

---

*Juliana da Silva Martins Pimentel*

**Tese de Doutorado**

***ANÁLISES DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM  
CIANOBACTÉRIAS, COMO FERRAMENTA PARA  
ESTUDAR SUAS RELAÇÕES COM O AMBIENTE***

***Belo Horizonte***

***2013***

---

***Universidade Federal de Minas Gerais***

***Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e  
Manejo de Vida Silvestre***

***ANÁLISES DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM  
CIANOBACTÉRIAS, COMO FERRAMENTA PARA  
ESTUDAR SUAS RELAÇÕES COM O AMBIENTE***

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre.

Orientadora: Prof. (a) Dra. Alessandra Giani  
Departamento de Botânica, ICB, UFMG  
Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Cantini  
Departamento de Biologia Geral, ICB, UFMG

***Belo Horizonte***

***2013***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que representa minha força e meu alicerce!

Ao meu companheiro Guto, pela compreensão, amizade e amor!

Ao meu filhote Lucas, que chegou ao mundo no início deste trabalho e que me ajudou a entender o valor da vida e o sentido de tudo!

Aos todos meus familiares, especialmente meu pai e meus irmãos, pelo cuidado e amizade de sempre!

À querida orientadora Dra. Alessandra Giani, por acreditar em meu trabalho e pelo seu cuidado, incentivo, amizade e compreensão. Levarei comigo seu exemplo de profissionalismo e seriedade!

Ao meu co-orientador Dr. Álvaro Cantini, que me ajudou principalmente no estabelecimento das técnicas de extração de RNA, e me recebeu inúmeras vezes em sua sala, para discutirmos idéias e dúvidas sobre o trabalho.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Ficologia, pelo convívio diário e momentos de descontração, além das ajudas preciosas nas análises e coletas! À Naíla pela ajuda nas análises de clorofila; Ao Daniel Trindade e à Fernanda Paiva pela ajuda nas contagens e análises de microcistina; e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

Aos amigos Cleber e Elenice, pelos puxões de orelha, paciência e conselhos preciosos!

A colega e amiga Maria Kolman, pelas conversas construtivas sobre biologia molecular, que sempre renderam ótimas idéias para meu trabalho.

À toda equipe de coleta de Volta Grande, especialmente Ana Maria, Bruna e Valquíria, que muito se empenharam para o sucesso das coletas.

À equipe do laboratório de Hidrologia da Engenharia/UFMG, especialmente à Talita, pelas coletas e análises de água do reservatório da Pampulha.

---

Ao CDTN (UFMG) por ceder os dados climatológicos de Belo Horizonte, da época investigada na Pampulha.

À Capes pela bolsa concedida; À Cemig, CNPQ e FAPEMIG pelo financiamento do trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos!!!!

## SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract.....	10
Lista de Tabelas.....	12
Lista de figuras.....	13
1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 Microcistina.....	16
1.2 Efeitos do ambiente na produção de cianotoxinas.....	19
1.3 Biologia Molecular nos Estudos Ambientais com Cianobactérias.....	22
2.0 JUSTIFICATIVA.....	24
3.0 OBJETIVOS.....	25
4.0 Áreas de Estudo (Capítulo 2 e 3).....	26
4.1 Reservatório de Volta Grande.....	26
4.2 Reservatório da Pampulha.....	29
5.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 1:.....	37
Resumo.....	38
Abstract.....	38
1.0 Introduction.....	39
2.0 Experimental Procedures.....	41
2.1 Growth conditions and experimental design.....	41
2.2 Chlorophyll a and microcystin levels determination.....	42
2.3 mRNA isolation and RT qPCR.....	43
2.4 Statistical analyses.....	45
3.0 Results.....	45

4.0 Discussion.....	51
Acknowledgments .....	55
5.0 References.....	55
CAPÍTULO 2: .....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	62
1.0 Introdução .....	63
1.1 Estresse em cianobactérias .....	63
1.2 Justificativa e objetivos do trabalho.....	72
2.0 Materiais e Métodos.....	73
2.1 Análises físico-químicas e biológicas .....	73
2.2 Análises Moleculares .....	74
2.3 Análises estatísticas.....	77
3.0 RESULTADOS.....	79
3.1 Sazonalidade: Diferenças entre as estações secas e chuvosas.....	79
3.2 Nutrientes e resposta ao estresse.....	86
3.3 Cianobactéria e Cianopeptídeos .....	90
4.0 Discussão .....	92
4.1 Ambiente e Sazonalidade.....	92
4.2 Estresse em Cianobactérias.....	93
4.3 Cianobactérias e Cianopeptídeos .....	99
5.0 Conclusões .....	101
Agradecimentos.....	102
6.0 Referências.....	103

Capítulo 3:.....	112
Resumo.....	113
Abstract.....	114
1.0 Introdução .....	115
2.0 Materiais e Métodos.....	118
2.1 Análises físico-químicas e biológicas .....	118
2.2 Análises Moleculares .....	120
2.3 Análises estatísticas.....	122
3.0 Resultados e Discussão.....	124
3.1 Volta Grande .....	124
3.2 Pampulha .....	129
4.0 Conclusões .....	134
Agradecimentos .....	135
5.0 Referências.....	135
9.0 Considerações Finais.....	142

## RESUMO

As cianobactérias representam um grande grupo dentro dos organismos fitoplanctônicos. São organismos bastante diversos e principalmente em ambientes eutrofizados, estão presentes em grande quantidade. Um dos principais problemas relacionados a este grupo no ambiente aquático é a produção de toxinas, que podem causar problemas tanto para os seres humanos quanto para os organismos que vivem e dependem deste meio. Elas também são capazes de produzir uma gama de metabólitos secundários, muitos dos quais ainda com propriedades desconhecidas. As microcistinas são hepatotoxinas produzidas por muitas espécies de cianobactérias e são frequentemente encontradas nas florações tóxicas. Essa cianotoxina tem como consequência principal hemorragia no fígado e, a longo prazo, são consideradas promotoras de tumores. Nem todas as espécies de cianobactérias são tóxicas, mas a característica de produção de toxina está inscrita no genoma das produtoras, pela presença de genes *mcy*. Ainda não está claro o porquê da produção de cianopeptídeos e cianotoxinas para as cianobactérias e também se existem fatores ambientais que controlam esta produção. Estudos com mutantes observaram algumas diferenças entre cepas tóxicas e não tóxicas e alguns trabalhos indicaram pH, luminosidade, nutrientes e temperatura como possíveis causas da variação observada na concentração de toxinas nas células. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de fatores ambientais, tanto em laboratório quanto no ambiente natural, na expressão dos genes *mcyD* e de outros cianopeptídeos. Medidas de expressão de outros genes, ligados ao metabolismo de nitrogênio (*ntcA*), metabolismo do fósforo (*pstS*), metabolismo do ferro (*furN*) e estresse oxidativo (*perM*), foram mensurados no campo na tentativa de se verificar os fatores que poderiam ter um efeito na produção dos cianopeptídeos pelas cianobactérias. Também, se investigou a fração tóxica (produtora de microcistina) e não tóxica de populações naturais de cianobactérias e a presença de alguns cianopeptídeos no ambiente por meio de métodos moleculares. Para o estudo de laboratório, foram utilizadas duas cepas de cianobactérias e realizados experimentos com limitação pelos macronutrientes fósforo e nitrogênio. Para os estudos

