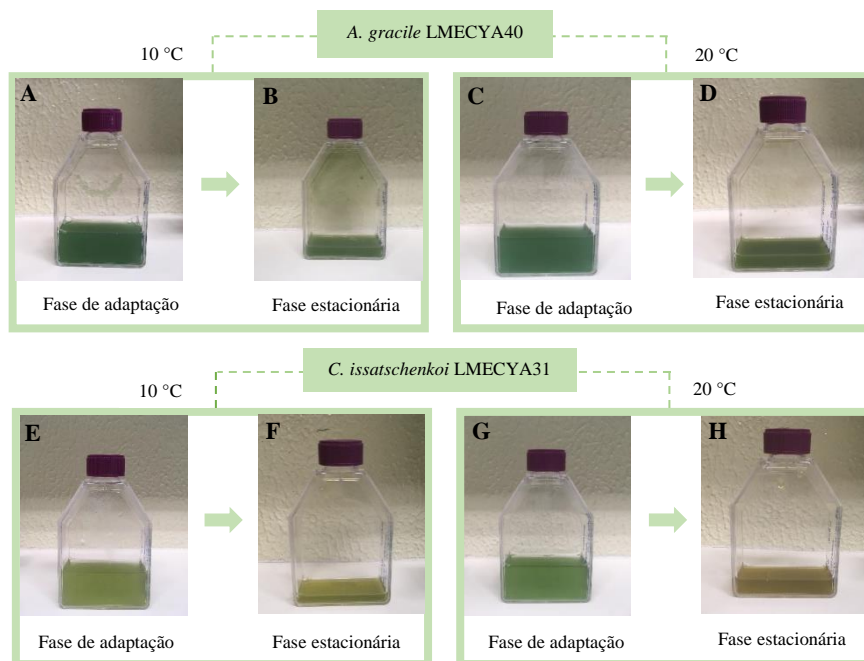


Figura 4.5 - Aspectos macroscópicos das culturas expostas às temperaturas de 10 e 20 °C. Fase de adaptação (A) e fase estacionária (B) de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 a 10 °C; Fase de adaptação (C) e fase estacionária (D) de *A. gracile* LMECYA40 a 20 °C; Fase de adaptação (E) e fase estacionária (F) de *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 a 10 °C; Fase de adaptação (G) e fase estacionária (H) de *C. issatschenkoi* LMECYA31 a 20 °C.

4.2.3 - Avaliação dos parâmetros de crescimento

Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, a temperatura afetou as taxas de crescimento (μ_g) atingindo o seu mínimo à temperatura de 10 °C, que foi estatisticamente menor ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) do que à temperatura de controlo (20 °C). Nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 verificou-se o mesmo padrão, a taxa de crescimento foi menor nas culturas a 10 °C, mas, no entanto, não se apuraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*) entre a taxa de crescimento a 10 e 20 °C.

Uma vez que as taxas de crescimento à temperatura de 10 °C nas duas estirpes foram menores, consequentemente os tempos de duplicação foram maiores do que os obtidos a 20 °C, embora esta diferença não tenha sido significativa ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Parâmetros de crescimento de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 a 10 e 20 °C. Os dados apresentados mostram a média \pm desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na taxa de crescimento relativamente à condição controlo (20 °C).

Espécies	Temperatura	Taxa de crescimento (dia ⁻¹)	Tempo de duplicação (dia)
<i>A. gracile</i> LMECYA40	10 °C	0,039 \pm 0,001*	17,87 \pm 0,26
	20 °C	0,045 \pm 0,003	15,29 \pm 0,86
<i>C. issatschenkoi</i> LMECYA31	10 °C	0,040 \pm 0,012	17,98 \pm 5,30
	20 °C	0,047 \pm 0,004	14,97 \pm 1,37

4.3 - Variação temporal da concentração celular e da concentração de STXs

4.3.1 - Avaliação da concentração celular ao longo do tempo

As culturas de *A. gracile* LMECYA40 submetidas às temperaturas de 10 e 20 °C revelaram, tal como esperado, valores máximos de densidade celular na fase estacionária e os valores mínimos na fase de adaptação. A comparação da densidade celular nas diferentes fases de crescimento a 10 °C, revelou diferenças estatisticamente significativas entre a fase de adaptação e a fase exponencial inicial e final ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). As densidades celulares das culturas expostas a 20 °C não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhuma das fases ($p > 0,05$; Teste-*t*).

Quando se comparou as concentrações celulares às diferentes temperaturas entre as mesmas fases do crescimento cianobacteriano não se apuraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*). Os dados sugerem um aumento ligeiro das concentrações celulares a 20 °C. À exceção da fase exponencial inicial onde se verificou um aumento nas culturas submetidas à temperatura 10 °C (Figura 4.6).

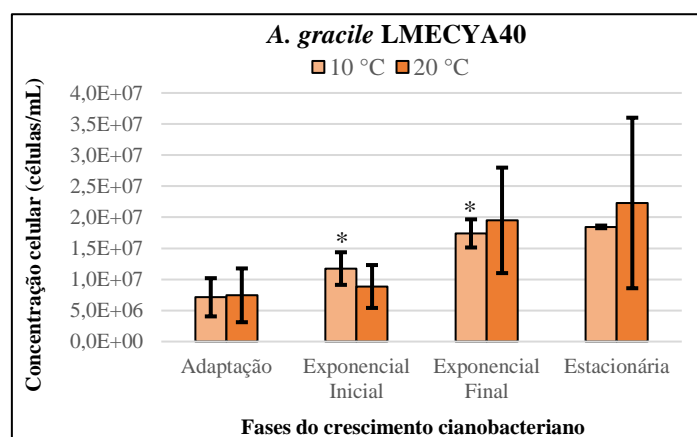


Figura 4.6 - Concentrações celulares de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 às temperaturas de 10 e 20 °C ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média das concentrações celulares e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Um asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração celular relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura.

Nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31, independentemente da temperatura em estudo, a fase de adaptação e a fase estacionária corresponderam às concentrações celulares mais baixas e mais elevadas, respetivamente. As concentrações celulares das culturas expostas a 10 °C revelaram diferenças estatisticamente superiores ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) na fase exponencial inicial e estacionária relativamente à fase de adaptação. O mesmo se verificou a 20 °C cujas concentrações celulares na fase exponencial final e estacionária foram significativamente superiores ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) às obtidas na fase adaptação. Ainda referente à temperatura de controlo, a fase exponencial inicial demonstrou ter uma concentração celular estatisticamente inferior ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) à da fase estacionária.

Quando se compararam as duas temperaturas em estudo, a diferença entre as concentrações celulares, em cada fase, foi aumentando consoante a progressão do tempo, sendo que só na fase estacionária, a concentração celular a 10 °C foi estatisticamente inferior ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) do que a concentração celular a 20 °C (Figura 4.7).

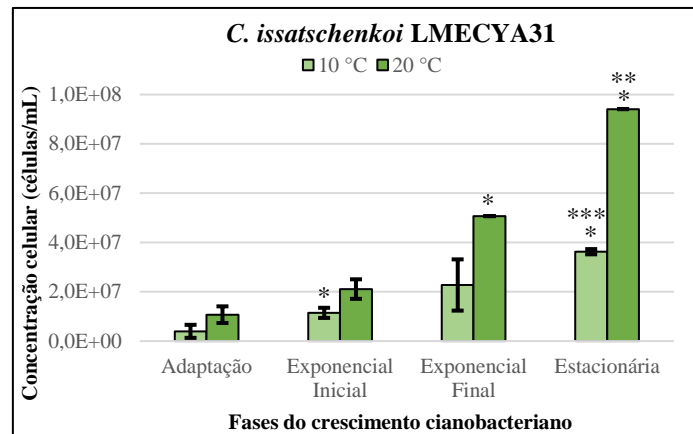


Figura 4.7 - Concentrações celulares de *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 às temperaturas de 10 e 20 °C ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média das concentrações celulares e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Um asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração celular relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura; Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração celular relativamente à fase exponencial inicial na mesma condição de temperatura; Três asteriscos (***) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração celular relativamente à temperatura de controlo (20 °C).

4.3.2 - Avaliação da relação entre a concentração celular e a concentração de STXs totais ao longo do tempo

De forma geral, observou-se que a estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31 produziu maiores concentrações de STXs totais que a estirpe *A. gracile* LMECYA40, e que a temperatura de 10 °C induziu uma menor produção destas toxinas do que no controlo (20 °C) (Figura 4.8).

Em relação às culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas a 10 °C, o aumento das concentrações celulares correspondeu a um aumento de quantidade de toxinas produzidas, observando-se, inclusive, uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) entre a fase de adaptação e a fase estacionária, onde se atingiu a concentração máxima de STXs. Já a 20 °C, a síntese destas toxinas foi maior na fase exponencial final, o que não correspondeu ao maior número de células determinado. A esta temperatura também se obtiveram diferenças estatísticas entre a fase de adaptação e a estacionária ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). Nesta estirpe, a temperatura não influenciou a quantidade de STXs totais produzidas, uma vez que as concentrações destas toxinas são semelhantes a 10 e 20 °C ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.8 - A).

Quanto à estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, à temperatura de 10 °C, o aumento do número de células refletiu-se num aumento da concentração de STXs totais, atingindo o máximo na fase estacionária. O mesmo não se verificou nas culturas expostas a 20 °C, que apesar de haver um aumento acentuado na concentração celular entre a fase exponencial final e a fase estacionária, a maior quantidade de STXs foi atingida na fase exponencial final e manteve-se inalterável a partir deste ponto. A progressão do tempo a 20 °C induziu diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de STXs totais na fase exponencial final e estacionária relativamente à fase de adaptação e exponencial inicial ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). Nesta estirpe, ao contrário do que se averiguou em *A. gracile* LMECYA40, a temperatura inibiu a produção das STXs reduzindo as suas concentrações aproximadamente para metade a 10 °C comparativamente ao que se observou a 20 °C (Figura 4.8 - B). No entanto, não foi possível realizar a análise estatística para se confirmar as diferenças significativas entre as temperaturas, uma vez que a 10 °C apenas se conseguiu obter resultados da concentração de STXs totais produzidas (quantificadas pelo método de ELISA) numa das amostras independentes.

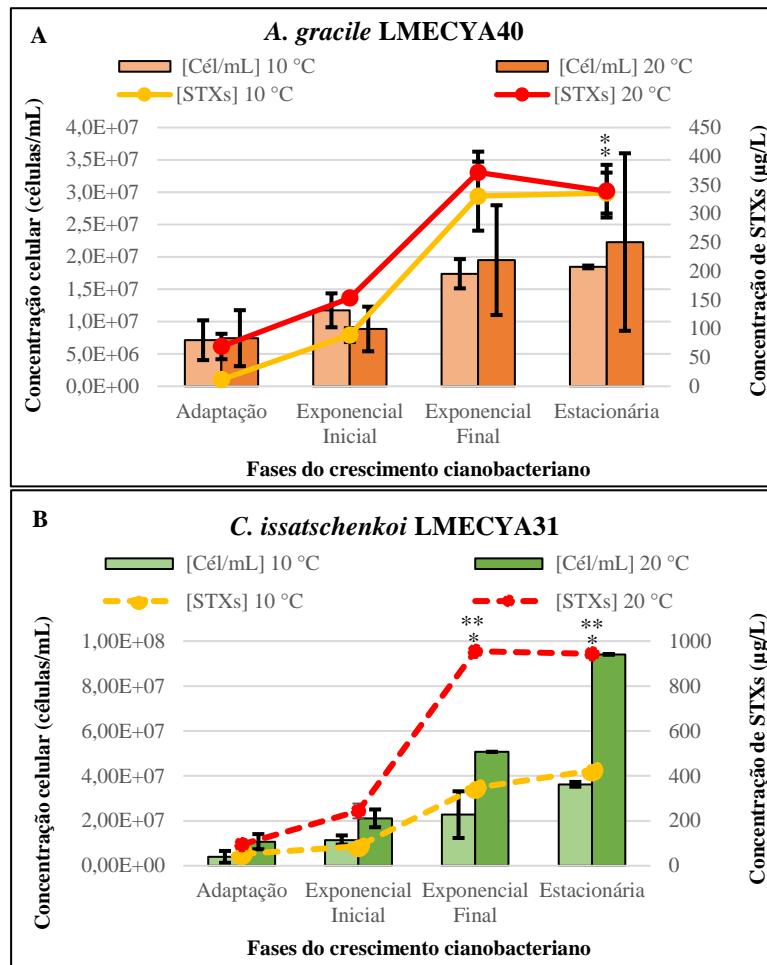


Figura 4.8 - Relação entre a concentração celular e a concentração de STXs totais produzidas pelas estirpes *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B) nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média de cada parâmetro, e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Um asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração de STXs relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura; Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração de STXs relativamente à fase exponencial inicial na mesma condição de temperatura.

Depois de determinada a concentração de STXs totais, calculou-se a concentração de STXs produzida por cada célula (*toxin quota cell*). A avaliação deste parâmetro revelou que cada célula da estirpe *A. gracile* LMECYA40 produz maiores quantidades (cerca do dobro) de STXs que cada célula da estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31. De uma forma geral, as culturas de ambas as estirpes expostas a 20 °C produziram uma maior quantidade de STXs por célula comparativamente às que foram submetidas à temperatura de 10 °C (Figura 4.9).

No que concerne à estirpe *A. gracile* LMECYA40, nas culturas expostas a 10 °C, observou-se uma baixa produção de STXs por célula nas duas primeiras fases do crescimento (adaptação e exponencial inicial), aumentando e mantendo-se praticamente constante nas fases seguintes. Apenas na fase exponencial final a produção de toxinas por célula foi estatisticamente superior relativamente à fase de adaptação ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). A 20 °C, verificou-se que a síntese de STXs por célula é praticamente constante ao longo do tempo, sendo que foi maior relativamente à fase de adaptação. Também se constatou que não houve diferenças significativas entre as duas temperaturas ($p > 0,05$; Teste-*t*), apesar de se averiguar uma menor produção de STXs por célula a 10 °C do que a 20 °C, à exceção da fase exponencial final e estacionária que apresentaram valores semelhantes (Figura 4.9 - A).

Os valores de concentração de STXs por célula nas culturas *C. issatschenkoi* LMECYA31 mantiveram-se com poucas variações ao longo do crescimento em cada uma das temperaturas, com exceção da fase exponencial final que apresentou valores superiores face às restantes fases. A 20 °C, este aumento foi estatisticamente superior ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) em relação à fase de adaptação e exponencial inicial.

A concentração de STXs por célula nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas a 10 °C foram menores que as que foram expostas a 20 °C. Não foi possível aplicar os testes estatísticos de modo a apurar diferenças estatisticamente significativas entre as duas temperaturas, uma vez que, como já foi referido, apenas foi possível quantificar por ELISA uma das amostras independentes (Figura 4.9 - B).

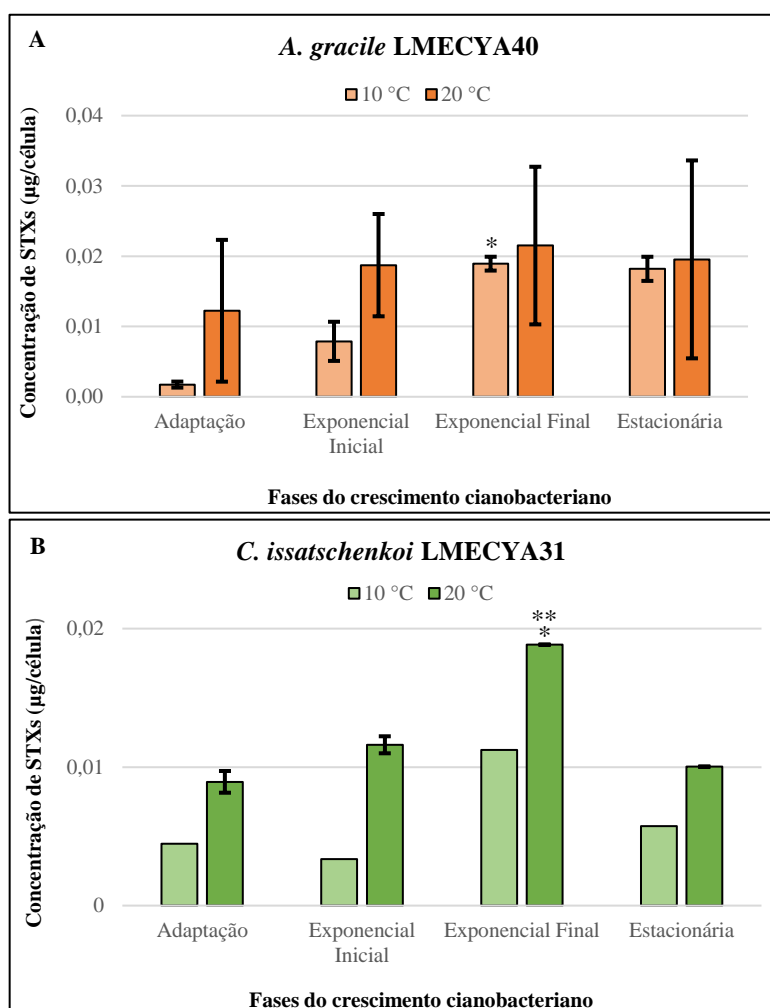


Figura 4.9 - Concentração de STXs por célula produzidas nas culturas de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B) nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média das concentrações de STXs por célula e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Um asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração de STXs por célula relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura; Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na concentração de STXs por célula relativamente à fase exponencial inicial na mesma condição de temperatura.

4.4 - Avaliação do número de heterócitos ao longo do tempo e relação com a concentração de STXs

4.4.1 - Produção de heterócitos ao longo do tempo

Observou-se a formação de heterócitos nas duas espécies em estudo (Figura 4.10) para as diferentes condições de temperatura. Usaram-se como parâmetros de avaliação da produção de heterócitos, a percentagem de filamentos com heterócitos e o número total de heterócitos em cada espécie e nas diferentes condições de temperatura. O segundo parâmetro descrito foi correlacionado, posteriormente, com as concentrações de STXs.

De forma geral, as culturas de *A. gracile* LMECYA40 apresentaram um número total de heterócitos muito superior, comparativamente às culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31. Os valores dos dois parâmetros analisados foram maiores nas culturas submetidas à temperatura de 10 °C (Figura 4.11).

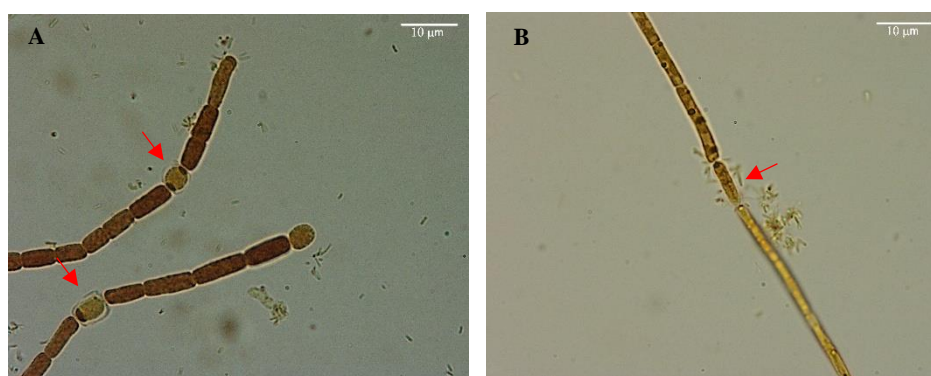


Figura 4.10 - Heterócitos de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e de *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B). A seta vermelha indica a sua posição.

Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, expostas a 10 °C, todos os filamentos observados apresentavam heterócitos na fase de adaptação e exponencial inicial. A **percentagem de filamentos com heterócitos** decresce moderadamente nas fases exponencial final e estacionária. O mesmo se verificou a 20 °C, em que se constatou um decréscimo da percentagem de filamentos com heterócitos ao longo do tempo. Estas diferenças na percentagem de filamentos, em cada temperatura, não foram significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*). A percentagem de filamentos com heterócitos obtida em cada fase a 10 °C não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*) face à percentagem observada a 20 °C, apesar de existir uma maior percentagem de filamentos com heterócitos na temperatura de 10 °C (Figura 4.11 - A).

Quanto ao **número total de heterócitos**, as culturas de *A. gracile* LMECYA40 a 10 °C, na fase de adaptação e a fase exponencial inicial apresentaram os valores mais elevados (95 e 121, respetivamente). Na fase exponencial final e estacionária, o número de heterócitos reduziu aproximadamente para metade em relação às primeiras fases do crescimento (53 e 42, respetivamente). Contudo, apenas se detetou um maior número total de heterócitos estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) na fase de estacionária comparativamente à fase adaptação. A 20 °C verificou-se o mesmo padrão, ou seja, as fases iniciais do crescimento cianobacteriano (adaptação e exponencial inicial) possuíram maior número de heterócitos (60 e 58, respetivamente) face às duas últimas fases (exponencial final e estacionária que continham 33 e 25 heterócitos, respetivamente). Esta diminuição do número total de heterócitos não foi significativa ($p > 0,05$; Teste-*t*). Em cada fase houve um maior número total de heterócitos nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas a 10 °C do que nas de 20

°C, sendo que só na fase exponencial final e na estacionária a diferença foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.11 - B).

Desta forma pôde-se averiguar que as fases onde se verificou uma maior percentagem de filamentos com heterócitos correspondeu às fases com um maior número total de heterócitos.

Relativamente às culturas *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas a 10 °C, a **percentagem de filamentos com heterócitos** e o **número total de heterócitos** mantiveram-se praticamente inalteráveis ao longo do crescimento cianobacteriano ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.11 - A). A 20 °C, as culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 não produziram heterócitos em nenhum dos momentos analisados. Não se detetaram diferenças estatisticamente significativas nestes dois parâmetros entre as duas temperaturas ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.11 - B).

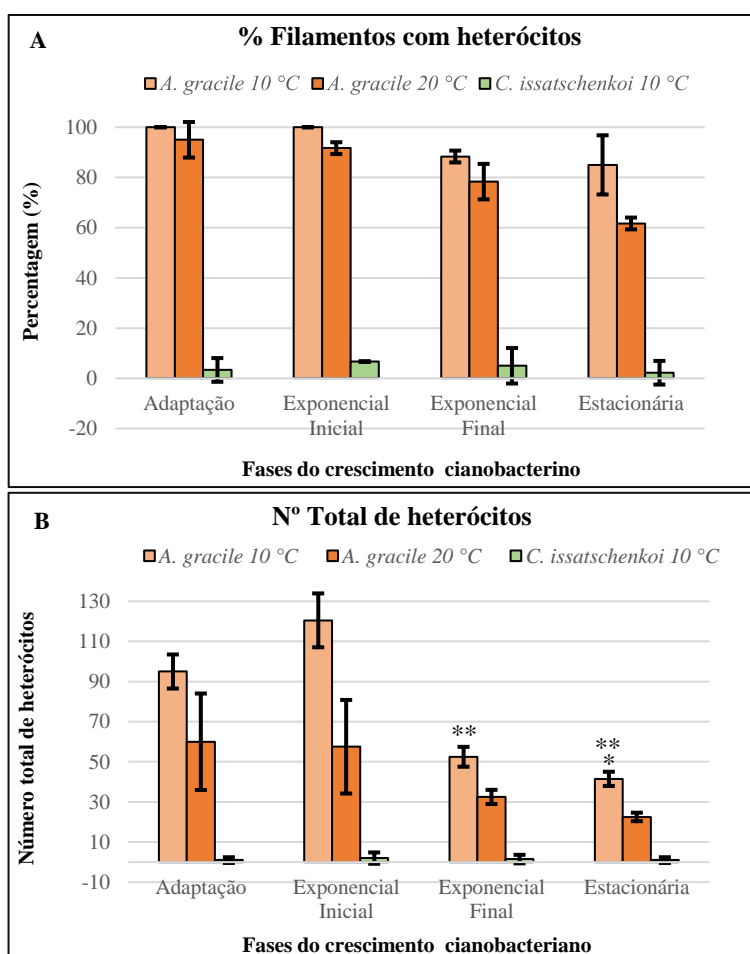


Figura 4.11 - Parâmetros que representam a evolução da produção de heterócitos nas espécies *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31. **(A)** Percentagem de filamentos com heterócitos e **(B)** número total de heterócitos nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média de cada um dos parâmetros e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Um asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no número total de heterócitos relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura; Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no número total de heterócitos relativamente à temperatura de controlo (20 °C).

4.4.2 - Relação entre o número total de heterócitos e a concentração de STXs totais ao longo do tempo

Assumindo que os heterócitos participam na fixação de N₂ atmosférico, e que as STXs são moléculas altamente nitrogenadas, colocou-se a hipótese de que as fases de crescimento ou a temperatura que induzissem a formação de uma maior quantidade de heterócitos levassem à síntese de

uma maior quantidade de STXs. De forma a averiguar esta possível relação, traçou-se um gráfico com número total de heterócitos e com a concentração de STXs totais (Figura 4.12). De uma forma geral, parece existir um maior número total de heterócitos em fases do crescimento antecedentes aos picos de concentrações de STXs (Figura 4.12).

Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, expostas a ambas as temperaturas, as fases do crescimento onde se observou um maior número de heterócitos (adaptação e exponencial inicial) corresponderam às fases onde se assistiu a uma produção mínima de STXs. O oposto se verificou na fase exponencial final e estacionária, onde a diminuição do número de heterócitos ocorreu em paralelo à fase de maior síntese das toxinas. Apesar das culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas a 10 °C apresentarem um maior número de heterócitos em todas as fases comparativamente às que foram expostas a 20 °C, isso não implicou uma maior produção de STXs totais (Figura 4.12 - A).

Por outro lado, as culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31, revelaram que apesar de haver um aumento da concentração de STXs ao longo do tempo, o número de heterócitos manteve-se praticamente constante. Também se verificou que a presença deste tipo de células especializadas a 10 °C não promoveu um aumento da produção de STXs totais, uma vez que as culturas desta estirpe a 20 °C conseguiram sintetizar uma maior quantidade de toxinas mesmo não apresentando heterócitos nos filamentos cianobacterianos (Figura 4.12 - B).

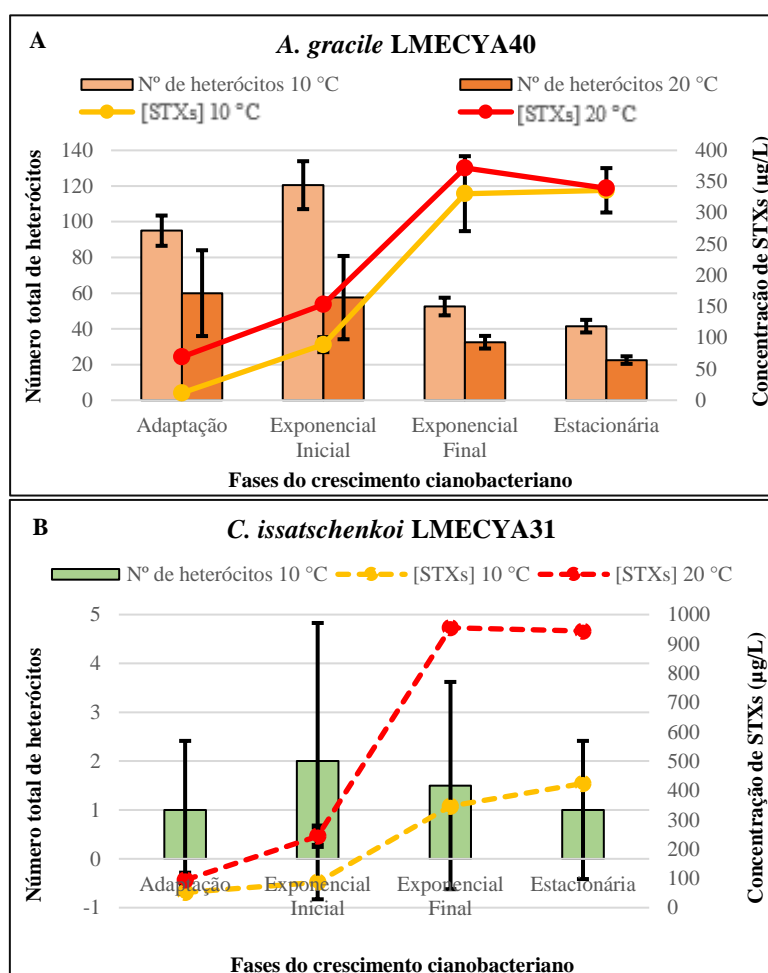


Figura 4.12 – Relação entre o número total de heterócitos e a concentração de STXs totais produzida pelas estirpes *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B) nas duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média de cada um dos parâmetros. As respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$).

4.5 - Avaliação da morfometria dos acinetos ao longo do tempo e relação com a concentração de STXs

4.5.1 - Morfometria dos acinetos ao longo do tempo

Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31, a presença de acinetos foi apenas observada à temperatura de 10 °C (Figura 4.13).

De forma geral, os acinetos de *C. issatschenkoi* LMECYA31 apresentaram um maior comprimento e um maior volume celular (Figura 4.14). Pelo contrário, os acinetos de *A. gracile* LMECYA40 apresentaram-se mais largos e com um menor volume celular. Esta estirpe também apresentou uma maior percentagem de acinetos livres em todas as fases do crescimento (Figura 4.14).

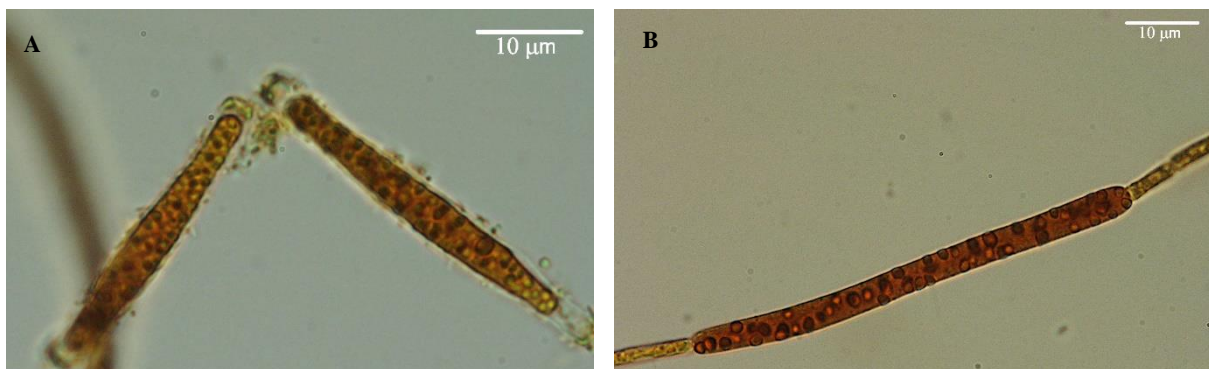


Figura 4.13 - Acinetos livres de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e um filamento com acinetos de *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B).

Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, o comprimento manteve-se constante ao longo do tempo. Em relação à largura, aumentou na fase exponencial inicial sendo que nas fases seguintes este parâmetro variou pouco (Figura 4.14 - A). Segundo Komárek (2013), a morfometria descrita relativamente aos acinetos da espécie *A. gracile* LMECYA40 estabelece um comprimento e uma largura máxima de 14,70 µm e 5,90 µm, respetivamente. O comprimento dos acinetos que foram observados neste estudo têm um valor muito elevado face a estes de referência. O contrário se verifica em relação à largura dos acinetos observados, com valores inferiores ao descrito (Figura 4.14 - A).

O volume de acinetos da espécie *A. gracile* LMECYA40 foi relativamente estável em todas as fases ($p > 0,05$; Teste-*t*). Verificaram-se diferenças na distribuição de acinetos observados ao longo do tempo. Nas duas primeiras fases (adaptação e exponencial inicial) aproximadamente 60 % dos acinetos eram livres, em contraste com as duas últimas fases (exponencial final e estacionária) onde o número aumentou para 95% (Figura 4.14 - B). No entanto esta variação ao longo do tempo não se refletiu em diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*).

Foi possível verificar que a manutenção do volume constante dos acinetos foi acompanhado pelo aumento da percentagem de acinetos livres.

Nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31, as dimensões dos acinetos atingiram valores máximos na fase exponencial inicial. Nas seguintes fases, o comprimento diminuiu e a largura manteve-se estável (Figura 4.14 - A). Em todas as fases do crescimento, os acinetos apresentaram um comprimento muito acima dos valores referenciados como máximos (Komárek, 2013) (Figura 4.14 - A). Relativamente à largura, verificou-se o contrário, o valor de referência é superior ao medido (Figura 4.14 - A).

No que diz respeito ao volume dos acinetos de *C. issatschenkoi* LMECYA31, à semelhança do comprimento e largura, verificou-se um máximo na fase exponencial inicial, decrescendo nas fases

posteriores. Neste parâmetro existiu uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Teste- t) entre a fase de adaptação e a fase exponencial inicial. Na fase exponencial (inicial e final) observou-se a mesma percentagem de acinetos livres (13,3%) diminuindo na fase estacionária (8,33%), não sendo esta diferença significativa ($p > 0,05$; Teste- t). Na fase de adaptação todos os acinetos estavam ligados às células vegetativas (Figura 4.14 - B).

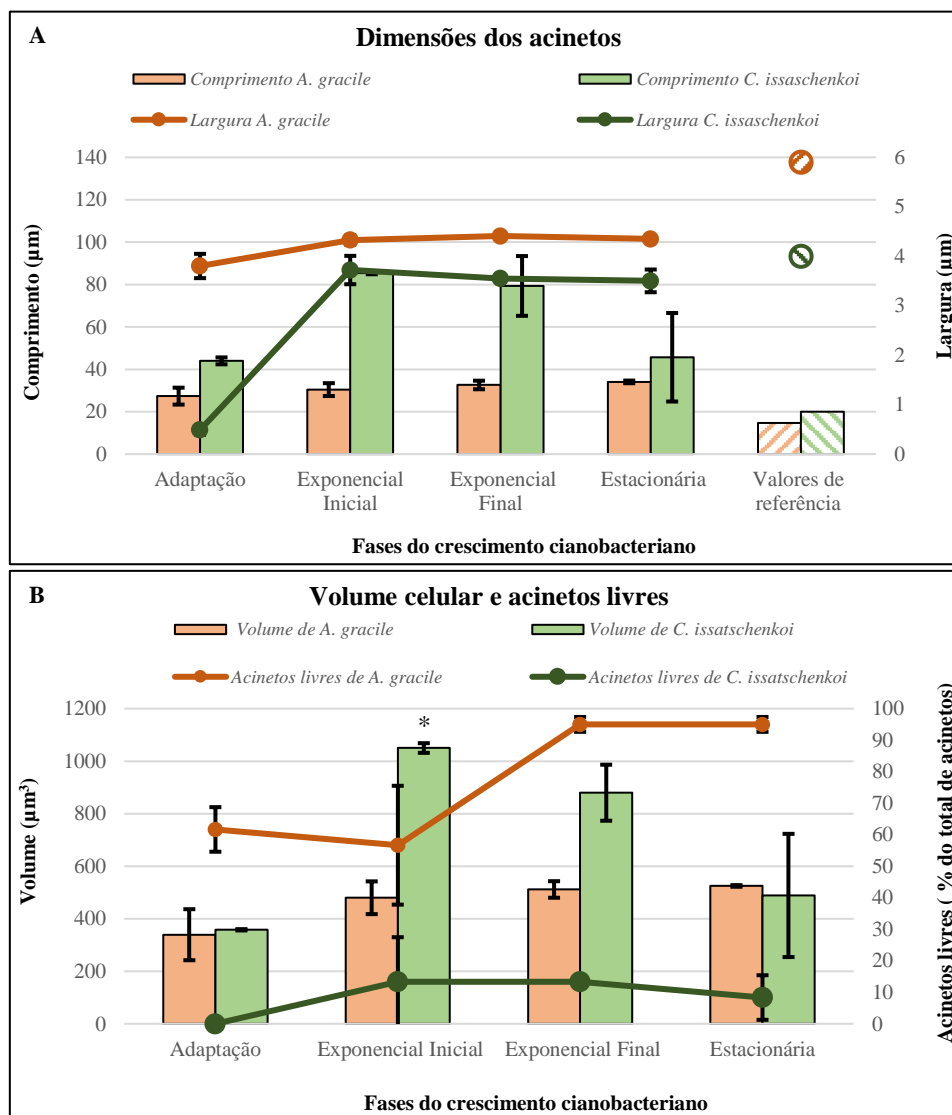


Figura 4.14 – Caracterização morfométrica de acinetos nas culturas de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 expostas à temperatura de 10 °C. (A) Comprimento e largura dos acinetos e (B) volume de acinetos e percentagem de acinetos livres ao longo de quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média de cada um dos parâmetros e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). O asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no volume celular de acinetos relativamente à fase de adaptação.