ambientais foram coletadas oito amostras de um reservatório eutrofizado, lagoa da Pampulha, e doze amostras de um reservatório considerado oligomesotrófico, Volta Grande. Verificou-se a influência de parâmetros abióticos na expressão gênica de vários dos genes estudados e também na produção de microcistina. Sob condições de estresse, observamos, em laboratório, um aumento da expressão do gene biossintético da microcistina e, no campo, aumento da cianopectolina. Os resultados obtidos neste estudo parecem indicar que o estresse causado por mudanças nos parâmetros ambientais possa induzir a produção de certos cianopeptídeos e que isso pode auxiliar, de alguma forma, na aclimação e sobrevivência das cianobactérias a fatores desencadeadores de estresse. Possivelmente, este estudo contribuirá para uma melhor compreensão sobre quais fatores estão ligados a regulação da produção de microcistina e também sobre a função potencial dos cianopeptídeos para a célula. Além do mais, poderá auxiliar futuras pesquisas e procedimentos de controle de cianobactérias no ambiente.

Palavras-chaves: Cianobactérias, Cianopeptídeos, microcistina, *mcyD*, PCR quantitativa, expressão gênica

## ABSTRACT

Cyanobacteria represent an important group among phytoplanktonic organisms. They are very diverse and can be mainly found in highly eutrophic environments. One of the main problems related to cyanobacteria is the production of toxins that can be harmful for both of humans beings and aquatic animals. Additionally, they are capable of producing a variety of secondary metabolites with function is still unknown. Microcystins are hepatoxins produced by many species of cyanobacteria and they are the main toxins found in toxic blooms. They can cause liver hemorrhages and, in the long run, it seems that they can induce tumors appearance. However not all cyanobacteria species are toxic and this characteristic is found in the genome of toxics strains by the presence of the *mcy* genes. Very little is known about the real function of the cyanotoxins and about whether their production is controlled by environmental factors. Some researches indicated pH, light, nutrients and temperature as possible reasons for the variation of toxin production observed in the environment. The purpose of this work was to evaluate in laboratory experiments and in the environment, the effect of environmental factors in the expression of the *mcyD* gene and others cyanopeptides. Furthermore, measures of others genes, linked to nitrogen metabolism (*ntcA*), phosphorous uptake (*pstS*), iron metabolism (*furN*) and oxidative stress (*perM*), were performed in the field in an attempt to verify factors that could affect cyanopeptides' production in cyanobacteria. We also investigated the toxic and non-toxic fractions of natural cyanobacteria populations and the presence of some cyanopeptides, by mean of molecular methods. In the laboratory experiments, two cyanobacteria strains were submitted to different levels of phosphorus and nitrogen limitation. In the environmental studies, eigh samples from an eutrophic reservoir, Pampulha, and twelve samples of the an oligotrophic reservoir, Volta Grande, were collected. We observed that environmental factors had an effect on the gene expression of several genes tested and on microcystin production. Under stress conditions, we observed higher production of two cyanopeptides, microcystin in the lab and

---

cyanopeptolin in the field. The results obtained in this study seem to indicate that the stress caused by changes in environmental parameters can induce the production of certain cyanopeptides and this could somehow help in the process of acclimatization and survival of cyanobacteria to factors triggered by stress. It is possible that this study will contribute to a better understanding about which factors are associated with the regulation of microcystin production and the potential function of the cyanopeptides for the cell. Moreover, this research may give support to futures studies and procedures dealing with the control of cyanobacteria populations in water bodies.

Key words: Cyanobacteria, Cyanopeptides, microcystin, *mcyD*, quantitative PCR, gene expression.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Table 1: Sequences of the primers used in this study for the phycocyanin region (*cpcB*), the housekeeping gene (16S rRNA), the nitrogen regulator (*ntcA*) and microcystin (*mcyD*)..... 49

Table 2: Chlorophyll *a*, microcystin and cell density for each nutrient concentration in the nitrate and phosphate experiments.....50

### Capítulo 2

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo ..... 78

Tabela 2: Dados ambientais do reservatório de Volta Grande: parâmetros físico-químicos e biológicos..... 81

Tabela 3: Dados ambientais da Lagoa da Pampulha ..... 85

### Capítulo 3

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo ..... 123

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reservatório de Volta Grande e pontos amostrados. Gravura adaptada de Vargas (2001).....	27
Figura 2. Fotos de diferentes regiões do Reservatório de Volta Grande.....	28
Figura 3. Reservatório da Pampulha.....	30
Figura 4. Fotos mostrando a Lagoa da Pampulha, um reservatório urbano considerado cartão postal de Belo Horizonte.....	31

### Capítulo 1

Figure 1. Relative Quantification of <i>cpcB</i> , <i>mcyD</i> and <i>ntcA</i> genes in the nitrate assay.....	46
Figure 2. Relative Quantification of <i>cpcB</i> , <i>mcyD</i> and <i>ntcA</i> genes in the ammonium assay.....	47
Figure 3. Relative Quantification of <i>cpcB</i> and <i>mcyD</i> genes in the phosphate assay.....	47
Figure 4. Regression analyses between $\Delta$ CT of <i>mcyD</i> e <i>ntcA</i> genes for all experimental data obtained.....	48

### Capítulo 2

Figure 1. Esquema da percepção, tradução e aclimação das células às condições de estresse.....	65
Figure 2. Esquema mostrando a percepção e tradução do sinal de limitação por fósforo em <i>Synechocystis</i> .....	67
Figura 3. Figura mostrando um conjunto de genes de resposta rápida, dentre eles o <i>pstS</i> , à limitação por fosfato.....	67
Figura 4. Variação dos dados ambientais na estação seca e chuvosa em VG.80	
Figura 5. Variação dos dados ambientais de expressão dos genes ligados ao estresse, nas estações seca e chuvosa em VG.....	80
Figura 6. Variação sazonal entre os meses e pontos amostrados, e repostas dos genes ao estresse no reservatório de Volta Grande.....	82