4.5.2 – Relação entre o volume celular de acinetos e a concentração de STXs totais ao longo do tempo

Os acinetos possuem grânulos de cianoficina (reservas de N_2) e as moléculas de STXs apresentam na sua constituição vários grupos de amina. Assim, poderia esperar-se que as fases onde as células produzem acinetos de grandes volumes correspondessem às fases com maior acumulação de grânulos de cianoficina, e, como consequência, haveria uma menor disponibilidade de arginina para sintetizar STXs. De modo a investigar esta hipótese, analisou-se a relação entre o volume de acinetos e a concentração de STXs totais a 10 °C (Figura 4.15).

De forma geral, nas duas estirpes em análise, o volume dos acinetos não se correlacionou com a produção de STXs ao longo do tempo. Na estirpe *A. gracile* LMECYA40, entre a fase de adaptação e a exponencial inicial há um pequeno aumento de volume de acinetos que foi acompanhado por um reduzido aumento de produção de STXs. Nas fases seguintes verifica-se a manutenção do volume de acinetos, apesar de se observar um aumento da produção das toxinas.

Quanto aos acinetos das culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31, o aumento drástico dos seus volumes entre a fase de adaptação e exponencial inicial foi acompanhado por um aumento da quantidade de STXs. Na fase exponencial final, a pequena diminuição do volume dos acinetos correspondeu a um aumento na produção de STXs. Por fim, na fase estacionária, houve uma diminuição no volume de acinetos que coincidiu com a manutenção das concentrações das toxinas.

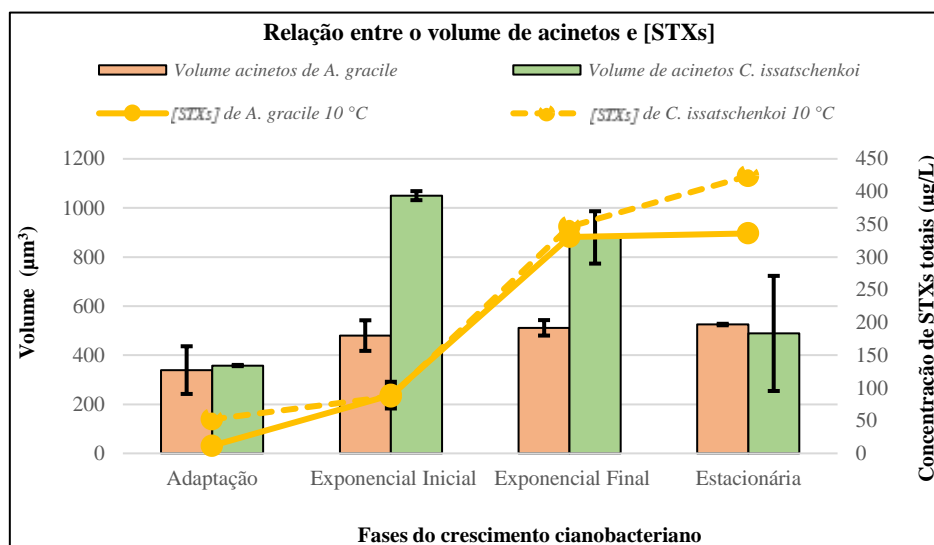


Figura 4.15 –Relação entre o volume de acinetos a 10 °C e concentração de STXs totais nas culturas de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média de cada um dos parâmetros e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$).

Também seria interessante que a produção destas toxinas fosse menor a 10 °C do que a 20 °C, tendo em conta que as culturas expostas a 20 °C não formaram acinetos. Na estirpe *A. gracile* LMECYA40, a presença de acinetos a 10 °C não alterou a produção de STXs, verificando-se assim, concentrações de toxinas muito idênticas nas culturas expostas a 10 e 20 °C. O oposto se verificou na estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, em que a produção de acinetos de grandes dimensões associou-se a uma diminuição da concentração de STXs quando comparadas com as culturas submetidas a 20 °C.

4.6 - Avaliação dos resultados de RT-real-time-qPCR

4.6.1 - Parâmetros das reações de RT-real-time-qPCR

Em todos os ensaios de RT-real-time-qPCR, as curvas-padrão obtidas apresentaram eficiências de amplificação (E) entre 0,82-1,02 e o coeficiente de regressão linear apresentou valores acima de 0,992 (Tabela 4.2). Após a análise das curvas de *melting*, estas apresentaram um único pico correspondendo a amplificações específicas dos genes em estudo. Nos controlos sem amostra (NTC) também não se detetaram amplificações de produtos inespecíficos (principalmente possíveis dímeros de *primers*).

Tabela 4.2 - Dados relativos aos parâmetros de validação, de cada gene em estudo, obtidos a partir das retas-padrão realizadas nos ensaios de *RT-real-time-qPCR*.

Gene	Espécie	R ²	Declive (m)	Ordenada na origem (b)	Eficiência da amplificação (E)
<i>rRNA 16S</i>	<i>A. gracile</i> LMECYA40	0,992	-3,412	18,68	0,96
	<i>C. issatschenkoi</i> LMECYA31	0,998	-3,712	18,033	0,86
<i>sxtA</i>	<i>A. gracile</i> LMECYA40	0,995	-3,506	20,931	0,93
	<i>C. issatschenkoi</i> LMECYA31	0,998	-3,686	20,081	0,87
<i>sxtM</i>	<i>A. gracile</i> LMECYA40	0,993	-3,282	20,477	1,02
	<i>C. issatschenkoi</i> LMECYA31	0,995	-3,44	20,069	0,95
<i>sxtPer</i>	<i>A. gracile</i> LMECYA40	0,994	-3,722	21,120	0,86
	<i>C. issatschenkoi</i> LMECYA31	0,994	-3,857	21,448	0,82

4.6.2 - Verificação da estabilidade do gene de referência (*rRNA 16S*)

Avaliou-se a estabilidade do gene de referência nas estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 entre as diferentes fases do crescimento e nas diferentes condições de temperatura (Figura 4.16). De uma forma geral, a estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31 obteve valores de Ct superiores aos obtidos em *A. gracile* LMECYA40, traduzindo-se numa maior expressão do gene *rRNA 16S* nesta espécie (Figura 4.16).

Na estirpe *A. gracile* LMECYA40 detetaram-se diferenças estatisticamente significativas na fase de adaptação e estacionária das culturas a 10 °C, comparativamente com as mesmas fases a 20 °C ($p \leq 0,05$), revelando que a expressão do gene *rRNA 16S* variou quando a cultura foi exposta a diferentes condições de temperatura (10 e 20 °C).

A expressão deste gene também não foi estável ao longo do tempo à temperatura de 20 °C, uma vez que a expressão génica foi estatisticamente diferente entre a fase exponencial final e a fase de adaptação e exponencial inicial ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). No que diz respeito à temperatura de 10 °C verificou-se uma estabilidade da expressão do gene *rRNA 16S* ao longo das diferentes fases do crescimento analisadas ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.16 - A).

Nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas a 10 e 20 °C observou-se que em quase todas as fases do crescimento, os valores de Ct foram muito semelhantes ($p > 0,05$; Teste-*t*), inferindo-se assim uma estabilidade na expressão génica do gene *rRNA 16S*. Verificou-se uma exceção na fase estacionária, cujos níveis de expressão a 10 °C foram estatisticamente inferiores aos observados na mesma fase a 20 °C e inferiores em relação à fase exponencial inicial a 10 °C ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.16 - B).

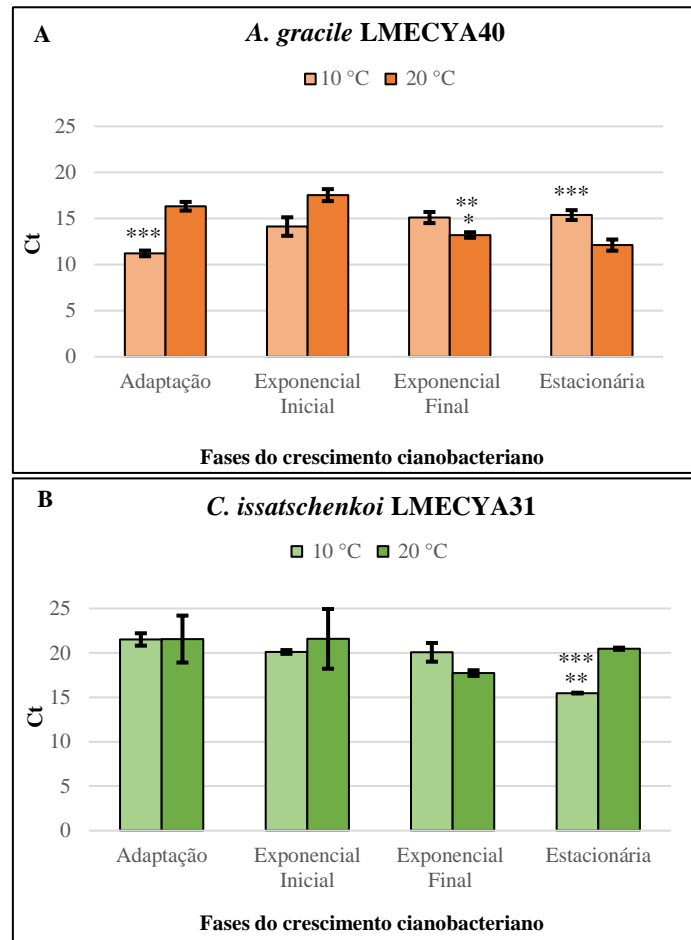


Figura 4.16 – Estabilidade do gene de referência (*rRNA 16S*) para as estirpes *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 (A) e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31 (B) sob as duas condições de temperatura em estudo (10 e 20 °C) ao longo das quatro fases de crescimento. Os dados apresentados mostram a média dos valores de Ct, obtidos durante a reação de *RT-real-time-qPCR*, e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Um asterisco (*) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) no valor de Ct relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura; Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no valor de Ct relativamente à fase de exponencial inicial na mesma condição de temperatura; Três asteriscos (***) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no valor de Ct relativamente à temperatura de controlo (20 °C).

4.6.3 - Efeito da temperatura na expressão de genes pertencentes ao *cluster sxt: sxtA, sxtM e sxtPer*

A expressão do gene *sxtA*, que participa na síntese de STXs, não foi detetado em nenhum dos ensaios de *RT-real-time-qPCR* realizados nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C ao longo de todas as fases do crescimento estipuladas. Uma vez que não se detetou os transcritos de *sxtA*, tentou-se detetar os de *sxtI*. A enzima StxI é uma carbomoiiltransferase que é responsável por adicionar o grupo carbomoiil à molécula dcSTX resultando na molécula final de STX. No entanto, também não foi possível a sua deteção.

Os genes *sxtM* e *sxtPer* codificam duas proteínas responsáveis por transportar as STXs para o meio extracelular. Os transcritos destes genes foram detetados nas duas temperaturas em estudo (10 e 20 °C) e ao longo de todo o crescimento.

Para as duas espécies em estudo, de forma a estudar o efeito que a temperatura de 10 °C teve nos níveis de transcrição, estabeleceu-se como condição controlo os níveis de expressão a 20 °C (assim define-se a sua expressão relativa igual a 1) (Figura 4.17).

Na espécie *A. gracile* LMECYA40, os níveis de expressão de *sxtM* (Figura 4.17 - A) e *sxtPer* (Figura 4.17 - B) variaram de forma semelhante. Para ambos os genes, à temperatura de 10 °C, observou-se uma sub-expressão significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) nas duas primeiras fases face à temperatura de controlo. Contrariamente, nas últimas duas fases houve uma sobre-expressão sem se apurar diferenças significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.17 - A, B).

Relativamente à espécie *C. issatschenkoi* LMECYA31, a temperatura também induziu diferenças nos níveis de expressão de *sxtM* e *sxtPer* (Figura 4.17 - C, D). À temperatura de 10 °C verificou-se uma sub-expressão dos transcritos do gene *sxtM* nas fases de adaptação e estacionária. No entanto, esta foi estatisticamente inferior apenas na fase estacionária ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). Na fase exponencial (inicial e final) houve uma sobre-expressão dos transcritos ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.17 - C). De uma forma geral, os transcritos de *sxtPer* apresentaram uma sub-expressão à temperatura de 10 °C face à temperatura de 20 °C. Mas apenas na fase estacionária é que a sub-expressão foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). Pelo contrário, na fase exponencial final observou-se uma maior expressão dos transcritos *sxtPer* à temperatura de 10 °C (Figura 4.17 - D).

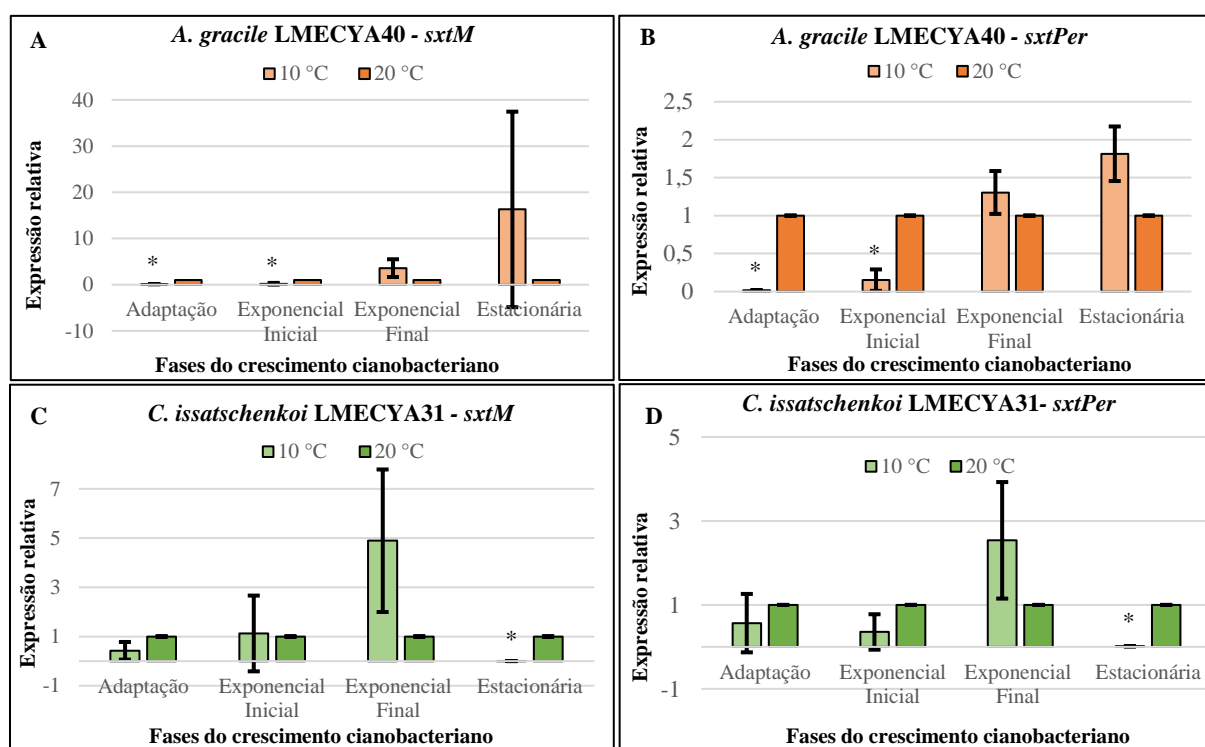


Figura 4.17 – Expressão relativa dos genes *sxtM* e *sxtPer* durante o crescimento a 10 e 20 °C. Expressão do gene *sxtM* (A) e do gene *sxtPer* (B) nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C; Expressão do gene *sxtM* (C) e do gene *sxtPer* (D) nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C. Os dados apresentados mostram a média dos valores de expressão relativa, usando como condição controlo o nível de expressão na temperatura de 20 °C para cada fase (Expressão = 1). As respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Asterisco (*) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) na expressão génica relativamente à temperatura de controlo (20 °C).

De forma a analisar a influência que o tempo de cultura teve na expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer*, em cada temperatura fixou-se como condição controlo os níveis de expressão obtidos na fase de adaptação (assim define-se a sua expressão relativa igual a 1). Esta análise foi feita para ambas as espécies em estudo (Figura 4.18).

Na espécie *A. gracile* LMECYA40, verificou-se um aumento gradual da expressão do gene *sxtM* para a temperatura de 10 °C, nas fases exponencial final e estacionária ($p > 0,05$; Teste-*t*). À temperatura

de 20 °C, em todas as fases, constatou-se uma sub-expressão do gene *sxtM* sendo esta diferença apenas significativa na fase exponencial final ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.18 - A).

Quanto ao gene *sxtPer*, na temperatura de 10 °C, observaram-se elevados níveis de expressão dos seus transcritos ao longo do tempo, com diferenças estatisticamente significativas na fase exponencial final ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). À temperatura de 20 °C, para além da fase exponencial inicial em que houve um ligeiro aumento, as fases seguintes demonstraram uma sub-expressão significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.18 - B).

Nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas a 10 °C, os níveis de transcritos *SxtM* diminuíram em todas as fases em análise relativamente à fase de adaptação, mas só na fase estacionária essa redução foi significativa ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). À temperatura de 20 °C, houve uma sub-expressão estatisticamente significativa deste gene na fase exponencial final ($p \leq 0,05$; Teste-*t*). Contrariamente, na fase estacionária ocorreu uma sobre-expressão dos transcritos *SxtM*, apesar de não se apurarem diferenças significativas ($p > 0,05$; Teste-*t*) (Figura 4.18 - C). No que se refere ao gene *sxtPer* não se apuraram diferenças estatisticamente significativas entre as diversas fases do crescimento em cada temperatura ($p > 0,05$; Teste-*t*). Destaca-se apenas uma sobre-expressão do gene *sxtPer* na fase estacionária a 20 °C (Figura 4.18 - D).