Figura 7. Variação dos dados ambientais entres as estações seca (A) e chuvosa (B) na Pampulha. ....	83
Figura 8. Variação dos dados de expressão gênica entres as estações seca (A) e chuva (B) na Pampulha.....	84
Figura 9. Variação sazonal entre os meses amostrados, e respostas dos genes no reservatório da Pampulha .....	84
Figura 10: Correlação entre os genes de estresse e parâmetros abióticos em VG.....	87
Figura 11. Correlação entre os genes ligados ao estresse em cianobactérias em Volta Grande .....	88
Figura 12. Correlações encontradas no reservatório da Pampulha, entre fontes de fósforo e expressão de alguns genes.....	89
Figura 13. Correlações encontradas na Pampulha entre valores de expressão de alguns dos genes estudados.....	90
Figura 14. Variação da expressão dos genes ligados a produção de cianopeptídeos <i>aer</i> , <i>cnp</i> e <i>mcyD</i> , na lagoa da Pampulha .....	91

### Capítulo 3

Figura 1. Variação da presença de cianobactérias potencialmente produtoras de MIC ( <i>Microcystis Planktothrix</i> e <i>Anabaena</i> ), picoplâncton e toxicidade (MIC e <i>mcyD</i> ) no reservatório de Volta Grande, no período de agosto a novembro de 2011, em três pontos amostrados.....	126
Figura 2. Correlação entre genótipos que apresentaram o gene <i>mcyD</i> e fósforo total. ....	127
Figura 3. Gel de agarose mostrando a variação da presença/ausência dos peptídeos durante o período estudado em VG.....	128
Figura 4. Variação de genótipos <i>mcyD</i> (cel.mL <sup>-1</sup> ) e microcistina (µg.L <sup>-1</sup> ) ao longo do período estudado no reservatório da Pampulha.....	132
Figura 5. Variação das espécies potencialmente produtoras de microcistina (em %) em relação ao número total de cianobactérias (em cel.mL <sup>-1</sup> ) no reservatório da Pampulha, no período de estudo. ....	132
Figura 6. Gel de agarose mostrando a variação da presença/ausência dos peptídeos durante o período estudado na Pampulha.....	133

## 1.0 INTRODUÇÃO GERAL

Cianobactérias são organismos procariontes, microscópicos e ocupam uma extraordinária variedade de nichos ecológicos, incluindo habitats marinhos, de água doce e terrestre, dentro de uma ampla zona climática (Fray 1983). No entanto, densidade celular, composição das espécies, distribuição vertical e longevidade diferem entre os ambientes e regiões habitadas. Essas diferenças podem ser explicadas tanto por condições climáticas e meteorológicas, que influenciam o grau de estratificação e mistura da água, quanto pela disponibilidade de luz e nutrientes (Oliver e Ganf 2002).

As cianobactérias foram os primeiros organismos a realizarem fotossíntese oxigênica no planeta (Castenholz e Waterbury 1989) e bilhões de anos de evolução propiciaram mecanismos de sobrevivência às cianobactérias tanto em ambientes extremos quanto a mudanças rápidas do ambiente. Estes organismos são submetidos constantemente a flutuações sazonais, ciclos naturais de enchentes e secas, bem como poluição. Além do mais, as cianobactérias estão aptas a viver em ambientes oligotróficos, onde há escassez de nutrientes, pois possuem eficientes mecanismos de reserva e também muitas delas são diazotróficas, ou seja, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (Flores e Herrero 2005).

Graças à presença de aerótopos (vesículas de gás) nas suas células, algumas cianobactérias são capazes de formar escumas ou florações, caracterizadas pelo crescimento excessivo destes organismos, com acumulação de uma massa celular na superfície de águas de mananciais, represas ou lagos. São

também conhecidos alguns grupos capazes de formar florações em diferentes profundidades da coluna d'água (Rapala 1997), regulando sua posição na mesma. Altas concentrações de fósforo e nitrogênio favorecem à floração das cianobactérias, onde ocorre a dominância de poucas ou apenas uma espécie.

Um dos sérios problemas relacionados à floração é que a maioria contém cianobactérias capazes de produzir toxinas (Chorus e Bartram 1999; Roset *et al* 2001). Florações de cianobactérias vêm sendo registradas em todo o mundo, e cerca de 60% das amostras investigadas continham toxinas (WHO 2003). A presença de cianotoxinas na água pode trazer como consequência principal a morte de peixes, crustáceos, aves e outros animais domésticos (Salomom *et al.* 1996). Além do mais, 46 espécies de cianobactérias já mostraram ter efeitos tóxicos em vertebrados (Sivonen e Jones 1999).

### **1.1 Microcistina**

As cianotoxinas são divididas principalmente em hepatotoxinas e neurotoxinas, cujo efeito no organismo está relacionado ao nome das mesmas. A microcistina é uma hepatotoxina e depois de ingerida, é transportada para o fígado por proteínas transportadoras de ânions orgânicos, onde elas exibem sua toxicidade via inibição das proteínas fosfatase 1 e 2A (Runnegar *et al.*, 1995; Dawson, 1998). Doses aproximadas de 50-70 µg por Kg de peso corpóreo podem provocar morte rápida em animais (Sivonen e Jones 1999). Fatalidades em humanos já foram relatadas após exposição aguda à microcistina (Jochimsen 1998), enquanto que doses crônicas ou sub-letais podem ser carcinogênicas (Nishiwaki-Matsushima *et al.* 1992; Yu 1995).

A microcistina compreende o maior e mais estruturalmente diverso grupo de cianotoxinas encontrada em água doce (Vezie *et al.* 2002). Foram identificadas cerca de 90 isoformas de microcistina, variando quanto ao grau de metilação, hidroxilação, seqüência de peptídeo e toxicidade (Welker and Von Döhren 2006). A capacidade de produção de cianotoxinas não é espécie-específica e devido a isso a identificação de cepas tóxicas não pode ser realizada por métodos morfológicos tradicionais. Apesar disso, existem alguns gêneros comumente produtores de microcistina, sendo eles compostos pelos gêneros planctônicos *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix* e *Nostoc* (Sivonen e Jones 1999). Entretanto, a produção de microcistina tem sido documentada também em gêneros terrestres (Honkanen *et al.* 1995), como *Hapalosiphon* (Prinsep *et al.* 1992) e recentemente em gêneros de água doce e salobra, como *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Pseudoanabaena*, *Synechococcus* e *Synechocystis* (Sivonen e Borner 2008).