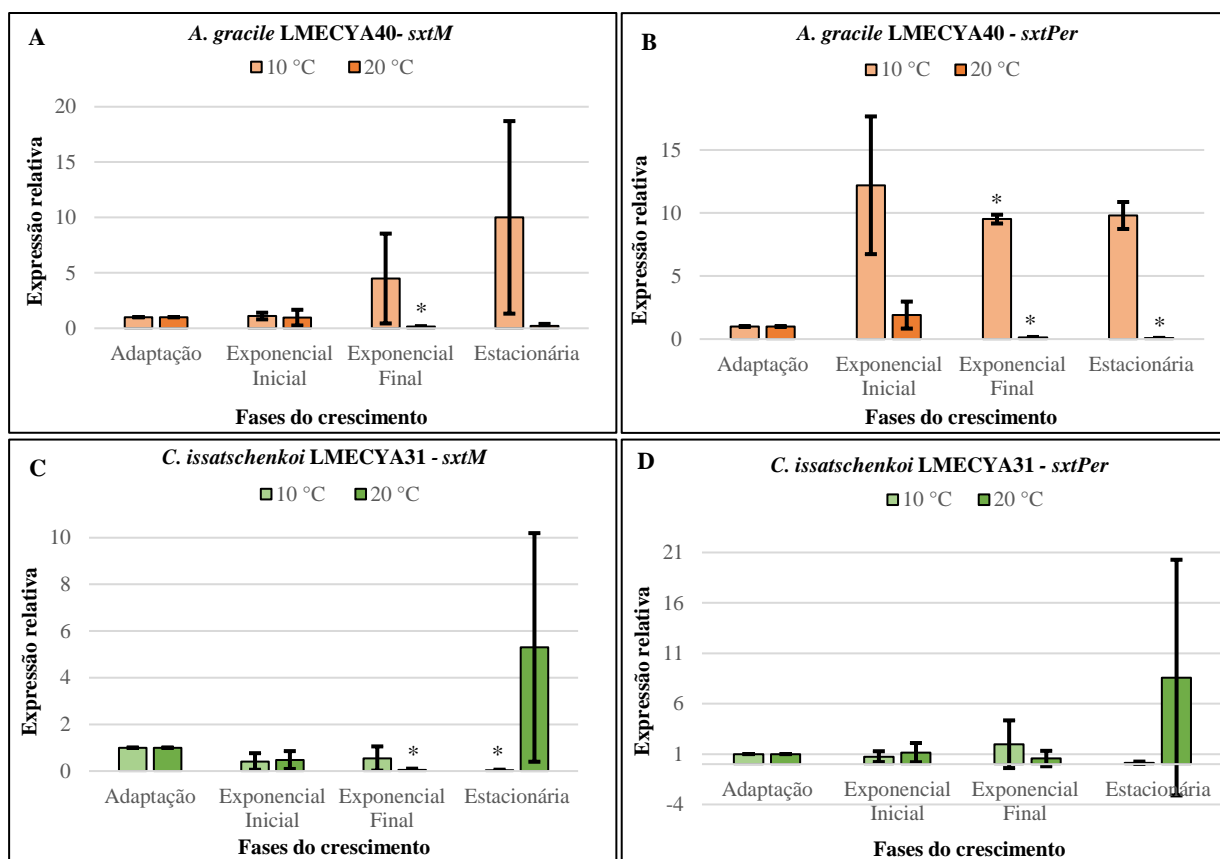


Figura 4.18 - Expressão relativa dos genes *sxtM* e *sxtPer* durante o crescimento a 10 e 20 °C: Expressão do gene *sxtM* (A) e do gene *sxtPer* (B) nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C; Expressão do gene *sxtM* (C) e do gene *sxtPer* (D) nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas às temperaturas de 10 e 20 °C. Os dados apresentados mostram a média dos valores de expressão relativa, usando como condição controlo o nível de expressão na fase de adaptação para cada temperatura (Expressão = 1). As respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$). Asterisco (*) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na expressão génica relativamente à fase de adaptação na mesma condição de temperatura.

4.6.4 - Avaliação da relação entre a expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* e a concentração de STXs totais

Assumindo que os transcritos dos genes *sxtM* e *sxtPer* participam no transporte das STXs para o exterior das células, averiguou-se se o aumento dos níveis de expressão de *sxtM* e *sxtPer* ocorreram em simultâneo com o aumento da concentração de STXs totais. De forma a avaliar esta relação, os níveis de expressão dos dois genes foram traçados em simultâneo com a concentração de STXs totais. Esta análise foi realizada ao longo do tempo de crescimento (Figura 4.19) e nas diferentes condições de temperatura (Figura 4.20).

No que diz respeito à progressão ao longo do tempo, nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas à temperatura de 10 °C, constatou-se que os elevados níveis de transcritos SxtM corresponderam a uma elevada concentração STXs totais. O contrário se observou a 20 °C, cujo aumento da concentração de STXs correspondeu com uma sub-expressão do gene *sxtM* (Figura 4.19 - A).

A 10 °C, os elevados níveis de transcritos *sxtPer* coincidiram com as elevadas concentrações de STXs. A 20 °C houve um pequeno aumento dos níveis de *sxtPer* que coincidiu com o pequeno aumento da concentração STXs, na fase exponencial inicial, contudo nas fases seguintes houve um elevado aumento das concentrações de toxinas que não foi acompanhado pelo aumento dos níveis de transcrição do gene (Figura 4.19 - B).

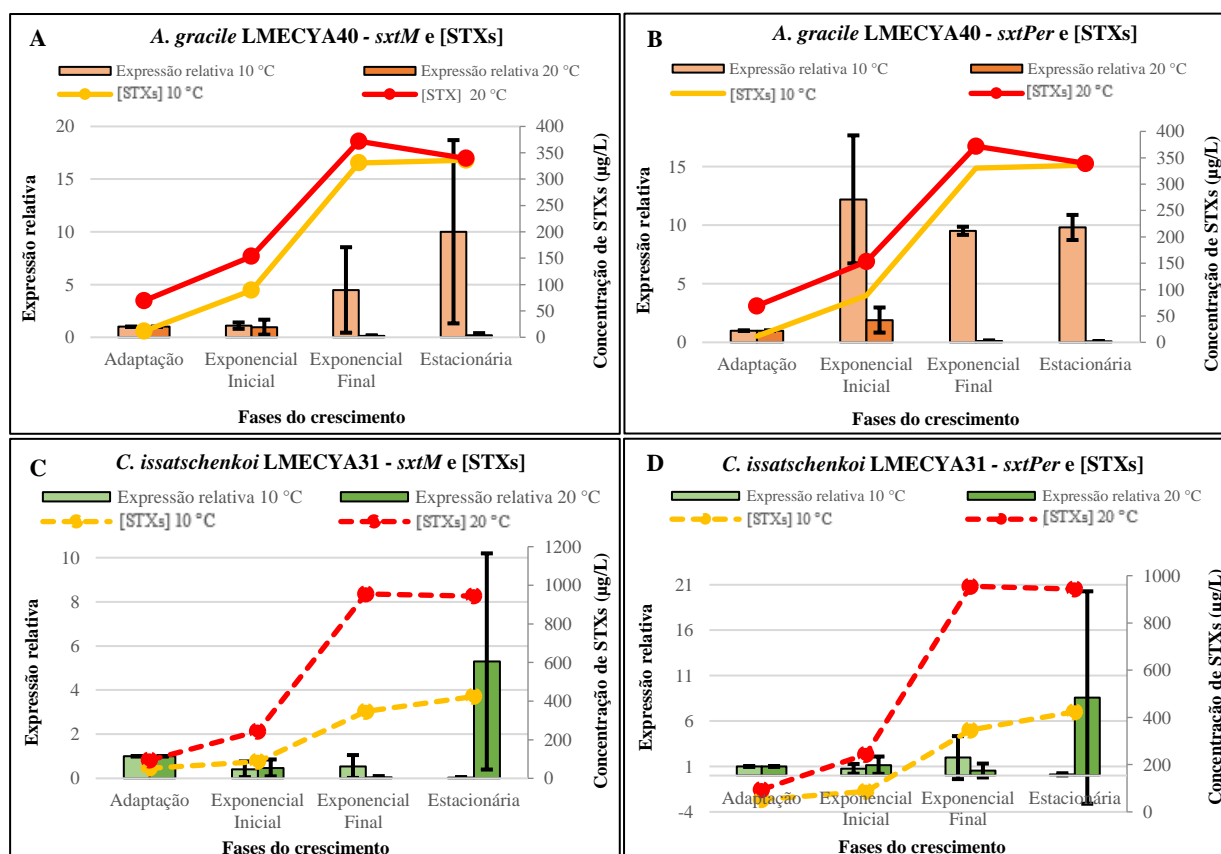


Figura 4.19 – Relação entre a concentração de STXs e os níveis de expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* ao longo do tempo: Relação entre os níveis de expressão do (A) gene *sxtM* e do (B) gene *sxtPer* nas culturas de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40, expostas às temperaturas de 10 e 20 °C; Relação entre os níveis de expressão do (C) gene *sxtM* e do (D) gene *sxtPer* nas culturas de *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31, expostas às temperaturas de 10 e 20 °C. Os dados apresentados mostram a média de cada um dos parâmetros, usando como condição controlo o nível de expressão na fase de adaptação para cada temperatura (Expressão = 1). As respetivas barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$).

Já nas culturas *C. issatschenkoii* LMECYA31 expostas à temperatura de 10 °C, os níveis de transcritos *SxtM* foram sempre inferiores aos níveis de expressão na fase de adaptação, contudo a concentração das toxinas foi sempre aumentando, atingindo o seu máximo na fase estacionária. Relativamente à temperatura de 20 °C, os níveis de transcritos foram sempre menores que os da fase de adaptação, apesar de aumentarem na fase estacionária. Só nesta fase houve uma correspondência entre os dois parâmetros (Figura 4.19 - C).

Tanto a 10 °C como a 20 °C apenas houve um único momento em que se detetou uma correspondência entre os elevados níveis de STXs e os maiores níveis de expressão observados para o *SxtPer*. Para a primeira temperatura verifica-se esta relação na fase exponencial final, para a segunda na fase estacionária (Figura 4.19 - D).

Na estirpe *A. gracile* LMECYA40, no caso dos genes *sxtM* e *sxtPer*, o aumento dos seus níveis de expressão a 10 °C coincidiu com a maior produção de STXs (Figura 4.20 - A e B).

Relativamente à estirpe *C. issatschenkoii* LMECYA31, na fase exponencial final, os elevados níveis de transcritos *SxtM* e *SxtPer* corresponderam a um aumento da concentração de STXs. O contrário se verificou na fase estacionária, onde se observou uma diminuição nos níveis de transcrição destes genes, apesar de se ter atingindo a concentração máxima de STXs totais (Figura 4.20 - C e D).

A mesma análise não se efetuou para a temperatura de 20 °C, uma vez que os níveis de expressão génica foram normalizados face a esta temperatura de controlo, tendo uma expressão igual a 1. Por este motivo, não houve forma de relacionar os níveis de expressão a 20 °C com a quantificação de STXs quando se pretendeu avaliar a influência da temperatura.

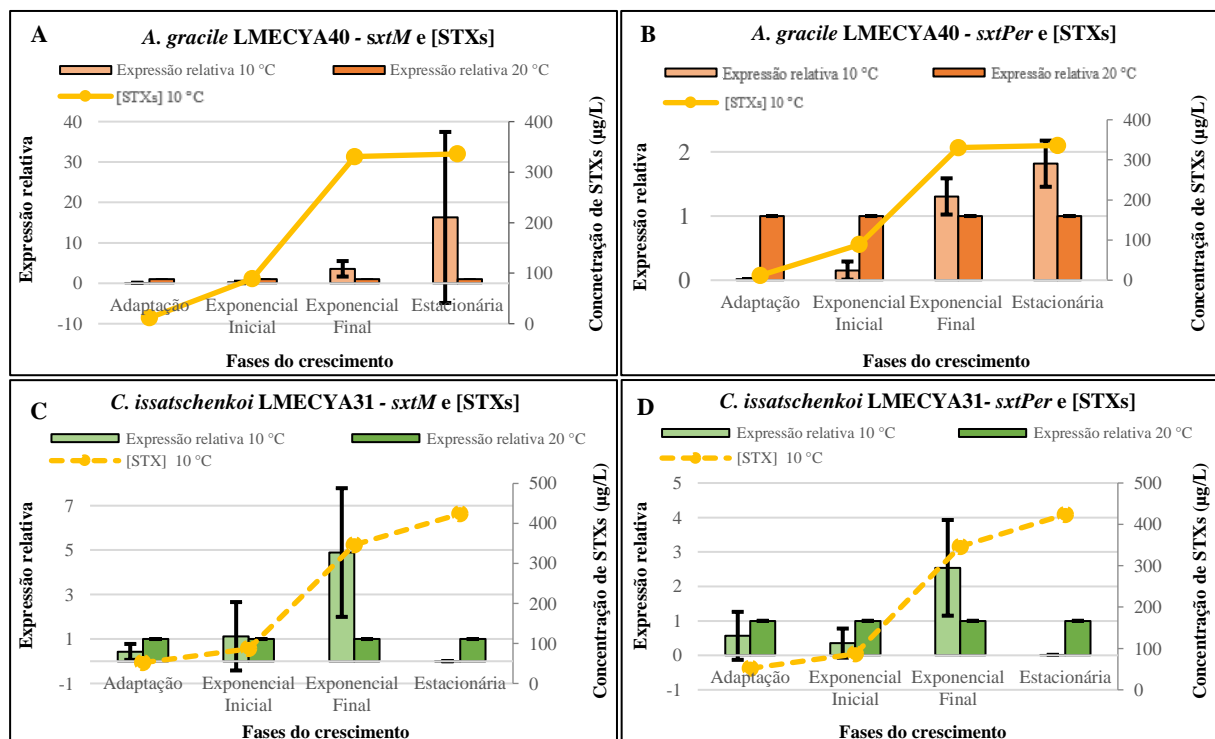


Figura 4.20 – Relação entre a concentração de STXs e os níveis de expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* a 10 °C: Relação entre os níveis de expressão do (A) gene *sxtM* e do (B) gene *sxtPer* nas culturas de *Aphanizomenon gracile* LMECYA40, expostas às temperaturas de 10 e 20 °C; Relação com os níveis de expressão do (C) gene *sxtM* e do (D) gene *sxtPer* nas culturas de *Cuspidothrix issatschenkoii* LMECYA31, expostas às temperaturas de 10 e 20 °C. Os dados apresentados mostram a média dos valores de cada parâmetro usando como condição controlo o nível de expressão na temperatura de 20 °C para cada fase (Expressão = 1). As barras de erro representam o desvio padrão de duas amostras independentes ($n = 2$).

5. Discussão

Cumprindo-se os objetivos deste trabalho, avaliaram-se os diversos parâmetros propostos relativos ao crescimento e à produção de STXs ao longo do crescimento cianobacteriano das estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31, mantidas a duas temperaturas (10 e 20 °C).

5.1 - Seleção das temperaturas em estudo

As espécies *A. gracile* e *C. issatschenkoi* são cianobactérias planctónicas pertencentes à ordem Nostocales, que possuem uma grande plasticidade ecológica e a capacidade de produzir STXs. São ambas consideradas espécies cosmopolitas, porém *A. gracile* é descrita como sendo a espécie produtora de STXs mais disseminada em todo o mundo e mais abundante nos locais onde se verifica a sua presença (Cirés & Ballot, 2016; Mehnert *et al.*, 2010).

A temperatura é um fator abiótico chave na regulação do crescimento de cianobactérias e presumivelmente é responsável por afetar a sua expansão geográfica (Cirés & Ballot, 2016). Perante o cenário de aquecimento global, torna-se relevante e necessário estudar a ecofisiologia destas espécies principalmente no que diz respeito à forma como respondem às alterações do padrão de temperaturas (Paerl & Paul, 2012). A seleção das temperaturas a testar para este estudo baseou-se na junção de dois critérios: temperaturas que se aproximassem de condições de temperatura reportadas em contexto real e temperaturas favoráveis para o crescimento cianobacteriano. Este último fator é tido em conta uma vez que foi descrito que as cianobactérias produzem preferencialmente STXs sob contextos favoráveis ao seu desenvolvimento (Pomati *et al.*, 2004). Neste ensaio foi escolhida a temperatura de 20 °C como controlo pelo facto de ser a temperatura a que as culturas são mantidas na coleção ESSACC. As espécies *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 têm sido mantidas nesta situação há 15 e 19 anos, respetivamente, revelando que estão bastante aptas a desenvolver-se nesta temperatura. Para além disso, a temperatura média das águas do sul de Portugal (local onde estas estirpes foram isoladas) é 16 ± 1 °C, sendo, portanto, a temperatura 20 °C uma temperatura possível de ocorrer de forma frequente nos corpos de água tendo em consideração o atual contexto de alterações climáticas (Instituto da Água, 2008; Tomé, 2007). Por outro lado, Mehnert *et al.* (2010) demonstraram também que *A. gracile*, em comparação com espécies invasoras, tem taxas de crescimento relativamente altas a temperaturas baixas (entre 10 e 15 °C). Isto levanta a hipótese de que talvez *A. gracile* possa iniciar o seu desenvolvimento e formação de *blooms* precocemente, como na primavera, e prolongar o seu crescimento também após o verão. Quanto à espécie *C. issatschenkoi*, até à data, só foi realizado um estudo sobre o efeito que da temperatura no seu crescimento, mas nesse estudo apenas se testaram duas temperaturas (22 e 28 °C) (Dias *et al.*, 2002). No entanto, sabe-se que a sua presença desta espécie já foi descrita em países como por exemplo, França, Alemanha, Polónia e Finlândia (Cirés & Ballot, 2016), o que poderá indiciar que também se desenvolve e atinge taxas de crescimento relativamente elevadas a baixas temperaturas. Deste modo, a forma como esta espécie reage a baixas temperaturas é desconhecida, e, portanto, neste trabalho escolheu-se também a temperatura de 10 °C.