A base genética da produção de cianotoxinas vem sendo identificada e genes biossintéticos, responsáveis por uma gama complexa de compostos ativos vem sendo sequenciados e caracterizados (Neilan 2013). Microcistinas são sintetizadas pelo mecanismo "Thio-Template" caracterizado por peptídeos não ribossomais (NRPS), síntese de policetônicos (PKS) e síntese de ácidos graxos (Fischbach e Walsh, 2006). O conjunto gênico biossintético da microcistina (*mcy*) contém 55 kb de DNA, que codificam dez ORFs (janela aberta de leitura), de *mcyA* a *mcyJ* (Tillett *et al.*, 2000). Essas ORFs são flanqueadas em ambos os lados por genes que não estão envolvidos na biossíntese da toxina (*dna N* e *uma 1-6*). A transcrição dos genes *mcy* ocorre via dois operons

policistrônicos, *mcyABC* e *mcyDEFGHIJ*, de um promotor central bidirecional entre *mcyA* e *mcyD* (Kaebernick *et al.* 2002). A descrição do conjunto gênico *mcy* por Tillet *et al.* (2000) possibilitou um grande avanço nos estudos genéticos ligados a produção de microcistina, possibilitando um exame mais preciso da regulação deste peptídeo a nível molecular e também o entendimento de muitas questões ecológicas relacionadas a esta regulação (Vezie *et al.* 2002; Rantala *et al.* 2006; Yoshida *et al.* 2006).

O poder toxicológico da microcistina pode não necessariamente refletir a função primária para as células que as produzem (Zilliges *et al.* 2011). Há tempos acredita-se que as cianotoxinas são metabólitos secundários (Carmichael 1992), ou seja, não são utilizados pelo organismo em seu metabolismo primário. Entretanto, houve um grande avanço na tentativa de se compreender o papel biológico da microcistina e estudos recentes indicaram uma função intracelular desta molécula. Estudos com mutantes *mcy* vêm sendo importantes na elucidação destas questões. Cepas que perderam a capacidade de produzir toxina se tornaram diferentes fenotipicamente, pois apresentaram um tamanho reduzido da célula, mudanças na pigmentação, na agregação celular (Dittmann *et al.*, 1997; Hesse *et al.*, 2001). Mudanças fisiológicas também foram observadas, como por exemplo uma diminuição do conteúdo de carbono e de clorofila-a (Jahnicken *et al.* 2007) em mutantes não tóxicos com relação as cepas sem mutação, sob condições de limitação de carbono, sugerido uma habilidade limitada do mutante em se adaptar a estas condições.

Essas diferenças têm motivado estudos com genomas de cepas tóxicas e não tóxicas, para verificar a regulação da microcistina e seu papel global a nível

molecular. Dois recentes estudos proteômicos revelaram que um alto número de proteínas foram expressas de forma diferenciada em cepas tóxicas e não tóxicas, sugerindo que a produção de microcistina possui um efeito complexo e generalizado em *Microcystis* (Zilliges *et al.*, 2011; Alexova *et al.*, 2011). Foram demonstradas diferenças no acúmulo de proteínas do metabolismo do carbono, em particular no ciclo de Calvin-Benson, como as ficobiliproteínas e várias outras proteínas ligadas ao metabolismo redox, como as 2 redutases dependentes de NADPH (Zilliges *et al.* 2011). Este estudo revelou que parte do acúmulo diferencial de proteínas é devido à ligação covalente da toxina a resíduos de cisteína, particularmente sob condições de estresse oxidativo. Essas diferenças são interessantes do ponto de vista ecológico e podem favorecer um ou outro genótipo (ecótipo) sob condições ambientais específicas (Neilan 2013).

## **1.2 Efeitos do ambiente na produção de cianotoxinas**

Durante as duas últimas décadas, inúmeros estudos vêm sendo realizados a fim de se verificar o efeito das condições ambientais na produção de cianotoxinas. Temperatura, irradiância, macronutrientes (nitrato, amônia e fosfato), elementos traços (ferro e outros), salinidade, CO<sub>2</sub> e pH (Sivonen e Jones 1999) são os principais fatores abióticos estudados. Todos estes fatores modificaram de alguma forma o conteúdo das toxinas, mas frequentemente não de forma expressiva (Kurmayer 2011). Em poucos casos (Rapala *et al.* 1997), esta modificação ocorreu com valores até 30 vezes mais elevados sob diferentes condições de temperatura, quando as cepas cresceram pouco. Orr e

Jones (1998) sugeriram que a produção de microcistina pode estar ligada diretamente à divisão celular do organismo e, portanto microcistina seria indiretamente influenciada por fatores ambientais que afetam o crescimento celular. Ainda, estes mesmos autores concluíram que embora microcistina seja um metabolito secundário ela possui atributos de compostos nitrogenados intracelulares essenciais em cianobactéria. Long et al (2001) observaram que sob condições limitantes de nitrogênio, células de *Microcystis aeruginosa* possuem rápido crescimento e são menores, de massa inferior e superior conteúdo intracelular de toxinas, com relação as células de crescimento lento (sem limitação). Esses resultados mostraram uma relação positiva linear entre conteúdo de microcistina e taxa específica de crescimento. Ainda, um recente trabalho encontrou que a síntese de microcistina e nodularina é regulada por baixas concentrações de fósforo, baixa irradiação e condições de temperatura e a ligação das taxas de produção de ambos os compostos é relacionada ao processo de divisão celular ou crescimento populacional. Sendo assim, a síntese de ambos os metabolitos poderia estar ligada ao metabolismo primário (Kurmayer 2011).

Pesquisas relacionadas ao processo de regulação dos transcritos *mcy* estão auxiliando na compreensão sobre a real importância da microcistina para a célula. Primeiramente, para o conjunto de genes *mcy* de *Microcystis*, mostrou-se que a região promotora é bi-direcional com dois diferentes locais de iniciação da transcrição, sob altas e baixas condições de luz (Kaebernick et al 2002). Adicionalmente, a região promotora contém regiões ligantes de fatores de transcrição, como o regulador Fur (controla a entrada de Fe) que reprime a

expressão gênica na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  (Martin Luna et al 2006). Notavelmente, uma inter-relação entre quantidade extracelular de Fe e a taxa de transcrição de *mcy* foi relatada recentemente (Sevilla et al 2008). Nishizawa et al (1999) e Kaebernick et al (2000), enfatizaram diferentes efeitos da irradiância na transcrição dos genes *mcy* em *Microcystis*. Foi observado um aumento na transcrição sob luz mais elevada ( $68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e luz vermelha, enquanto que em baixa quantidade de luz e escuro as taxas de transcrição tornaram-se reduzidas. Também uma relação positiva entre transcritos *mcy* e irradiância foi observada para *Planktothrix agardhii* (Tonk et al 2005). Ainda, quando se estudou a influência da irradiação e temperatura, a inter-relação entre ambos os fatores no nível de transcritos *mcy* foi observado (Kim et al., 2005).