Na literatura está referido que a temperatura ótima de crescimento de *A. gracile* situa-se entre 23 e 28 °C e de *C. issatschenkoi* em 28 °C (Cirés *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2002). Portanto, apesar de ambas as espécies poderem apresentar um crescimento ótimo à temperatura de 28 °C (Dias *et al.*, 2002; Mehnert *et al.*, 2010) e estar descrito que *A. gracile* decresce a sua taxa de crescimento a temperaturas superiores a 28 °C (Mehnert *et al.*, 2010), um estudo feito nesta espécie demonstrou que temperaturas acima da ótima induzem um aumento da concentração de STX total (Cirés *et al.*, 2017). Adicionalmente, está descrito que vários rios e reservatórios de água no mediterrâneo podem atingir temperaturas acima dos 30 °C (Mehnert *et al.*, 2010) e estudos moleculares também revelaram uma expressão máxima de genes pertencentes ao *cluster sxt* a temperaturas de 30 °C (Cirés *et al.*, 2017). Desta forma, neste estudo estipulou-se os 30 °C como a temperatura máxima a testar.

5.2 - Efeito da temperatura nas curvas de crescimento e na morfologia

Todas as culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas à temperatura de 30 °C exibiram curvas de crescimento com DOs baixas, inferindo-se, assim, a inibição do seu crescimento nesta condição. O efeito negativo desta temperatura no crescimento foi observável morfológicamente, uma vez que as culturas apresentaram um aspeto pouco “saudável” quando comparadas com as culturas expostas a 10 e 20 °C. A nível macroscópico as culturas expostas a 30 °C apresentaram uma cor verde-esbranquiçada, o que está de acordo com o observado por Chaneva *et al.* (2007) que reportaram que a inibição do crescimento a elevadas temperaturas é acompanhada pelo desaparecimento da pigmentação. Sob condições de *stress*, a concentração de clorofila diminui drasticamente (Chaneva *et al.*, 2007). Para além disso, microscopicamente, observou-se a fragmentação dos filamentos cianobacterianos que pode indiciar a formação de ROS (espécies reativas ao O₂), tal como descrito previamente em *Anabaena variabilis* PCC 7937 (Rastogi *et al.*, 2010). Estes autores reportaram que nestas condições, ocorre a morte celular programada, o que provoca uma lise seletiva das células severamente danificadas (Rastogi *et al.*, 2010, 2014). Por outro lado, Hu (2004) descreve que elevadas temperaturas levam à acumulação de reservas de carbono ou nitrogénio, o que pode justificar a atípica acumulação intracelular que se verificou nas células ao nível microscópico.

Porém, estes resultados não estão de acordo com os reportados na literatura para estas duas espécies. Cirés *et al.* (2017), Mehnert *et al.* (2010) e Lürling *et al.* (2013) descrevem o crescimento da espécie *A. gracile* à temperatura de 30 °C. Quanto à espécie *C. issatschenkoi*, até à data, não se realizou nenhum estudo que testasse o efeito de 30 °C no seu crescimento, contudo Dias *et al.* (2002) verificou o seu crescimento a uma temperatura próxima, 28 °C. As diferenças encontradas entre este estudo e outros publicados podem ser explicadas pelo facto de haver uma limitação no desenho experimental. A estufa testada não possuía um arejamento contínuo, situação que se verifica, por exemplo, na câmara onde se mantém todas as culturas pertencentes à coleção ESSACC e na câmara de *Fitoclima*. As trocas gasosas que ocorrem entre o meio exterior e o meio interior de um *T-flask* permitem que haja uma renovação do ar constante. Isto é fundamental por dois motivos: primeiro porque é uma forma de fazer circular o meio de cultura para que todas as células das cianobactérias obtenham a mesma quantidade de nutrientes. Segundo, permite que as células tenham acesso a novo CO₂ e libertem O₂ para o exterior do *T-flask*. Caso os níveis de O₂ sejam elevados, a fotossíntese fica comprometida assim como o crescimento cianobacteriano. No que se refere ao banho a 30 °C, a falta de arejamento não se propõe como fator limitante, uma vez que se encontravam dentro da câmara onde se mantêm as culturas da coleção ESSACC (onde há um arejamento contínuo). No entanto, uma vez que as culturas estavam submersas em água (menos a tampa) não havia forma de averiguar se a intensidade luminosa que chegava às cianobactérias era igual às que se verificavam na câmara de *Fitoclima*, pondo em causa a sua taxa fotossintética e conseqüente crescimento durante longos períodos.

Relativamente aos efeitos das temperaturas de 10 e 20 °C, as culturas expostas a 10 °C tiveram uma taxa de crescimento significativamente menor que as culturas que foram expostas a 20 °C. Desta forma pode-se estabelecer uma relação entre a diminuição da temperatura e a diminuição da taxa de crescimento específica. Estes resultados estão de acordo com outros previamente publicados. Mehnert *et al.* (2010) testaram um intervalo maior de temperaturas (10 – 40 °C), tendo observado um aumento da taxa de crescimento desde a temperatura mínima até aos 27,5 °C. Casero *et al.* (2014) verificaram que diferentes temperaturas (15, 20 e 28 °C) tiveram efeito no crescimento de *A. gracile*, sendo a taxa de crescimento mínima registada a 15 °C. Em Cirés *et al.* (2017) houve um aumento de taxa de crescimento quando se aumentou a temperatura de 12 para 23 °C (havendo um decréscimo a 30 °C).

No que concerne à espécie *C. issatschenkoi* LMECYA31, a diminuição da temperatura de 20 para 10 °C também resultou na redução da taxa de crescimento. Contudo até à data não existe nenhum estudo que analise o efeito que temperaturas baixas têm no crescimento desta espécie.

O facto de a 10 °C ambas as espécies apresentarem taxas de crescimento específico menor ou um tempo de duplicação maior pode ser explicado de várias formas. A vasta colonização de diferentes *habitats* indica que elas podem lidar com um amplo espectro de *stress* ambiental, incluindo o frio. O desenvolvimento de vários mecanismos confere-lhes uma defesa contra essas condições desfavoráveis (Singh *et al.*, 2002). Um exemplo disto é a aclimatização, que se baseia numa resposta induzida por uma mudança ambiental que causa uma alteração fenotípica sem alteração na base genética (Huner *et al.*, 1998). As baixas temperaturas induzem a insaturação dos ácidos gordos dos lípidos da membrana celular e da membrana dos tilacóides. As membranas tornam-se menos rígidas para compensar a diminuição da fluidez da membrana que de outra forma ocorreria a baixas temperaturas. Para tal, é necessária a síntese de desnaturases que permitam que este processo de aclimatização ocorra a baixas temperaturas (Hu 2004; Singh *et al.*, 2002). Para além disso, estas condições de temperatura também são descritas como indutoras de uma acumulação celular de aminoácidos ou derivados de aminoácidos que podem contribuir para aumentar a tolerância das cianobactérias ao frio (Hu 2004). Todas estes processos moleculares de aclimatização despendem energia proveniente da fotossíntese, e deste modo as cianobactérias poderão ter menor reservas para investir no seu crescimento (Huner *et al.*, 1998). Para além deste gasto adicional de energia, a baixas temperaturas também se verifica uma diminuição das taxas de fixação de CO₂, inibição da eliminação de ROS e do sistema reparador do fotossistema II (Torzillo *et al.*, 1998). Adicionalmente, as baixas temperaturas têm sido descritas como responsáveis por menores taxas de absorção de nutrientes, que levam à fotoinibição (Sakamoto & Bryant, 1997). Todas estas razões constituem possíveis causas para a diminuição das taxas fotossintéticas e consequentes diminuições nas taxas de crescimento das culturas expostas à temperatura de 10 °C.

5.3 - Efeito da temperatura nas concentrações celulares e produção de STXs

De uma forma geral, as culturas *C. issatschenkoi* LMECYA31 atingiram concentrações celulares mais elevadas que *A. gracile* LMECYA40. Isto pode ser explicado porque *A. gracile* LMECYA40 apresentou sempre na sua constituição a formação de heterócitos, e por isso as células tiveram menores recursos energéticos para se dividirem. A fixação de N₂ por estas células especializadas e a posterior deslocação para as células vegetativas torna este processo energeticamente dispendioso (Frank *et al.* 2007; Stal *et al.*, 2010). As concentrações celulares das culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 apresentaram, na maior parte das fases do crescimento analisadas, valores mais elevados a 20 °C. Elevadas temperaturas promovem o aumento da taxa de crescimento, tal como atrás referido. A 20 °C talvez haja mais energia redirecionada para o crescimento uma vez que há uma menor taxa de fotoinibição dos fotossistemas e uma maior absorção de nutrientes. Todos estes fatores levam a que as culturas cresçam saudavelmente, dividindo-se mais e atingindo concentrações celulares mais elevadas. Também se observou que a produção de STXs se relacionava com a temperatura, e que a maior produção ocorre à temperatura mais elevada (20 °C). Isto está de acordo com o Cirés *et al.* (2017) e Dias *et al.* (2002) que descrevem que temperaturas ótimas de crescimento promovem maiores concentrações de STXs em culturas *C. issatschenkoi* LMECYA31 e *A. gracile* UAM529. Contudo, o oposto verifica-se em Casero *et al.* (2014) e Castro *et al.* (2004) em que não detetaram uma correlação entre a temperatura ótima e a produção de STXs totais nas estirpes *A. gracile* UAM529 e *C. raciborskii* C10.

Posteriormente, pretendeu-se perceber se a densidade celular se relacionava com a concentração de STXs totais produzida em cada uma das temperaturas. Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 expostas a 10 °C, o aumento da densidade celular traduziu-se num aumento da concentração de STXs. Nas culturas expostas a 20 °C, o aumento da densidade até à fase exponencial final refletiu-se numa maior quantidade de STXs totais, apesar da fase estacionária apresentar um maior

número de células sem conseqüente aumento de concentração de STXs. De uma forma geral, estes resultados sugerem que há uma relação entre o aumento das concentrações celulares e a quantidade de STXs totais. Dependendo da temperatura em análise, as fases nas quais se observa uma maior produção de STXs são a fase exponencial final e a fase estacionária. À semelhança deste estudo, trabalhos anteriores reportaram, nestas mesmas espécies, que os momentos onde se verificou uma maior produção de STXs corresponderam às fases exponencial e estacionária. Relativamente à espécie *A. gracile* UAM529 (Cirés *et al.*, 2017) e *C. issatschenkoi* LMECYA31 (Dias *et al.*, 2002), estas produziram uma maior quantidade de toxinas na fase exponencial final em todas as condições de temperatura testadas e na ausência de N₂, respetivamente. Quando se estudou a influência da temperatura e diferentes concentrações de P na estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, a maior produção ocorreu na fase estacionária (Dias *et al.*, 2002).

Relativamente à concentração de STXs por célula (*toxin quota cell*), as culturas de *A. gracile* LMECYA40 produziram o dobro das concentrações do que *C. issatschenkoi* LMECYA31 a 20°C. Isto significa que as elevadas concentrações de STXs encontradas nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 é justificado porque atingiram maiores concentrações celulares e não porque cada célula produzia mais STXs. As culturas de *A. gracile* LMECYA40 nas duas primeiras fases de crescimento, expostas a 10 °C, produziram baixas quantidades de STXs por célula quando comparadas com as últimas duas fases. Já a 20 °C, só a fase de adaptação se destaca das restantes, apresentando níveis inferiores. Na estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31 verificou-se um padrão semelhante nas duas temperaturas ao longo do tempo de cultura. A concentração de STXs por célula mantém-se praticamente constante, com exceção da fase exponencial final, em que as concentrações de toxina por célula foram maiores. Salientar-se que em todas as fases, a 20 °C os valores obtidos foram sempre superiores.

A maior concentração de STXs totais na fase estacionária pode ser justificada pelo facto de haver maior densidade celular. Por outro lado, nas situações onde se verificou uma maior produção na fase exponencial final, apesar de não se terem observado elevadas densidades celulares, a produção de STXs por célula é maior, acabando por elevar os níveis de STXs totais. Como se constatou, os maiores níveis de produção de STXs totais encontram-se nas últimas fases do crescimento (fase exponencial final e estacionária). Isto poderá significar que a cultura já satisfaz completamente o seu metabolismo primário, tendo assim a capacidade de direccionar a sua energia para a síntese de metabolitos secundários como as STXs (O’Neil *et al.*, 2012; Schatz *et al.* 2007).

Em suma, determinou-se que a maior de taxa de crescimento (20 °C) coincidiu com maior produção de STX total/por célula para as duas estirpes das duas espécies em estudo, tal como referido em Carmichael (2001) e Sivonen & Jones (1999). Ambos os estudos referem que a maior produção de cianotoxinas acontece nas condições que são mais favoráveis para o crescimento das cianobactérias.

5.4 - Efeito da temperatura na formação de células especializadas e a sua relação com a concentração de STXs

5.4.1 – Relação entre a formação de heterócitos e concentração de STXs

Como já foi referido, a fixação de N₂ é um processo altamente dispendioso, envolvendo cerca de 17 moléculas de ATP. Deste modo é de esperar que seja vantajoso manter um número de heterócitos por célula baixo quando o meio envolvente possui concentrações de N₂ adequadas (Wood *et al.*, 2010).

Avaliando de forma individual as espécies ao longo do tempo, no que concerne à percentagem de filamentos com heterócitos nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, percebeu-se que há uma diminuição não significativa ao longo do tempo. Tendo-se verificado uma maior percentagem de filamentos com heterócitos quando o número de heterócitos por filamento aumentou (fase de adaptação e exponencial inicial). Estes resultados estão de acordo com o que se observou em Dias *et al.* (2002) uma vez que há um aumento da percentagem de filamentos com heterócitos até ao meio da fase

exponencial diminuindo progressivamente depois disso. Também em Laamanen & Kuosa (2005) se verificou um pico de produção de heterócitos aproximadamente um mês antes do pico da biomassa. Isto pode ser justificado porque na fase de adaptação há um ajuste das células perante as novas condições de nutrientes e começam a sintetizar os componentes necessários para o seu crescimento. São nestas etapas que os metabolitos principais de carbono se acumulam (que estão envolvidos por exemplo na glicólise e no ciclo de *Krebs*), assim como os precursores de purina e de pirimidina. Estes compostos são essenciais para a produção de energia, síntese de *DNA* e de aminoácidos (Watanabe *et al.*, 2015).

Em consequência de uma limitação de nutrientes prolongada, as células entram na fase estacionária, durante a qual a proliferação e a atividade metabólica são marcadamente reduzidas de modo a manter a viabilidade sob condições de *stress*. Como resposta à obstrução dessas vias metabólicas, encontra-se descrito que os aminoácidos se começam a acumular, havendo assim uma menor necessidade de N_2 , e por outro, a energia disponível é menor e a existente poderá ser mais direcionada para manter a viabilidade celular e não para produzir heterócitos. Estes dois fatores poderão explicar a diminuição da percentagem de filamentos com heterócitos/número total de heterócitos ao longo do tempo (Watanabe *et al.*, 2015).

Quanto às diferenças encontradas entre as temperaturas, percebeu-se que as espécies *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYAA31 reagiram da mesma forma. Perante a condição de temperatura a 10 °C, os parâmetros avaliados (percentagem de filamentos com heterócitos e número total de heterócitos) reportaram valores mais elevados, apesar de não serem estatisticamente significativos. Isto pode ser explicado pelo facto de a 10 °C se ter verificado a formação de acinetos com elevados volumes celulares. No interior destas células especializadas há a formação de glóbulos de cianoficina, que contêm muitas reservas de N_2 (Sukenic *et al.*, 2015), e, portanto, talvez haja uma maior necessidade de fixar este nutriente. Por outro lado, baixas temperaturas comprometem a absorção de N_2 e tornam a camada glicolípida dos heterócitos mais grossas, diminuindo a taxa de fixação de N_2 . Estes factos podem justificar a necessidade de formar um maior número de heterócitos a 10 °C. Na situação de 20 °C, a ausência de heterócitos nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 está de acordo com o que foi reportado por Dias *et al.* (2002). Isto poderá ser justificado com base no pressuposto que esta espécie poderá requerer menores concentrações de N_2 para de dividir. Diferentes espécies poderão ter diferentes exigências de N_2 e, portanto, as fontes de N_2 encontradas no meio de cultura Z8 possivelmente sejam adequadas para cobrir as necessidades de *C. issatschenkoi* LMECYA31 e não as de *A. gracile* LMECYA40.

Pretendeu-se averiguar a existência de uma relação entre o número de heterócitos e a produção de STXs totais. Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 verificou-se que as fases onde há uma maior concentração de STXs são antecedidas por fases onde o número de heterócitos é elevado. Isto poderá sugerir que os heterócitos nas primeiras fases têm um papel fundamental na fixação de N_2 e na acumulação deste nutriente no interior das células vegetativas. Posteriormente, as reservas de N_2 serão suficientes e as células podem aumentar a produção de STXs. Contudo, apesar das culturas a 10 °C apresentarem um número maior de heterócitos, isso não se repercutiu numa maior síntese de SXTs. Este é o primeiro estudo que reporta este efeito e mais estudos são necessários para perceber esta possível relação. Quanto à estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, o número de heterócitos a 10 °C manteve-se praticamente constante ao longo do crescimento, apesar da concentração de STXs aumentar. Deste modo não foi possível constatar uma relação entre este tipo de célula especializada e os níveis de produção da toxina. Este resultado contraria o que foi obtido em Dias *et al.* (2002), que reportou que as culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 perante uma condição não ótima de crescimento (limitação de N_2) produziram um elevado número de heterócitos que coincidiu com o aumento de SXTs.

5.4.2 – Relação entre a formação de acinetos e concentração de STXs

Relativamente aos acinetos, apenas se detetou a sua presença à temperatura de 10 °C. De facto, vários estudos demonstraram que a temperatura desempenha um papel fundamental na diferenciação de acinetos. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os obtidos em Li *et al.* (1997), que revelaram que a produção de acinetos ocorreu a baixas temperaturas em sete espécies de *Anabaena* spp. Estes resultados vão contra o que foi observado noutros estudos onde temperaturas moderadas ou elevadas é que induziram a formação de acinetos (Cirés *et al.* 2013b; Pandey, 1989; Pandey & Kashyap, 1987). Este fenómeno pode ter acontecido simplesmente devido à diminuição da temperatura, sugerindo que estas duas espécies podem suportar um inverno rigoroso sob a forma de acinetos. Mas também pode ter ocorrido porque as células não conseguiram captar certos nutrientes. Como já foi referido, encontra-se descrito que baixas temperaturas podem diminuir a capacidade que as cianobactérias têm de absorver nutrientes como o N₂ e o carbono (Sakamoto & Bryant, 1997; Torzillo *et al.*, 1998). A diminuição ou ausência destes nutrientes são responsáveis por induzir a diferenciação de acinetos (Singh & Montgomery, 2011).

No que diz respeito ao volume de acinetos de *A. gracile* LMECYA40, percebe-se que o aumento deste parâmetro entre a fase de adaptação e a exponencial inicial se deve ao aumento da sua largura, uma vez que o comprimento se mantém constante. Quanto aos acinetos de *C. issatschenkoi* LMECYA31, o aumento de volume verificado na primeira fase do crescimento foi devido ao aumento da largura e do comprimento, sendo que a partir da fase exponencial inicial o decréscimo averiguado foi devido à diminuição do comprimento. Isto parece revelar que a largura é responsável pelo aumento de volume dos acinetos de *A. gracile* LMECYA40, enquanto que o comprimento é responsável por aumentar o volume dos acinetos de *C. issatschenkoi* LMECYA31. Isto pode ser justificado devido à própria morfologia das células em condições normais para o seu desenvolvimento. As células de *C. issatschenkoi* LMECYA31 são bastantes alongadas e estreitas comparativamente às células vegetativas de *A. gracile* LMECYA40, que são mais largas e menos compridas. A formação de acinetos resulta da fusão de células vegetativas vizinhas e isso resulta numa forma de acinetos diferentes entre as várias espécies (Komárek, 2008). Apesar de se verificar estas diferenças entre as estirpes em estudo, ambas revelaram comprimentos maiores do que os descritos na literatura (Komárek, 2013). Isto pode ser causado pelas condições ambientais nas quais as culturas cresceram ou pela variação morfológica das células vegetativas das quais os acinetos se diferenciaram (Moore *et al.*, 2004).

Quanto ao volume dos acinetos ao longo do tempo, percebeu-se que os acinetos de *C. issatschenkoi* LMECYA31 aumentaram bastante, e de forma significativa, entre a fase de adaptação e a exponencial inicial. É reconhecido que durante a diferenciação de acinetos há uma acumulação intracelular de proteínas totais, N₂ total (grânulos de cianoficina) e DNA. Estes compostos são necessários para apoiar as necessidades metabólicas e fisiológicas na posterior germinação do acineto (Moore *et al.*, 2004). Este aumento de componentes moleculares pode fundamentar o grande aumento de volume de acinetos que se verifica, o que estaria de acordo com o descrito em Fay (1988). A partir da fase exponencial inicial em diante há um sucessivo decréscimo do volume de acinetos. Como já foi reportado, na fase de adaptação é o momento em que se verifica o auge de metabolitos importantes para a obtenção de energia e síntese de DNA, sendo que diminui posteriormente. Portanto, como a fase exponencial inicial sucede logo à de adaptação, é expectável que alguns dos metabolitos produzidos nesta primeira fase sejam direccionados para a formação de acinetos, explicando o volume máximo atingindo na fase exponencial inicial. Depois verifica-se um progressivo decréscimo, e isso começa a ser refletido nos volumes de acinetos na fase exponencial final devido à diminuição das reservas de glicogénio e de N₂, por exemplo. Esta hipótese é suportada por Perez *et al.* (2016) uma vez que se verifica que há uma diminuição destes componentes nos acinetos nas espécies *Nostoc punctiforme* e

Anabaena variabilis a partir do 20º dia de cultura, o que corresponde aproximadamente à fase exponencial inicial deste estudo. Os volumes dos acinetos de *A. gracile* LMECYA40 aumentaram ligeiramente entre a fase de adaptação e a fase exponencial inicial, mantendo o seu volume nas fases seguintes. Verificou-se uma manutenção do volume a partir da fase exponencial inicial o que coincidiu com o facto de 95 % dos acinetos passarem a estar livres. Isto significa que os acinetos já estabilizaram o seu crescimento e, portanto, a sua formação está completa, podendo desassociar-se das células vegetativas, passando a encontrar-se livres no meio de cultura. Isto estaria de acordo com Sukenik *et al.* (2013) que verificaram que a partir de um certo tempo, a maturação dos acinetos em *Aphanizomenon ovalisporum* está completa e as suas dimensões já não variaram. Durante o processo de maturação, a tendência é que os acinetos comecem-se a soltar dos filamentos para formar acinetos livres. Os acinetos livres depositam-se no fundo da coluna de água, e em associação com os sedimentos mantêm-se lá até que as condições favoráveis para a sua germinação ocorram. Percebe-se que na espécie *A. gracile* LMECYA40 há essa tendência e que está de acordo com os resultados de Sukenik *et al.* (2013) No entanto, em *C. issatschenkoi* LMECYA31 esse padrão não ocorreu. Inicialmente todos os acinetos estão agarrados às células vegetativas, atingindo a sua percentagem máxima na fase exponencial e reduzindo na estacionária. O facto de na fase de adaptação estarem todos agarrados ao contrário de *A. gracile* LMECYA40 poderá significar que os acinetos *C. issatschenkoi* LMECYA31, devido às suas grandes dimensões, poderão demorar mais a atingir esse estado de maturação.

A relação entre a formação de acinetos e a concentração de STXs totais foi também analisada. Os resultados parecem indicar que a produção de STXs pela estirpe *A. gracile* LMECYA40 não ficou comprometida com a formação de acinetos. O oposto verificou-se na estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, cuja produção a 10 °C ficou reduzida a metade, pondo a hipótese que esta redução pode estar relacionada com a formação de acinetos com um elevado volume, para promover a acumulação de grânulos de cianoficina. Estes dados estariam de acordo com o observado em Dias *et al.* (2002), que reportou que em culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31, expostas a um meio com limitação de P, houve a indução da formação de acinetos, levando à diminuição da síntese de STXs. Quanto à estirpe *A. gracile* LMECYA40 nunca foram realizados estudos que relacionem estes dois parâmetros.

5.5 - Ensaio de RT-real-time-PCR e relação com a concentração de STXs

Apesar de não se ter detetado a expressão do gene *sxtA*, é expectável que em algum momento os transcritos de *sxtA* tivessem de existir uma vez que se quantificou STXs. A codificação do gene *sxtA* produz uma enzima que participa no primeiro passo da via biossintética das STXs (Kellmann *et al.*, 2008) A SxtA é descrita como um complexo multienzimático constituído por módulos de PKS. Os transcritos destas proteínas poderão ser mais abundantes durante a noite, sendo talvez este o motivo pelo qual não se detetou a sua presença. Penn *et al.* (2014) demonstraram que os transcritos de genes PKS que participam na síntese da microcistina aumentaram durante a noite. As células parecem dispensar mais energia para a síntese de toxinas durante a noite. Isto é explicado com base na hipótese de ser uma adaptação perante ao aumento de alimentação noturna de *Daphnias*. De facto, certos estudos documentaram que as *Daphnias* realizam uma migração vertical, atingindo a superfície das águas durante o crepúsculo (Haupt *et al.*, 2010). Como a recolha de alíquotas para extração de RNA foi feita sempre à mesma altura do dia, coincidindo sempre com o período diurno da câmara de *Fitoclima*, talvez tenha sido esta a causa pela qual não se detetaram os transcritos SxtA. No entanto, mais estudos serão necessários para averiguar o sucedido, uma vez que o gene foi amplificado no PCR convencional (usando DNA) e conseguiu-se obter as retas de calibração. Outra das hipóteses colocadas é que talvez o método que se utilizou para a preservação das amostras de RNA não seja o mais adequado para manter os transcritos de *sxtA* intactos. Li *et al.* (2019) demonstraram a rápida degradação de um gene que

participa na síntese de microcistina (*mcyH*) quando as amostras foram guardadas a -80 °C, apesar do número de cópias do gene *rRNA16S* se manter praticamente constante. Este estudo considerou que o melhor método de preservar o RNA em amostras de *Microcystis* seria em azoto líquido. Talvez fosse interessante utilizar esta técnica de preservação nas amostras deste estudo e averiguar se já seria possível a detecção da expressão do gene *sxtA*. À semelhança do que foi descrito no estudo anterior, neste trabalho foi possível detetar os transcritos de *rRNA16S*, *sxtM* e *sxtPer*, o que está de acordo com a sugestão de que a degradação causada pela temperatura não afeta da mesma forma a expressão de todos os genes (Carvalhais *et al.*, 2013).

De forma a contornar esta questão tentou-se detetar os transcritos de *sxtI*. Era importante obter-se níveis de expressão de um gene que participasse na via biossintética das STXs de modo a correlacionar com a síntese de STXs. Contudo também não se detetou nenhuma expressão deste gene nas várias amostras testadas.

Até agora, nestas duas estirpes, nunca foi estudado o efeito que as diferentes fases do crescimento exercem na expressão de genes codificadores de proteínas transportadoras, nem a sua relação com a concentração de STXs totais. Contudo, percebeu-se que o decorrer do tempo afeta de forma diferente o nível de expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* dependendo da temperatura em que as culturas de cianobactérias cresceram. Em certos momentos, foi possível estabelecer uma ligação entre este fator e a concentração de STXs. Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40 expostas à temperatura de 10 °C percebeu-se que há uma maior expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* nas fases em que se verificou maior produção de STXs, o que poderá significar uma maior quantidade de STXs extracelulares nos corpos de água mesmo em fases precoces do crescimento cianobacteriano, como por exemplo, na fase exponencial inicial. Não foi possível estabelecer esta relação a 20 °C, no entanto na fase exponencial inicial verificou-se um ligeiro aumento da expressão génica que coincidiu com o início do aumento da concentração de STXs totais. Em *C. issatschenkoi* LMECYA31, de uma forma geral, nas duas temperaturas testadas, não se verificou nenhuma relação entre estes dois parâmetros, exceto na fase exponencial final e na estacionária nas culturas expostas a 10 e 20 °C, respetivamente. Também nesta estirpe parece que a maior ocorrência de STXs extracelulares poderá acontecer no fim do crescimento.

Por outro lado, avaliou-se a expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* em cada fase do crescimento, observando-se que a temperatura exerceu efeito na sua expressão, nas duas espécies em estudo. Nas culturas de *A. gracile* LMECYA40, a expressão de ambos os genes responsáveis pelo transporte de STXs apresentou o mesmo padrão. Nas fases iniciais do crescimento (fase de adaptação e exponencial inicial), os valores de expressão a 10 °C foram estaticamente inferiores aos obtidos a 20 °C. Nas últimas fases do crescimento detetou-se o oposto. Estes resultados estão de acordo com o observado por Cirés *et al.* (2017) que verificaram que a temperatura teve efeito nos níveis de transcrição destes dois genes na estirpe *A. gracile* UAM529. Esse trabalho analisou temperaturas próximas (12 e 23 °C) das testadas neste trabalho, porém o seu estudo reportou apenas dados até à fase exponencial final. Cirés *et al.* (2017) revelou que durante todo o tempo, a expressão génica a 12 °C, foi, de forma geral, estatisticamente superior à obtida a 23 °C sendo que a diferença entre as duas temperaturas foi aumentando gradualmente com a progressão do tempo. Comparando os resultados apresentados em Cirés *et al.* (2017) com os obtidos no trabalho aqui realizado, verifica-se que somente a fase exponencial está em concordância.

No que diz respeito à espécie *C. issatschenkoi* LMECYA31 também se verificou que a temperatura de 10 °C teve um efeito nos níveis de transcrição de ambos os genes. Mais uma vez os transcritos de *sxtM* e *sxtPer* apresentaram um padrão de expressão semelhante. Uma vez que este é o primeiro estudo em que se analisa o efeito que a temperatura tem na expressão dos genes do *cluster sxt* em *C. issatschenkoi* LMECYA31, não podemos comparar os resultados aqui obtidos.

Quando se averiguou se existiria alguma relação entre o aumento da expressão destes transcritos com um aumento da produção de STXs constatou-se que na estirpe *A. gracile* LMECYA40, estes dois

parâmetros coincidiram na fase exponencial final e estacionária. Tendo em conta que vários estudos referem que as STXs extracelulares podem representar uma grande percentagem da toxina total, nestas duas fases é possível colocar a hipótese que mesmo a baixas temperaturas (como 10 °C) há uma grande quantidade de STXs exportadas que poderão entrar em contacto com os organismos de água doce ou até mesmo os utilizadores de águas recreativas. Também Cirés *et al.* (2017) notaram uma relação direta entre a taxa de transcrição de *sxtM* e *sxtPer* e a taxa de produção de STXs na estirpe *A. gracile* UAM529 a 12 °C. Quanto à estirpe *C. issatschenkoi* LMECYA31, esta relação nem sempre foi possível de se estabelecer. Na fase exponencial final verifica-se uma maior transcrição de *sxtM* e *sxtPer*, o que poderá indicar uma maior exportação de STXs, contudo na fase seguinte já há uma sub-expressão destes transcritos. Isto pode ser fundamentado pelo facto da expressão do gene *rRNA 16S* ter variado significativamente na fase estacionária entre as duas temperaturas. Desta forma, a estabilidade do gene de referência não se verificou, e, portanto, os dados obtidos de quantificação génica na fase estacionária podem ter sido enviesados. Para além disto, também se pode colocar a hipótese que a menor expressão na última fase analisada poderá ter acontecido por duas razões: 1) as cianobactérias já exportaram a maior parte das STXs, tendo uma menor necessidade de exportar as toxinas na fase estacionária ou, 2) porque na fase exponencial final já transcreveram suficientemente os genes nas fases anteriores e consequentemente já codificaram o número adequado de transportadores, não sendo por isso necessário a sua contínua expressão. Nesta estirpe também se observa que a temperatura de 10 °C também teve efeito na expressão dos genes e que em certos momentos se correlacionou com um aumento de STXs, pondo a hipótese que há uma elevada percentagem de STXs a serem exportadas, o que, consequentemente, pode representar um perigo para a saúde humana e animal, mesmo quando a água se encontra a baixas temperaturas. De forma a verificar-se todas as suposições descritas seria importante fazer-se uma análise diferenciada das frações intracelulares e extracelulares das STXs.

Em suma, observou-se que o gene de referência não foi sempre estável, assim todos os resultados obtidos nos ensaios *de RT-real-time-PCR* têm que ser alvo de uma análise cautelosa, tendo em consideração que em certos momentos os valores de expressão obtidos podem ter sido influenciados por questões do método de análise, não representando assim a sua real expressão. A ausência da estabilidade dos níveis de transcrição do gene de referência sob diferentes condições ambientais e diferentes espécies já tinha sido reportado em estudos anteriores (Dheda *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2019). De forma a minimizar esta influência individual e experimental, é recomendado o uso de três ou mais genes de referência (Pinto *et al.*, 2012). Também é relevante ressaltar que nos casos onde se verificou a ausência de relação entre a quantidade de toxinas produzidas e a expressão dos genes-alvo nas diferentes temperaturas e nos diferentes tempos de culturas, nas duas estirpes deste trabalho, pode ser devido ao facto de haver uma sub-regulação a nível pós-transcricional ou pós-translacionais (Cirés *et al.*, 2017). Assim, uma elevada expressão génica de *sxtM* e *sxtPer* pode não corresponder diretamente a uma elevada concentração de STXs totais.

6. Conclusões

O presente estudo demonstra uma forte relação entre o crescimento das estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 e a temperatura. Temperaturas baixas (10 °C) resultam numa diminuição do crescimento, comparativamente a temperaturas amenas (20 °C). No entanto, a sua capacidade de adaptação sugere que a monitorização destas espécies deverá ser alargada aos períodos de primavera e outono, em que a temperatura das águas se situa entre os 10 e 23 °C (Cirés *et al.*, 2017). No atual contexto das alterações climáticas, em que a temperatura média das águas tem tendência para aumentar e sabendo-se que as águas doces superficiais do sul de Portugal têm uma temperatura média de 16 ± 1 °C, podendo portanto rapidamente chegar ao 20 °C, torna-se evidente que sendo a taxa de crescimento destas duas estirpes, principalmente *C. issatschenkoi* LMECYA31, superior a 20 °C face a 10 °C, é espectável que estas duas estirpes formem *blooms* com elevadas densidades celulares a temperaturas amenas.

Este trabalho também mostra que as temperaturas mais favoráveis ao crescimento parecem estimular a produção de STXs totais e STXs por célula. Em condições de temperatura baixa (10 °C), ambas as estirpes responderam de forma diferente. Enquanto a produção de STXs totais diminuiu drasticamente nas culturas de *C. issatschenkoi* LMECYA31 quando expostas a 20 °C, as culturas *A. gracile* LMECYA40 continuaram a produzir praticamente a mesma quantidade. Por outro lado, os dados obtidos sugerem uma sobre-expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer* à temperatura de 10 °C foi acompanhada por o aumento de STXs totais, o que poderá implicar uma maior concentração de STXs extracelulares. Estes indícios podem sugerir que as STXs podem ser exportadas como um mecanismo protetor contra a diminuição de temperatura, explicando deste modo, o bom crescimento destas duas estirpes a baixas temperaturas. Salienta-se, também, que as fases mais tardias do crescimento correspondem às fases de maior expressão génica. Estas observações reforçam a necessidade de controlar a concentração destas toxinas mesmo quando as temperaturas da água são baixas. Extrapolando os nossos resultados para o contexto real, a maior produção de STXs dissolvidas poderá ocorrer no final da fase exponencial e estacionária, o que poderá constituir um problema ambiental e de saúde pública, mesmo antes de se verificar a ocorrência de lise celular.

Em *A. gracile* LMECYA40 a formação de um elevado número de heterócitos em fases precoces do crescimento parece ser um dos fatores que pode promover o aumento de SXTs totais, e no que diz respeito a *C. issatschenkoi* LMECYA31, a formação de acinetos com grandes volumes coincidiu com a redução a produção de STXs. Contudo, a relação entre estes dois parâmetros (heterócitos e acinetos) e a produção de STXs deixa muitas questões em aberto sendo necessário realizar mais estudos para esclarecer estas observações preliminares. A produção de acinetos a 10 °C, nas duas estirpes, revelou que mesmo que as culturas não cresçam, podem resistir e manter-se nos corpos de água até reunirem todas as condições favoráveis para voltar a crescer ativamente. Deste modo talvez fosse interessante estudar algumas amostras ao nível dos sedimentos que se encontram no fundo dos corpos de água. De forma a perceber se o que foi verificado *in vitro* também ocorre *in vivo*.