Também, outros cianopeptídeos podem ser regulados por condições ambientais adversas. O efeito da luz, nitrogênio e fósforo na produção de anabaenopeptinas e microviridinas foi recentemente medido em *Planktothrix* (Rohrlack e Utkilen, 2007). O resultado deste trabalho sugeriu que estes outros cianopeptídeos são da mesma forma que microcistina, controlados por fatores abióticos fundamentais para a célula. Entretanto, sabe-se que esta regulação pode ser realizada de forma diferenciada, de acordo com o peptídeo estudado. Cianopeptolina, microcistina e anabaenopeptina foram avaliadas juntas sob condições de variação de luz, temperatura e fósforo (Tonk et al , 2009), e neste estudo foi observado que alguns peptídeos tiveram sua expressão aumentada sob determinadas condições, enquanto em outros correu a diminuição de transcritos. Os autores concluíram que a produção de cianopeptídeos é dependente das condições abióticas.

A partir dos resultados encontrados pelos diversos autores citados acima, fica evidente a importância dos fatores ambientais na produção de microcistina e o fato que estas moléculas podem ser extremamente importantes e ligadas a metabolismos essenciais para a célula. A compreensão de como estes fatores abióticos regulam a produção dos metabólitos secundários em cianobactérias pode fornecer um auxílio para se compreender a dinâmica das toxinas em ambientes naturais (Kurmayer 2011).

### **1.3 Biologia Molecular nos Estudos Ambientais com Cianobactérias**

A aplicação de métodos moleculares, tanto diretamente no ambiente quanto no laboratório, é uma consequência da redução dos custos desta tecnologia, juntamente com o avanço das técnicas, que proporcionaram uma manipulação mais segura e precisa dos ácidos nucleicos (Sharkey et al 2004). Estas técnicas possuem um amplo espectro de aplicação, como análises quantitativas de rRNA em comunidades microbianas (Beer et al 2002), detecção de patógenos específicos (Lyon 2001; Makino et al 2001) e quantificação ou detecção de genes específicos envolvidos em processos biológicos (Meckenstock et al 1998).

A PCR tradicional é utilizada apenas para detecção de genótipos tóxicos no ambiente, através do uso de marcadores moleculares específicos, como os *mcy*, por exemplo (Sivonen 2008). Adicionalmente, ensaios de PCR quantitativa (qPCR) ou PCR em tempo real podem ser usados para quantificação absoluta destes genótipos tóxicos (Yoshida et al 2006, Rantala et al 2006) ou para medidas de expressão gênica destes mesmos genes,

dependendo do enfoque do trabalho. Análises de expressão gênica microbiana, combinam atributos das técnicas qPCR com RT-PCR (ensaio de transcrição reversa), sendo ambas extremamente sensíveis, rápidas e relativamente fáceis de serem realizadas (Ginzinger 2002; Klein 2002).

A qPCR é uma metodologia baseada na quantificação da concentração do produto durante cada ciclo da PCR, verificado pelo aumento da fluorescência (Heid et al 1996). Dois principais corantes fluorescentes (fluoróforos) são utilizados nesta técnica: Syber Green ou Taq Man. Quando o aparelho de PCR começa a detectar os sinais de amplificação, através da fluorescência, gera-se o ciclo limiar de detecção (Ct), que permite a quantificação das amostras através da comparação deste Ct com os das amostras padrões (com quantidade de DNA conhecidas) ou genes de referência, para gerar o delta Ct, em análises de expressão gênica.

O corante Syber Green é muito utilizado em análises de qPCR devido ao seu baixo custo e por se ligar a qualquer fita dupla de DNA (Sharkey et al 2004). Entretanto, esta última característica torna esta molécula inespecífica e alguns cuidados adicionais devem ser tomados para que não haja quantificação de outros genes, além do que quer se estudar.

A aplicação de técnicas moleculares para estudos das cianotoxinas aumentou grandemente durante a última década. Apesar disso, o uso destas técnicas em estudo ambientais, monitoramento de água e avaliação de riscos ainda está apenas no começo. O desenvolvimento de métodos automatizados e aplicáveis no campo poderá contribuir para uma maior integração entre ferramentas

genéticas e rotinas de programas de monitoramento (Kurmayer e Christiansen 2008).

## **2.0 JUSTIFICATIVA**

O aumento de cianobactérias tóxicas nos ambientes aquáticos e o risco potencial que as cianotoxinas representam para saúde humana, junto ao fato que apenas parte da população de uma cianobactéria vai apresentar toxidez, mostram a necessidade de mais estudos que ajudem a compreender melhor a relação dos fatores ambientais com o processo de regulação das cianotoxinas. Além do mais, a exposição constante de cianobactérias a estresse abióticos no campo é muito comum, apesar de pouco avaliadas. A compreensão do comportamento das cianobactérias perante estas mudanças, que poderiam direcionar ou induzir a produção de microcistina ou outros cianopeptídeos, é também de extrema importância, para se propor medidas mais eficazes para o controle e monitoramento de cianobactérias tóxicas.

Até o presente, estudos objetivando avaliar a influência de fatores ambientais na produção de microcistina apresentaram resultados conflitantes. Além disso, a impossibilidade de se diferenciar populações tóxicas e não tóxicas por simples análises de microscopia, sugere o uso de métodos moleculares, como ferramentas extremamente eficazes e úteis para se quantificar e determinar os efeitos dos fatores ambientais na ocorrência e concentrações de toxinas no ambiente. Estes estudos poderão nos auxiliar na compreensão da dinâmica das cianobactérias e do seu mecanismo de produção de toxinas perante as mudanças dos fatores abióticos.

### 3.0 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do estresse por nitrogênio e fósforo, em condições controladas, na produção de microcistina (transcritos *mcyD*), por meio da técnica de RT-qPCR;
- Verificar a possível existência de uma relação entre transcritos *mcyD* e *ntcA*, a fim de verificar o envolvimento de microcistina com processos celulares essenciais;
- Estudar o efeito de fatores abióticos na transcrição de genes ligados ao estresse ambiental e em genes ligados a produção de cianopeptídeos;
- Discutir as vantagens fisiológicas da expressão da toxidez para o fitness de uma espécie e suas adaptações ao ambiente;
- Investigar a diversidade de genótipos produtores de cianopeptídeos nos ambientes estudados;
- Mostrar a importância de métodos moleculares para responder a perguntas ecológicas relevantes, e a precisão destas respostas, principalmente para populações de microrganismos.

## **4.0 ÁREAS DE ESTUDO (CAPITULO 2 E 3)**

### **4.1 Reservatório de Volta Grande**

O reservatório de Volta Grande está situado na divisa de São Paulo e Minas Gerais e é resultado do represamento de rio Grande há 30 anos, para produção de energia hidrelétrica. O resultado foi o alagamento de uma área de aproximadamente 221 km<sup>2</sup> e com volume de 2.268 km<sup>3</sup>. O clima é tipicamente tropical com uma variação média anual de 22°C e um volume de chuva médio de 1.635 mm. A região é dividida em dois períodos sazonais: quente e chuvoso, de outubro a março e frio e seco, de abril a setembro (Braga e Gomiero, 1997).

Para o presente trabalho, com auxílio de toda equipe do laboratório de Ficologia da UFMG, foram realizadas quatro coletas em três diferentes pontos do reservatório (fig.1), sendo duas no período seco (agosto e setembro), e duas no período chuvoso (outubro e novembro), no ano de 2011.



**Figura 1.** Reservatório de Volta Grande e pontos amostrados. Gravura adaptada de Vargas (2001).

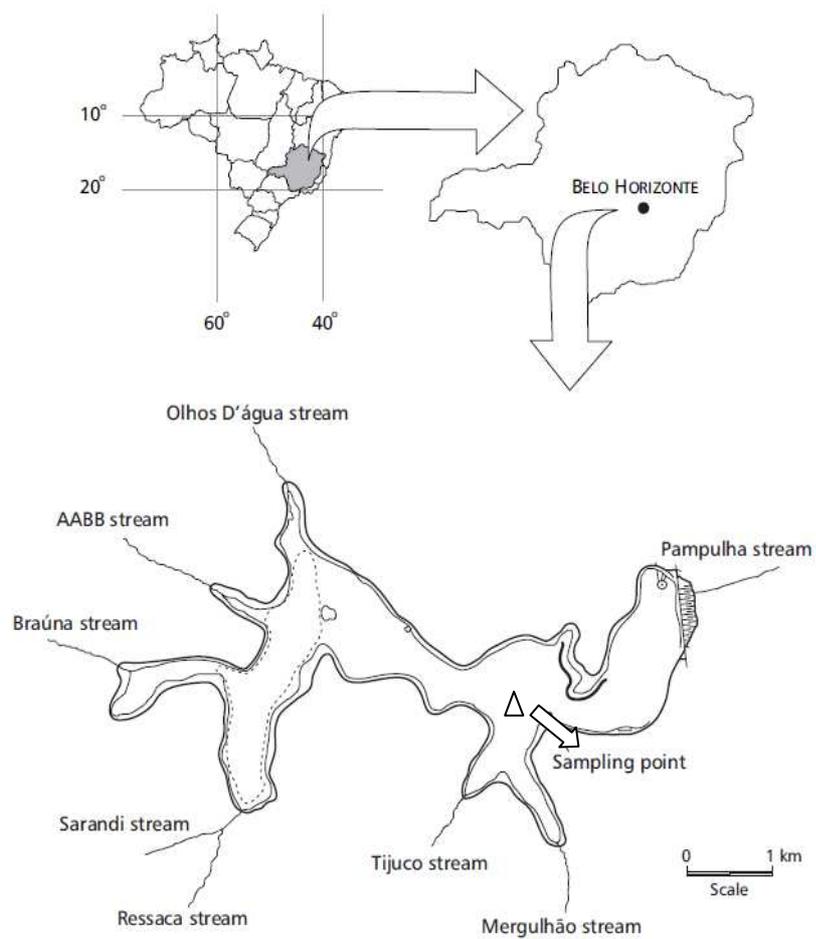


**Figura 2.** Fotos de diferentes regiões do Reservatório de Volta Grande

## **4.2 Reservatório da Pampulha**

O reservatório da Pampulha, conhecido como lagoa da Pampulha, é um reservatório urbano, localizado em Belo Horizonte, MG. Seu volume de água chega a cerca de  $9 \times 10^6 \text{ m}^3$  e a área do lago é de  $1.82 \text{ km}^2$ , com profundidade média de 4.98m (Bezerra-Neto e Pinto-Coelho, 2010). O clima da região é dividido em duas distintas estações: estação seca (abril a setembro) e estação chuvosa (outubro a março).

Amostras do reservatório da Pampulha foram coletas pela equipe do laboratório de Hidrologia da Engenharia/ UFMG e cedidas para este estudo, em apenas um ponto do reservatório (fig. 3). Foram realizadas oito coletas, sendo três nos meses de seca (23/08/12, 10/10/12 e 23/10/12), e cinco nos meses de chuva (21/11/12, 19/12/12, 09/01/13, 23/01/13 e 08/02/13).



**Figura 3.** Reservatório da Pampulha. Ponto de amostragem está representado com o símbolo  $\Delta$ . Figura adaptada de Eskinazi-Sant'anna et al (2002).



**Figura 4.** Fotos mostrando a Lagoa da Pampulha, um reservatório urbano considerado cartão postal de Belo Horizonte

## 5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B. C., & Neilan, B. A. (2011). Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology*, 13(4), 1064-1077.

Beer, M., E. M. Seviour, Y. Kong, M. Cunningham, L. L. Blackall, & R. J. Seviour. 2002. Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiol. Lett.* 207:179–183.

Bezerra-Neto, J. F. & R. M. Pinto-Coelho. 2010. Nova batimetria do Reservatório da Pampulha com estimativa do volume de dragagem do compartimento z<1,0m. Relatório Técnico-Científico. AMBITEC, São Paulo (SP), 23 pgs.

BRAGA J, F. M. S., & GOMIERO, L. M. (1997). Análise da pesca experimental realizada no reservatório de Volta Grande, rio Grande (MG-SP). *Carmichael* 1992

Castenholz, R. W., & Waterbury, J. B. (1989). Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3, 1710-1806.

Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Spon Press.

Dawson, J. F., Wang, K. H., & Holmes, C. F. (1996). Identification and characterization of cAMP-dependent protein kinase and its possible direct interactions with protein phosphatase-1 in marine dinoflagellates. *Biochemistry and cell biology*, 74(4), 559-567.

Dittmann, E., Neilan, B. A., Erhard, M., Von Döhren, H., & Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology*, 26(4), 779-787.

Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical reviews*, 106(8), 3468-3496.

Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 164-167.

Fay, P. (1983). *The Blue-greens: (cyanophyta-cyanobacteria)* (Vol. 160). E. Arnold.

- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6), 503-512.
- Hesse, K., Dittmann, E., & Börner, T. (2001). Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(1), 39-43.
- Honkanan, R. E., Codispoti, B. A., Tse, K., & Boynton, A. L. (1994). Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon*, 32(3), 339-350.
- Jahnichen, S., Ihle, T., Petzoldt, T., and Benndorf, J. (2007) Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* 73: 6994–7002.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., ... & Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 873-878.
- Kaebnick, M., Neilan, B. A., Börner, T., & Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3387-3392.
- Kaebnick, M., Dittmann, E., Börner, T., & Neilan, B. A. (2002). Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial. *Applied and environmental microbiology*, 68(2), 449-455.
- Kim, H.R., Kim, C.K., Ahn, T.S., Yoo, S.A. & Lee, D.H. (2005). Effects of temperature and light on microcystin synthetase gene transcription in *Microcystis aeruginosa*. *Key Engineering Materials* 277-279, 606-611.
- Kurmayer, R. (2011). The toxic cyanobacterium *nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *Journal of phycology*, 47(1), 200-207.
- Kurmayer, R., & Christiansen, G. (2009). The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshwater reviews*, 2(1), 31-50.
- Long, B. M., Jones, G. J., & Orr, P. T. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 278-283.
- Lyon, W. J. (2001). TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4685-4693.