Em suma, o presente estudo contribui para novos conhecimentos sobre o modo como a temperatura e o crescimento cianobacteriano contribuem para a regulação da expressão dos genes *sxtM* e *sxtPer*, principalmente em *C. issatschenkoi* LMECYA31. Por outro lado, estudou-se também o efeito que o tempo tem na expressão dos genes relacionados com o transporte de saxitoxinas nas estirpes *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31, sendo este o primeiro trabalho realizado neste sentido. A técnica de *RT-real-time-qPCR* utilizada neste trabalho na presente investigação demonstrou ser uma ferramenta com imensas vantagens, e imprescindível no estudo da expressão génica. Estas informações poderão ser incorporadas em modelos preditivos que são ferramentas úteis para se prever a ocorrência de *blooms* tóxicos ou poderão ser empregues no desenvolvimento de novas técnicas de

monitorização que permitam gerir o desenvolvimento destes *blooms* e a produção de cianotoxinas, minimizando assim os riscos para a saúde humana e animal.

7. Perspetivas futuras

Dado que a temperatura de crescimento é um parâmetro abiótico fundamental que varia substancialmente na natureza, é expectável que as cianobactérias exibam respostas adaptativas às mudanças de temperatura. Contudo, poucos estudos têm sido realizados no sentido de perceber qual a influência que a temperatura tem no crescimento e na fisiologia das cianobactérias, e os efeitos que a temperatura tem na regulação de genes responsáveis pela síntese de cianotoxinas.

Apesar de algumas limitações, este estudo traz novos conhecimentos para esta temática. Com recurso a técnicas modernas (*RT-real-time-qPCR*) foi possível providenciar novos conhecimentos sobre o modo como a temperatura influencia a expressão génica nas espécies *A. gracile* LMECYA40 e *C. issatschenkoi* LMECYA31 e relacionar com o seu crescimento com a produção de STXs. Contudo ficam muitas questões em aberto que interessa investigar para colmatar a falta de informação existente.

Tendo em conta que a temperatura influenciou diferencialmente todos os parâmetros investigados nas duas estirpes, seria importante conduzir o mesmo tipo de estudo, por exemplo, em várias espécies produtoras de STXs, e inclusive em diferentes estirpes das mesmas espécies. Por outro lado, seria interessante testar uma gama de temperaturas mais ampla ou combinando a temperatura com outros fatores abióticos (pH, concentração de nutrientes e intensidade luminosa) de forma a representar outros contextos reais que se podem encontrar no *habitat* natural. Outro fator a considerar, geralmente esquecido, que parece afetar a produção de cianotoxinas e a respetiva expressão génica é o ciclo circadiano. Deviam-se conduzir mais estudos no sentido de avaliar que influência tem este parâmetro na transcrição génica.

Todas as mudanças verificadas ao nível transcricional poderão ser complementadas por exemplo ao recorrer-se a técnicas moleculares mais avançadas como a proteómica e RNA-Seq de forma a compreender a complexa regulação da síntese e transporte de STXs em cianobactérias.

Este estudo também sugeriu que o aumento do número heterócitos (que leva a um aumento dos conteúdos intracelulares de N₂) poderá proporcionar o aumento da produção de STXs ou potenciar a formação acinetos. São necessários mais estudos no sentido de perceber de que modo a produção de heterócitos pode estar envolvida nestas duas situações.

Também seria interessante analisar a influência da temperatura na expressão génica do gene *hetR* (gene responsável por induzir a diferenciação de heterócitos e acinetos) e relacionar posteriormente com os níveis de expressão de genes relacionados com a síntese de STXs e produção de STXs totais.

Por outro lado, a extração ou a visualização, por microscopia, dos grânulos de cianoficina poderia ajudar a confirmar esta relação entre o tamanho dos acinetos e os fatores enumerados anteriormente.

8. Referências

- Adams, D.G., Carr, N.G., 1981. The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 9, 45-100.
- Applied Biosystems, 2008. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. Review Biology, Part Number 4371095.
- Ballot, A., Cerasino, L., Hostyeva, V., Cirés, S., 2016. Variability in the *sxt* gene clusters of PSP toxin producing *Aphanizomenon gracile* strains from Norway, Spain, Germany and North America. *PLoS One* 11, e0167552.
- Bio-Rad laboratories, 2006. Real-time PCR applications guide. Methods 2–85.
- Boopathi, T., Ki, J.S., 2014. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins (Basel)* 6, 1951-78.
- Brentano, D.M., Giehl, E.L.H., Petrucio, M.M., 2016. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae* 56, 22–28.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Buch, B., Hereman, T.C., Arruda-Neto, J.D.T., Moura, A.N., Zocchi, S.S., 2012. Effects of light intensity and temperature on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) with straight and coiled trichomes: growth rate and morphology. *Brazilian Journal of Biology* 72, 343-351.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445-459.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 270, 78-86.
- Carmichael, W.W., 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABs”. *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 1393-1407.
- Carneiro, R.L., Dos Santos, M.E.V., Pacheco, A.B.F., De Oliveira E Azevedo, S.M.F., 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* 31, 481–488.
- Carneiro, R.L., Pacheco, A.B.F., De Oliveira E Azevedo, S.M.F., 2013. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. *Marine Drugs* 11, 2949–2963.
- Carvalhais, V., Delgado-Rastrollo, M., Melo, L.D.R., Cerca, N., 2013. Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Microbiology Methods* 95, 195–200.
- Casero, M.C., Ballot, A., Agha, R., Quesada, A., Cirés, S., 2014. Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of *sxt* genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon gracile*. *Harmful Algae* 37, 28–37.
- Castenholz, R.W., Envelope, C., 2015. General characteristics of the cyanobacteria, in: In DeVos, P., *et al.* (Eds.), *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, New York, pp. 1–23.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., García, C., Vásquez, M., 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44, 483–489.
- Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K., Lukavsky, J., 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum* - a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal*

- of Applied Phycology 19, 537–544.
- Chislock, M.F., Sharp, K.L., Wilson, A.E., 2014. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. *Water Research* 49, 207–214.
- Christoffersen, K., Lyck, S., Winding, A., 2002. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquatic Microbial Ecology* 27, 125–136.
- Chorus, I., Bartram, C., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, first ed. E & FN Spon, London and New York.
- Cirés, S., Ballot, A., 2016. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the *Nostocales* (cyanobacteria). *Harmful Algae* 54, 21–43.
- Cirés, S., Delgado, A., González-Pleiter, M., Quesada, A., 2017. Temperature influences the production and transport of saxitoxin and the expression of *sxt* genes in the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile*. *Toxins (Basel)* 9, 1-16.
- Cires, S., Wörmer, L., Agha, R., Quesada, A., 2013a. Overwintering populations of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Microcystis* as potential inocula for summer blooms. *Journal of Plankton Research* 35, 1254–1266.
- Cirés, S., Wörmer, L., Ballot, A., Agha, R., Wiedner, C., Velázquez, D., Casero, M.C., Quesada, A., 2014. Phylogeography of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxin-producing *Nostocales* cyanobacteria from Mediterranean Europe (Spain). *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1359–1370.
- Cirés, S., Wörmer, L., Wiedner, C., Quesada, A., 2013b. Temperature-dependent dispersal strategies of *Aphanizomenon ovalisporum* (*Nostocales*, cyanobacteria): Implications for the annual life cycle. *Microbial Ecology* 65, 12–21.
- Corbel, S., Mougou, 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.
- Cumming, G., Fidler, F., Vaux, D.L., 2007. Error bars in experimental biology. *The Journal of Cell Biology* 177, 7–11.
- Desjardins, P.R., Conklin, D.S., 2011. Microvolume quantitation of nucleic acids. *Current Protocols in Molecular Biology* 3, 1–4.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37, 112–119.
- Dias, E., Pereira, P., Franca, S., Anderson, P., 2002. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA31 (cyanobacteria). *Journal of Phycology* 38, 705–712.
- El-Shehawey, 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
- Fay, P., 1988. Viability of akinetes of the planktonic cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Proceedings the Royal Society* 234, 283–301
- Fernandes, V., Cavati, B., Oliveira, L., Souza, B., 2009. Ecologia de cianobactérias: factores promotores e consequências das florescências. *Oecologia Brasiliensis* 13, 247–258.
- Flynn, K., Franco, J.M., Fernández, P., Reguera, B., Zappata, M., Wood, G., Flynn, K.J., 1994. Changes in toxin content biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen

- refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Marine Ecology Progress Series* 111, 99-109.
- Frank, I.B., Quigg, A., Finkel, Z.V., Irwin, A.J., Haramaty, L., 2007. Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 52, 2260-2269.
- 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.
- Gupta, V., Ratha, S.K., 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.
- Haupt, F., Stockenreiter, M., Reichwaldt, E.S., Baumgartner, M., Lampert, W., Boersma, M., 2010. Upward phosphorus transport by daphnia diel vertical migration. *Limnology and Oceanography* 55, 529-534.
- Holland, A., Kinnear, S., 2013. Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: Compounds for competitive advantage and/or physiological aide?. *Marine Drugs* 11, 2239-2258.
- Hu, Q., 2004. Environmental effects on cell composition, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, pp. 83-93.
- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H., Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16, 471-483.
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3, 224-230.
- Instituto da Água, 2008. *Tipologia de rios em Portugal Continental no âmbito da implementação da diretiva quadro da água*, Lisboa.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 1-9.
- Kaushik, R., Balasubramanian, R., 2013. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43, 1349-1383.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4044-53.
- Komárek, J., 2008. The cyanobacterial genus *Macrospermum*. *Fottea* 8, 79-86.
- Komárek, J., 2013. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota: 3rd part: Heterocystous genera, first ed. Springer Spektrum, Heidelberg.
- Laamanen, M., Kuosa, H., 2005. Annual variability of biomass and heterocysts of the N₂-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in the Baltic Sea with reference to *Anabaena* spp. and *Nodularia spumigena*. *Boreal Environmental Research* 10, 19-30.
- Li, R., Carmichael, W.W., Pereira, P., 2003. Morphological and *16S rRNA* gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* LMECYA 31 as *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology* 39, 814-818.
- Li, R., Watanabe, M., Watanabe, M.M., 1997. Akinete formation in planktonic *Anabaena* spp. (cyanobacteria) by treatment with low temperature. *Journal of Phycology* 33, 576-584.
- Li, X., Qiu, D., Chena, S., Jinmei, L., Luo, C., Hu, D., Lia, J., Zhud, J., Chenc, H., Lic S., Yu, X., 2019. Evaluation of RNA degradation in pure culture and field *Microcystis* samples preserved with

- various treatments. *Journal of Microbiological Methods* 164, e105684.
- Lilliefors, H., 1967. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. *Journal of the American Statistical Association* 62, 399-402.
- Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports* 23, 200–222.
- Lopes, A., Fonseca, A., 1996. Crescimento de populações microbianas, in: *Biologia microbiana*, Universidade Aberta, Lisboa, pp. 135-145.
- Luo, X., Li, J., Chang, T., He, H., Zhao, Y., Yang, X., Zhao, Y., Xu, Y., 2019. Stable reference gene selection for RT-qPCR analysis in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 under abiotic stresses. *BioMed Research International* 3, 1-15.
- Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S., Huszar, V.L.M., 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology* 58, 552–559.
- Mantzouki, E., Lürling, M., Fastner, J., de Senerpont Domis, L., Wilk-Woźniak, E., Koreivienė, J., Seelen, L., Teurlincx, S., Verstijnen *et al.*, 2018. Temperature effects explain continental scale distribution of cyanobacterial toxins. *Toxins (Basel)* 10, 1–24.
- Martins, A., Vasconcelos, V., 2011. Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Archives of Microbiology* 193, 615–627.
- McDonald, J.H., 2014. *Handbook of biological statistics*, third ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland and U.S.A.
- Mehnert, G., Leunert, F., Cirés, S., Jöhnk, K.D., Rücker, J., Nixdorf, B., Wiedner, C., 2010. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research* 32, 1009–1021.
- Merel, S., Clément, M., Thomas, O., 2010. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon* 55, 677–691.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environmental International* 59, 303–327.
- Mihali, T.K., Carmichael, W.W., Neilan, B.A., 2011. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. *PLoS One* 6, e14657.
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Neilan, B.A., 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochemistry* 13, 1–13.
- Moore, D., McGregor, G.B., Shaw, G., 2004. Morphological changes during akinete germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, cyanobacteria). *Journal of Phycology* 40, 1098–1105.
- Murray, S.A., Mihali, T.K., Neilan, B.A., 2011. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Molecular Biology and Evolution* 28, 1173-82.
- Negri, A.P., Jones, G., Blackburn, S.I., 1997. Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Journal of Phycology* 33, 26–35.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C., Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 15, 1239–1253.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G., 1997. PCR primers to amplify *16S rRNA* genes from

- cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3327-3332.
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14, 313–334.
- Ongley, S.E., Pengelly, J.J.L., Neilan, B.A., 2016. Elevated Na⁺ and pH influence the production and transport of saxitoxin in the cyanobacteria *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Environmental Microbiology* 18, 427–438.
- Oliveira, T., 2010. PCR em tempo real: métodos e aplicações. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal.
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archives für Hydrobiologie* 107, 563-593.
- Paerl, H.W., 2018. Mitigating toxic planktonic cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems facing increasing anthropogenic and climatic pressures. *Toxins (Basel)* 10, 1–16.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H., Dyble, J., 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *TheScientificWorldJournal* 1, 76–113.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1, 27–37.
- Paerl, H.W., Paul, V.J., 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46, 1349–1363.
- Pandey, K.D., Kashyap, A.K., 1987. Factors affecting formation of spores (akinetes) in cyanobacterium *Anabaena doliolum* (AdS strain). *Journal of Plant Physiology* 127, 123–134.
- Pandey, R.K., 1989. Induction of akinete formation in *Nodularia spumigena* by temperature. *Journal of Basic Microbiology* 29, 477–480.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8, 1650-80.
- Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S.E., D’Agostino, P.M., Neilan, B.A., 2016. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* 54, 98–111.
- Penn, K., Wang, J., Fernando, S.C., Thompson, J.R., 2014. Secondary metabolite gene expression and interplay of bacterial functions in a tropical freshwater cyanobacterial bloom. *International Society for Microbial Ecology* 8, 18866-18878.
- Pereira, P., Li, R., Carmichael, W.W., Dias, E., Franca, S., 2004. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *European Journal of Phycology* 39, 361–368.
- Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N., Oshima, Y., 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689–1702.
- Perez, R., Forchhammer, K., Salerno, G., Maldener, I., 2016. Clear differences in metabolic and morphological adaptations of akinetes of two *Nostocales* living in different habitats. *Microbiology* 162, 214-223.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 16–21.

- Pinto, F., Pacheco, C.C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P., Tamagnini, P., 2012. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria. *PLoS One* 7, 1–9.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A., 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150, 455–461.
- Rajaniemi, P., Komárek, J., Hoffmann, L., Hrouzek, P., Kastocská, K., Sivonen, K., 2005. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Algological Studies* 117, 371-391.
- Rastogi, R.P., Madamwar, D., Incharoensakdi, A., 2014. Multiple defense systems in cyanobacteria in response to solar UV radiation, in: Douglas, D. (Ed.), *Cyanobacteria: Ecological importance, biotechnological uses and risk management*. Nova Science Publishers Inc., New York, pp.125-158.
- Rastogi, R.P., Singh, S.P., Häder, D.P., Sinha, R.P., 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, 603–607.
- Rindi, F., 2007. Diversity, distribution and ecology of green algae and cyanobacteria in urban habitatS. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* 11, 619-638.
- Sakamoto, T., Bryant, D.A., 1997. Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Archives of Microbiology* 169, 10–19.
- 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.
- Singh, S.C., Sinha, R.P., Häder, D.P., 2002. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozoologica* 41, 297–308.
- Singh, S.P., Montgomery, B.L., 2011. Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology* 19, 278–285.
- 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.
- 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.
- Soto-Liebe, K., López-Cortés, X.A., Fuentes-Valdes, J.J., Stucken, K., Gonzalez-Nilo, F., Vásquez, M., 2013. In silico analysis of putative paralytic shellfish poisoning toxins export proteins in cyanobacteria. *PLoS One* 8, 1–10.
- Soto-Liebe, K., Méndez, M.A., Fuenzalida, L., Krock, B., Cembella, A., Vásquez, M., 2012. PSP toxin release from the cyanobacterium *Raphidiopsis brookii* D9 (*Nostocales*) can be induced by sodium and potassium ions. *Toxicon* 60, 1324–1334.
- Stal, L.J., Severin, I., Bolhuis, H., 2010. The ecology of nitrogen fixation in cyanobacterial mats. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 675, 31-45.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Soto-Liebe, K., Vásquez, M., 2014. Impact of nitrogen sources on

- gene expression and toxin production in the diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and non-diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. *Toxins (Basel)* 6, 1896–1915.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., et al., 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: Comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS One* 5, e9235.
- Su, Z., 2004. Saxitoxin Blocks L-Type ICa. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308, 324–329.
- Sukenik, A., Kaplan-Levy, R.N., Viner-Mozzini, Y., Quesada, A., Hadas, O., 2013. Potassium deficiency triggers the development of dormant cells (akinetes) in *Aphanizomenon ovalisporum* (*Nostocales*, cyanoprokaryota). *Journal of Phycology* 49, 580–587.
- Sukenik, A., Maldener, I., Delhaye, T., Viner-Mozzini, Y., Sela, D., Bormans, M., 2015. Carbon assimilation and accumulation of cyanophycin during the development of dormant cells (akinetes) in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *Frontiers in Microbiology* 6, 1–9.
- Tomé, S., 2007. Efeito das alterações climáticas nos recursos hídricos da bacia do nabão. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Torzillo, G., Bernardini, P., Masojídek, J., 1998. On-line monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on the productivity of outdoor cultures of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *Journal of Phycology* 34, 504–510.
- Valério, E., Campos, A., Osório, H., Vasconcelos, V., 2016. Proteomic and Real-Time PCR analyses of *Saccharomyces cerevisiae* VL3 exposed to microcystin-LR reveals a set of protein alterations transversal to several eukaryotic models. *Toxicon* 112, 22-8.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 7-60.
- Vaux, D.L., Fidler, F., Cumming, G., 2012. Replicates and repeats-what is the difference and is it significant? A brief discussion of statistics and experimental design. *EMBO Reports* 13, 291–296
- Velzeboer, R.M.A., Baker, P.D., Rositanos, J., 2001. Saxitoxins associated with the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis* (*Nostocales*, Cyanophyta) under varying sources and concentrations of nitrogen. *Phycologia* 40, 305-312.
- Visser, P.M., Verspagen, J.M.H., Sandrini, G., Stal, L.J., Matthijs, H.C.P., Davis, T.W., Paerl, H.W., Huisman, J., 2016. How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 54, 145–159.
- Wang, J., Salata, J.J., Bennett, P.B., 2003. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K⁺ channels. *The Journal of General Physiology* 121, 583–598.
- Watanabe, S., Ohbayashi, R., Kanesaki, Y., Saito, N., Chibazakura, T., Soga, T., Yoshikawa, H., 2015. Intensive DNA replication and metabolism during the lag phase in cyanobacteria. *PLoS One* 10, 1–16.
- Wejnerowski, Ł., Rzymyski, P., Kokociński, M., Meriluoto, J., 2018. The structure and toxicity of winter cyanobacterial bloom in a eutrophic lake of the temperate zone. *Ecotoxicology* 27, 752–760.
- Whitton, B., Potts, M., 2012. Introduction to the Cyanobacteria, in: Whitton, B.A. (ed.), *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 1-13.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids:

Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8, 2185–2211.