- Makino, S. I., Cheun, H. I., Watarai, M., Uchida, I., & Takeshi, K. (2001). Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33(3), 237-240.
- Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2006). Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*, 67(9), 876-881.
- Meckenstock, R., Steinle, P., Meer, J. R., & Snozzi, M. (1998). Quantification of bacterial mRNA involved in degradation of 1, 2, 4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 from liquid culture and from river sediment by reverse transcriptase PCR (RT/PCR). *FEMS microbiology letters*, 167(2), 123-129.
- 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(5), 1239–1253
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., ... & Fujiki, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 118(6), 420-424.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. I., & Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *Journal of Biochemistry*, 126(3), 520-529.
- Oliver, R. L., & Ganf, G. G. (2002). Freshwater blooms. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 149-194). Springer Netherlands.
- Orr, P. T., & Jones, G. J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*, 43(7), 1604-1614.
- Prinsep, M. R., Caplan, F. R., Moore, R. E., Patterson, G. M., E Honkanen, R., & Boynton, A. L. (1992). Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the Stigonematales. *Phytochemistry*, 31(4), 1247-1248.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., & Sivonen, K. (2006). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6101-6110.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., & Niemelä, S. I. (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and environmental microbiology*, 63 (6), 2206-2212.

- Rohrlack, T., & Utkilen, H. (2007). Effects of nutrient and light availability on production of bioactive anabaenopeptins and microviridin by the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Hydrobiologia*, 583(1), 231-240.
- Roset, J., Aguayo, S., & Muñoz, M. J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol*, 18, 65-71.
- Runnegar, M., Berndt, N., & Kaplowitz, N. (1995). Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and applied pharmacology*, 134(2), 264-272.
- Salomon, P. S., Yunes, J. S., & Parise, M. (1996). Toxicidade de um extrato de *Microcystis aeruginosa* da lagoa dos patos sobre camundongos e suas alterações sobre o tecido hepático. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 313-321.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2008). Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology*, 10 (10), 2476-2483.
- Sharkey, F. H., Banat, I. M., & Marchant, R. (2004). A rapid and effective method of extracting fully intact RNA from *thermophilic geobacilli* that is suitable for gene expression analysis. *Extremophiles*, 8(1), 73-77.
- Sivonen, K., & Börner, T. (2008). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*, 159-197.
- Sivonen, K.; Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxin. In: Chorus, I.; Bartram, J. (Ed.). Toxic cyanobacterial in water. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. London: Spoon. chap. 3, p. 41-111.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B. A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*, 7: 753-764.
- Tonk, L., Visser, P. M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E. O., Wiedner, C., ... & Huisman, J. (2005). The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5177-5181.
- Tonk, L., Welker, M., Huisman, J., & Visser, P. M. (2009). Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. *Harmful Algae*, 8(2), 219-224.

Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., & Sivonen, K. (2002). Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial ecology*, 43(4), 443-454.

Welker, M., & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 530-563.

WHO, G. (2006). Guidelines for drinking water quality. *WHO: World Health Organization*.

Yoshida, T., Takashima, Y., Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., Hiroishi, S., & Nagasaki, K. (2006). Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1239-1247.

Yu, S. Z. (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 10(6), 674-682.

Zilliges, Y., Kehr, J. C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., ... & Dittmann, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS One*, 6(3), e17615.

## CAPÍTULO 1:

Response of *ntcA* and *mcyD* genes to nutrient stress conditions in toxic cyanobacteria strains



## Resumo

Microcistina é a cianotoxina mais bem estudada, mas com papel celular interno ainda muito discutido. Estudos focando a regulação gênica desta molécula podem contribuir para uma melhor compreensão de sua função celular. No presente estudo PCR quantitativa (RT-PCR) foi utilizada para verificar a resposta de transcrição gênica do gene *mcyD* à limitação por nitrogênio (nitrato e amônia) e fosforo. A existência de uma correlação direta entre transcritos *mcyD* e *ntcA* foi investigada e confirmada em duas cepas de *Microcystis*. NtcA vem sendo descrito como um componente no controle da biossíntese de microcistina. Essa pesquisa mostrou que agentes estressantes ligadas a limitação de nutrientes levaram a um aumento significativo da produção de microcistina em ambas as cepas estudadas. A similaridade da resposta observada para o gene *mcyD* sob limitação de nitrato, amônio e fósforo sugerem que essa resposta pode estar ligada ao estresse oxidativo.

## Abstract

Microcystin is one of the most common cyanotoxins which internal cellular role is still under investigation. Studies focusing on the gene regulation of this molecule can contribute to the understanding of its putative cellular function. In this study, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was used to examine the transcriptional response of the *mcyD* gene to nitrogen (nitrate and ammonium) and phosphorus limitation. The existence of a direct correlation between transcripts of *mcyD* and *ntcA* genes was investigated and confirmed on two *Microcystis* strains. NtcA has already been described as a component in the control of microcystin biosynthesis. This research showed that stress agents linked to nutrients deprivation could lead to a significant increase of microcystin production in both strains studied. The trend similarity of *mcyD* response observed under nitrate, ammonium and phosphorus limitation, suggests that this response can be linked to oxidative stress.

## 1.0 Introduction

Bloom-forming cyanobacteria occur worldwide and produce toxins that may be harmful to humans and animals (Chorus 2001). Investigations about the role and function of microcystin are underway, and the true nature of this toxin has not yet been discovered. In general, the functions of secondary metabolites are unknown (Dakshini et al. 1994), but it seems that these compounds can increase the ability to compete in the environment (Repka et al. 2004). Some hypotheses suggested the microcystin role as iron chelator (siderophores) (Utkilen et al, 1995; Orr et. al, 1998), defense mechanism (Rohrlack et al, 1999), photosynthesis or other light related processes (Young et al 2005), intercellular intraspecies communication (Schatz et al 2007), and quorum-sensing (Dittmann, et al., 2001), Its was also indicated that microcystin production is simply linked to cell division rate (Orr and Jones 1998). According to Ginn et al. (2009), because of differences in culturing techniques, growth conditions, as well as experimental design and analyses, no consensus has been reached regarding the function of microcystin as results are not always comparable.

Many studies have also tried to show the influence of environmental factors on microcystin production (Sivonen et al. 1990; Lukac and Aegerter 1993; Song et al. 1998). However, many controversial data were generated, using direct measurements of intracellular or extracellular toxins. With the finding that microcystin was not produced by ribosomes and the existence of a specific gene set, called *mcy*, present only in organisms producing this toxin (Tillet et al. 2000), there was a significant increase in the study on the regulation of this

molecule, contributing to the understanding of ecological questions concerning its production (Vezie et al. 2002; Rantala, et al. 2006; Yoshida et al. 2007).