Willis, A., Adams, M.P., Chuang, A.W., Orr, P.T., O'Brien, K.R., Burford, M.A., 2015. Constitutive toxin production under various nitrogen and phosphorus regimes of three ecotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* ((Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju). *Harmful Algae* 47, 27–34.

Wood, S.A., Prentice, M.J., Smith, K., Hamilton, D.P., 2010. Low dissolved inorganic nitrogen and increased heterocyte frequency: Precursors to *Anabaena planktonica* blooms in a temperate, eutrophic reservoir. *Journal of Plankton Research* 32, 1315–1325.

Yunes, J.S., De La Rocha, S., Giroldo, D., Silveira, S.B. Da, Comin, R., Bicho, M.D.S., Melcher, S.S., Sant'Anna, C.L., Vieira, A.A.H., 2009. Release of carbohydrates and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. *Journal Phycology* 45, 585–591.

9. Anexos

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

Tabela I – Composição do meio Z8 usado para o crescimento de cianobactérias. As quantidades apresentadas foram adicionadas a 1 L de água.

Solução stock	Quantidade
Solução A	10 mL/L
Solução B	10 mL/L
Solução Fe-EDTA	10 mL/L
Solução de micronutrientes	1 mL/L

Tabela II – Composição da solução A. As quantidades apresentadas foram adicionadas a 1 L de água.

Componente	Quantidade
NaNO ₃	46,7 g/L
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,90 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,50 g/L

Tabela III – Composição da solução B. As quantidades apresentadas foram adicionadas a 1 L de água.

Componente	Quantidade
K ₂ HPO ₄	3,1 g/L
Na ₂ CO ₃	2,1 g/L

Tabela IV – Composição da solução Fe-EDTA. As quantidades apresentadas foram adicionadas a 1 L de água.

Componente	Composição	Quantidade
FeCl ₃	2,8 g FeCl ₃ .6H ₂ O dissolvidos em 100 mL de HCl 0,1 M/L água destilada	10 mL
EDTA	3,9 g EDTA-Na ₂ dissolvidos em 100 mL de NaOH 0,1 M/L água destilada	9,5 mL

Tabela V – Composição da solução de micronutrientes. As quantidades apresentadas foram adicionadas a 1 L

Componente	Quantidade
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,00330 g/L
(NH ₄)Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O	0,00880 g/L
KBr	0,01200 g/L
KI	0,00830 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,02870 g/L
Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,01550 g/L
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,01460 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01250 g/L
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	0,01980 g/L
Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,04100 g/L
V ₂ O ₅	0,00089 g/L
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24H ₂ O	0,04740 g/L
H ₃ BO ₃	0,31000 g/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,22300 g/L

Anexo II

Inoculação das amostras independentes ($n=2$)

É importante estabelecer-se a diferença entre replicados e amostras independentes. Os replicados servem como um controle de qualidade interno do parâmetro que foi analisado na mesma amostra biológica. As amostras independentes (n) representam o número de vezes que a mesma experiência foi realizada. As amostras independentes têm como objetivos mostrar a reprodutibilidade dos resultados obtidos (Cumming et al., 2007; Vaux et al., 2012).

Inicialmente tinha-se pensado fazer a experiência apenas com uma amostra independente para cada espécie a cada temperatura ($n=1$). Contudo, com o decorrer do trabalho, constatou-se a disponibilidade de material suficiente para se fazer duas amostras independentes de cada espécie, para cada temperatura ($n=2$) de modo a providenciar uma maior confiança nos resultados finais. Geralmente, considera-se $n=3$, contudo neste trabalho não foi possível realizar-se três independentes devido à limitação de materiais. Também em Yunes *et al.* (2009) se usou $n=2$.

Uma vez que estas mudanças no desenho experimental ocorreram depois de se ter iniciado a experiência, algumas amostras independentes não foram inoculadas em simultâneo. A tabela seguinte representa quais as culturas que foram ou não inoculadas ao mesmo tempo.

Tabela VI – Inoculação simultânea de amostras independentes das espécies *Aphanizomenon gracile* LMECYA40 e *Cuspidothrix issatschenkoi* LMECYA31.

Temperatura	<i>A. gracile</i>	<i>C. issatschenkoi</i>
10 °C	Sim	Não
20 °C	Não	Não
30 °C	Sim	Sim

Como todos os parâmetros foram analisados em duas amostras independentes, foi possível realizar-se uma análise estatística.

Testes usados na análise estatística

- Teste de Correlação de Pearson

O teste de correlação de *Pearson* tem como objetivo avaliar se duas variáveis estão relacionadas entre si (McDonald, 2009). Neste trabalho utilizou-se somente este teste para se averiguar a existência de uma relação entre o crescimento e a temperatura.

Para tal é necessária a formulação das seguintes hipóteses:

H₀ (hipótese nula)	O crescimento e a temperatura são independentes
H₁ (hipótese alternativa)	O crescimento e a temperatura não são independentes

O teste foi realizado com uma significância de 95%. Caso o valor de p obtido fosse superior a 0,05 ($p > 0,05$), aceita-se a hipótese nula, não se estabelecendo uma relação entre o crescimento e a temperatura. Caso contrário, se o valor de p obtido for inferior ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) rejeita-se a hipótese nula e, portanto, afere-se uma relação entre o crescimento e a temperatura.

-Testes- t

Os testes-*t* são testes paramétricos que permitem estabelecer uma comparação entre a média de uma variável de uma amostra com a média da mesma variável noutra amostra. Existem três tipos de testes-*t*: amostras independentes, amostras emparelhadas e para uma amostra. Neste trabalho recorreu-se ao teste-*t* de amostras independentes e ao teste-*t* de amostras emparelhadas (McDonald, 2009).

Teste-*t* de amostras independentes: Aplica-se quando se pretende comparar as médias de uma variável em dois grupos biológicos independentes (McDonald, 2009). Neste estudo em concreto aplicou-se este tipo de teste-*t* para comparar diferenças estatisticamente significativas entre as culturas expostas a 10 e 20 °C.

Para tal é necessária a formulação das seguintes hipóteses:

H₀ (hipótese nula)	As médias das duas amostras são iguais
H₁ (hipótese alternativa)	As médias das duas amostras são diferentes

O teste foi realizado com uma significância de 95%. Caso o valor de *p* obtido fosse superior a 0,05 ($p > 0,05$), aceita-se a hipótese nula, e os valores médios das duas amostras são iguais. Caso contrário, se o valor de *p* obtido for inferior ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) rejeita-se a hipótese nula e, portanto, afere-se que as médias das amostras apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si.

Teste-*t* de amostras emparelhadas: Aplica-se em estudos onde os grupos biológicos são observados várias vezes ao longo da experiência (McDonald, 2009). Neste trabalho cada estirpe foi avaliada quatro vezes ao longo do tempo (fase de adaptação, exponencial inicial e final, e estacionária), e pretendeu-se perceber se havia diferenças estatisticamente válidas entre si.

Para tal é necessária a formulação das seguintes hipóteses:

H₀ (hipótese nula)	A diferença entre as médias das amostras é zero
H₁ (hipótese alternativa)	A diferença entre as médias das amostras é diferente de zero

O teste foi realizado com uma significância de 95%. Caso o valor de *p* obtido fosse superior a 0,05 ($p > 0,05$), aceita-se a hipótese nula, e a diferença entre as médias das amostras é zero. Caso contrário, se o valor de *p* obtido for inferior ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) rejeita-se a hipótese nula e, portanto admite-se que as diferentes fases do crescimento possuem diferenças estatisticamente significativas entre si.

De salientar que para se usar estes dois tipos testes-*t* foi necessário garantir dois pressupostos: as amostras têm que apresentar uma distribuição normal e uma homogeneidade de variâncias. Portanto, recorreu-se aos seguintes dois testes:

- Teste Kolmogorov-Smirnov: É um teste não paramétrico que permite avaliar se uma população segue uma distribuição normal (Lilliefors, 1967).

Para tal é necessária a formulação das seguintes hipóteses:

H₀ (hipótese nula)	A distribuição de cada amostra possui uma distribuição normal
H₁ (hipótese alternativa)	A distribuição de cada amostra não possui uma distribuição normal

O teste foi realizado com uma significância de 95%. Caso o valor de p obtido fosse superior a 0,05 ($p > 0,05$), aceita-se a hipótese nula, e a amostra analisada possui uma distribuição normal. Caso contrário, se o valor de p obtido for inferior ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) rejeita-se a hipótese nula e, portanto não tem uma distribuição normal.

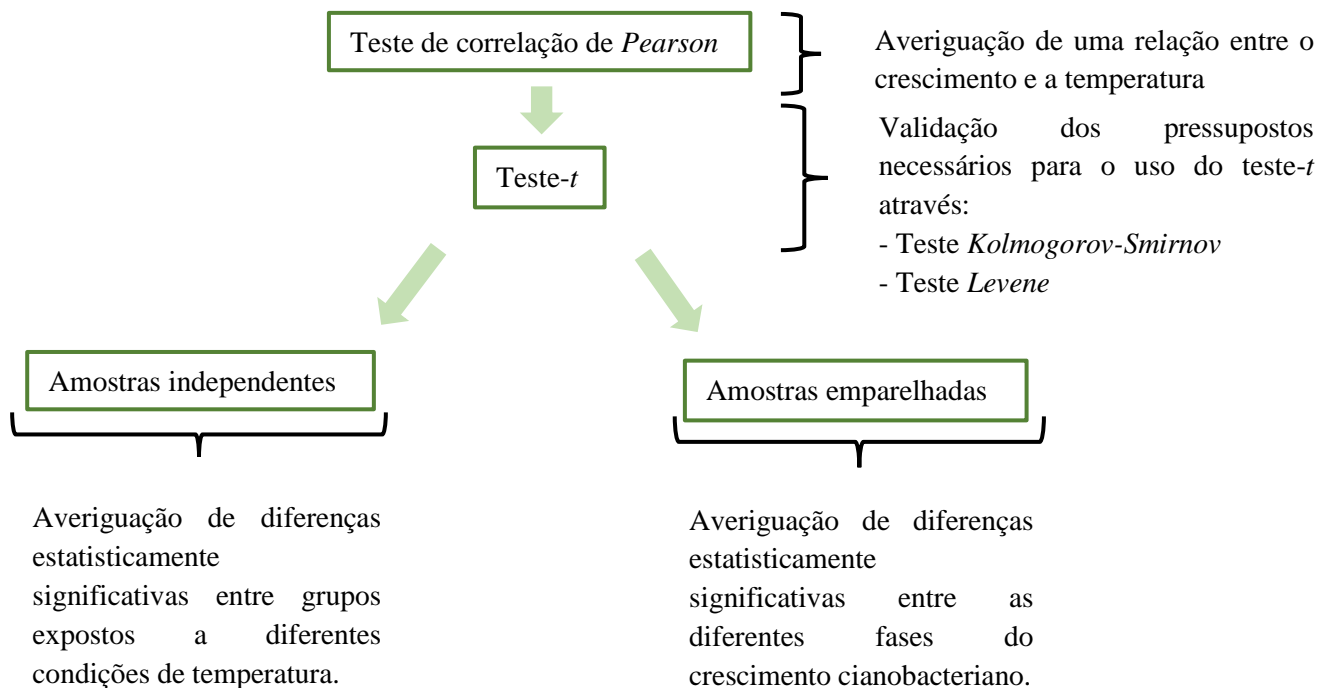
- Teste de Levene: Permite averiguar se duas amostras em estudo possuem iguais variâncias (Gastwirth et al., 2009).

Para tal é necessária a formulação das seguintes hipóteses:

H₀ (hipótese nula)	As variâncias das duas amostras são iguais
H₁ (hipótese alternativa)	As variâncias das duas amostras são diferentes

O teste foi realizado com uma significância de 95%. Caso o valor de p obtido fosse superior a 0,05 ($p > 0,05$), aceita-se a hipótese nula e as variâncias entre as duas amostras são iguais. Caso contrário, se o valor de p obtido for inferior ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) rejeita-se a hipótese nula e, portanto as variâncias são diferentes.

Em suma:



Anexo III

Protocolo de extração de DNA

(Adaptado de Santos & Phillips, 2009)

Tabela VII – Material utilizado na extração de DNA.

Material
Tubos eppendorf de 1,5 mL e 2 mL
Microesferas de vidro 425-600 µm (<i>Sigma</i>)
Tampão de lise
Fenol
Clorofórmio
Isopropanol
Etanol 70%
Gelo
Água destilada DNase/RNase free (<i>Gibco</i>)
Micropipetas e pontas

Tabela VIII – Equipamento utilizado na extração de DNA.

Equipamento
Hotte (<i>Kottermann</i>)
Vórtex (<i>Fisher Bioblock Scientific</i>)
Centrífuga (<i>Centrifuge 5415 C</i>)

Procedimento:

1. Colocar uma pequena quantidade de cultura fresca concentrada em tubos de 2 mL.
2. Adicionar 0,2 g de microesferas de vidro 425-600 µm.
3. Juntar 500 µL do tampão lise¹.
4. Transferir as amostras para o gelo.
5. Adicionar 500 µL de álcool isoamílico, na *hotte*.
6. Agitar no *vórtex* durante 20 min, à velocidade máxima.
7. Centrifugar durante 25 min, a 14500 rpm.
8. Descartar o sobrenadante.
9. Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol a 70% frio.
10. Centrifugar durante 5 min, 14500 rpm.
11. Descartar o sobrenadante.
12. Secar o *pellet* com o tubo aberto e invertido à temperatura ambiente durante 5-10 min.
13. Adicionar 50 µL de água destilada *DNase/RNase free*.
14. Conservar a -20 °C.

¹**Tabela IX**– Composição do tampão de lise utilizado na extração de DNA.

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

Anexo IV

Protocolo de extração de RNA

(Adaptado de Valério *et al.*, 2016)

Tabela X – Material utilizado na extração de RNA.

Material
Tubos eppendorf de 2 mL
Microesferas de vidro 425-600 µm (Sigma)
TRIzol® (Invitrogen)
Gelo
Clorofórmio
Isopropanol
Etanol 75%
Água destilada DNase/RNase free (Gibco)
Micropipetas e pontas

Tabela XI – Material utilizado na extração de RNA.

Equipamento
Hotte (Kottermann)
Vórtex (Fisher Bioblock Scientific)
Centrífuga refrigerada (4°C)
Banho

Procedimento:

1. Depois de se recolher a amostra para os tubos eppendorf de 2 mL, centrifugar e eliminar o sobrenadante.
2. Guardar o *pellet* a -80°C até extrair o RNA.
3. Descongelar as amostras e adicionar esferas de vidro nos tubos de 2 mL estéreis contendo o *pellet* das células.
4. Adicionar 1 mL de TRIzol.
5. Partir as células fazendo 6 ciclos alternados de: 1 min no *vórtex* - 30 s no gelo.
6. Colocar a 30°C, 5 min.
7. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio.
8. Agitar vigorosamente à mão.
9. Colocar a 30°C, 3 min.
10. Centrifugar 15 min, a 12000 x g, 4°C.
11. Transferir a fase aquosa para um tubo de 1,5 mL estéril e frio.
12. Adicionar 0,6 mL de isopropanol.
13. Colocar a 30°C, 10 min.
14. Centrifugar 10 min, a 10000 x g, a 4°C.
15. Eliminar o sobrenadante.
16. Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 75%.
17. Centrifugar 5 min, a 7500 x g, a 4°C.
18. Eliminar o etanol por inversão e deixar a secar o *pellet* à temperatura ambiente.
19. Dissolver em 40 µl de H₂O Gibco e quantificar por espectrofotometria (*NanoDrop*)
20. Guardar a -80°C.

Anexo V

Condições usadas no *PCR* convencional

Tabela XII – Temperatura de *annealing* e volume de cloreto de magnésio necessários para a amplificação ótima dos genes em estudo.

Gene	Temperatura de <i>annealing</i>	Quantidade de MgCl ₂ a 50 mM
<i>sxtA</i>	50°C	1,5 µL
<i>sxtM</i>	53°C	2,0 µL
<i>sxtPer</i>	52°C	1,5 µL
<i>rRNA 16S</i>	59°C	2,0 µL

Tabela XIII – Programa usado na realização do *PCR* convencional.

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	94°C	5 min	1x
Desnaturação	94°C	45 seg	39x
<i>Annealing</i>	<i>Tann</i> (descrita na tabela XI)	45 seg	
Extensão	72°C	90 seg	
Extensão final	72°C	5 min	1x

Anexo VI
Condições usadas no *RT-real-time-qPCR*

Tabela XIV - Programa usado na construção das retas padrão para *RT-real-time-qPCR*.

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	95°C	10 min	1x
Desnaturação	95°C	45 seg	40x
<i>Annealing</i>	60°C	45 seg	
Extensão	72°C	90 seg	
<i>Melting</i>	50°C - 95°C	Por cada seg aumenta 1°C	1x

Tabela XV - Programa usado nos ensaios de quantificação da expressão génica em *RT-real-time-qPCR*.

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclo
Transcrição reversa	42°C	10 min	1x
Ativação da polimerase	95°C	10 min	1x
Desnaturação	95°C	15 seg	40x
<i>Annealing</i>	60°C	30 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
<i>Melting</i>	50°C - 95°C	Por cada seg aumenta 1°C	1x