Lately more studies started focusing on the regulation of the *mcy* genes and microcystin production. One of the first reports indicated that limiting amount of light could affect the transcription of these genes (Kaebernick et al 2000). More recently, Alexova et al. (2011) demonstrated the increase of microcystin synthesis, but not of the toxic gene transcription, in cells exposed to severe limitation of iron. Another work on iron deficiency indicated that both the transcription of the *mcy* gene and the synthesis of microcystin increased (Sevilla et al. 2008). For nitrogen, Sevilla et al (2010) found no effect of nitrate reduction in the production of microcystin. In contrast, other studies showed that the *mcy* operon has binding sites for the universal regulator of nitrogen (*ntcA*) and that nitrogen limitation could alter the production of microcystin (Ginn et al. 2010; Kuniyoshi et al 2011).

Nitrogen and phosphorus are essential macronutrients and the changes in concentration observed in the environment have several physiological effects on primary producers. Phosphorus (P) is important in the cellular synthesis of nucleic acids and membrane phospholipids, as well as for energy transfer through tri- and bi-phosphorylated nucleotides (Degerholm et al., 2006). In aquatic environments, dissolved inorganic P is biologically available as orthophosphate (Shan et al., 1994). Nitrogen metabolism is greatly influenced by the environment, and its assimilation is ruled by the available nitrogen source (Luche and Forchhammer, 2008). Ammonium is the preferred nitrogen form for cyanobacteria (Flores and Herrero, 2004). Expression of the nitrogen regulator

gene (*ntcA*) is negatively controlled by ammonium (Lindell and Post 2001). In cyanobacteria this regulation is linked to the cell ability to evaluate the available nitrogen sources (Luque and Forchhammer, 2008). With the discovery of *ntcA* binding sites in *mcy* promoter region (Ginn et al., 2010), it was suggested that this regulator could be related to microcystin regulation response under changing environmental conditions.

Studies on nutrient limitation can improve the understanding of the mechanism of toxins production and therefore help evaluating the importance of cyanotoxins for cyanobacteria. In addition, they can be an important tool in support to the environmental control of these organisms. The aim of this study was to measure changes in *mcyD* gene transcription in response to nitrogen and phosphorus limitation. At the same time, we wanted to test the hypothesis of the existence of a potential correlation between *mcyD* and *ntcA* transcripts. The 16S gene was used as reference (endogenous control) and *cpcB* as control (behavior known expression). This research can contribute adding new information that will help elucidating some conflicting results in the literature and understanding the ecological importance of microcystins for cyanobacterial cell metabolism.

## **2.0 Experimental Procedures**

### **2.1 Growth conditions and experimental design**

Two *Microcystis aeruginosa* strains (strains 19 and 26) were provided by the Phycology Laboratory of the Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil). For these experiments cells were grown in a WC medium

(Guillard & Lorenzen, 1972), in batch conditions, at 24°C temperature, 40  $\mu\text{mol}$  of photons  $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , and 12 hs light: 12 hs dark photoperiod.

For the nitrogen-limited experiments, strains were grown under high nitrogen supply (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{N-NO}_3^-$  or 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{N-NH}_4^+$ : original N concentration in WC medium) and two nitrogen-limited conditions: 0.1 and 0.01  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{N-NO}_3^-$  or 0.02 and 0.002  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{N-NH}_4^+$  (WC medium, 1/10 and 1/100 dilution). Similar procedure was performed for the phosphorous experiments. The original concentration was 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{P-PO}_4^-$  and limitation was 35  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and 3.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (1/10 and 1/100 of the original concentration).

Strains were inoculated at the three different nutrient levels and let grow for seven days, for acclimatization. After that, the experiment started and samples were collected on the sixth day of growth (exponential phase). Twenty millilitres of each aliquot of the culture samples were harvested in glass membrane filters (GF/F) and frozen (-80°C) until the analysis. During the experiments, small aliquots of cultures were removed every two days to estimate the growth rate. Cell counting was carried out in a Neubauer haemocytometer. The experiments were done in triplicate (three subcultures under the same conditions) and repeated at least for two times.

## **2.2 Chlorophyll a and microcystin levels determination**

Chlorophyll a was extracted and measured according to Nush (1980) using hot ethanol and the spectrophotometric quantification was done at 665nm wavelength. The results obtained were compared with *cpcB* gene expression quantification (see below).

The microcystin extraction was performed with methanol 75% (v/v). Analyses were performed with a kit (Abraxis, ADDA Elisa) according to the manufacturer's instructions. Plates were read on a microtiter plate ELISA reader (Bio-Tek, Elx 800) at 450 nm within 15 minutes after addition of the stop solution. The results were compared with *mcyD* gene expression quantification (see below).

### **2.3 mRNA isolation and RT qPCR**

RNA was extracted after cell lysis with TES (25% w/v saccharose, 100mM EDTA and 50mM Tris-HCl, pH 8.0). Samples were left 2 hours at 4°C, then, after addition of lysozyme (5mg/mL), 1 hour at 37°C and after addition of proteinase K (100µg/mL), 1 hour at 60°C, finally Trizol (Invitrogen) was added according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was resuspended in 50 µl of DEPC-H<sub>2</sub>O and RNA was treated with 1 U/µg of Dnase (Promega) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped with addition of stop solution e by heating 10 min at 65°C. Removal of DNA traces was confirmed by PCR. RNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

About 500ng of RNA were used for reverse transcription (RT-PCR). cDNA was generated using a High Capacity Kit (Applied Biosystems), with RT random primers. Concentrations and PCR cycling conditions were established according to the manufacturer's recommendations.

Real time PCR (qPCR) was performed using a StepOne™ System (Applied Biosystems) with 1 µl of cDNA sample, 0.3 µl of each primer (10pmol/µL), 5 µl

of Power SYBR Green I (Applied Biosystems) and sterile milli-Q water for an end volume of 10  $\mu$ l. The reactions were done in duplicate (sometimes in triplicate) and specifications for the PCR cycle followed the manufacturer's guidelines. Primers were designed with help of "Primer-BLAST" tools (NCBI) to amplify 141 bp products for *ntcA* (global nitrogen regulator gene), 73pb products for *cpcB* (phycocyanin gene) and 103pb products for *mcyD* (microcystin synthetase *D*). The primer described by Sevilla et al. (2008) for the 16S RNA polymerase was used as housekeeping gene. The primer amplification efficiencies for *ntcA*, *cpcB*, *mcyD*, and 16S were calculated, and they yielded E values of 1.93, 2.11, 1.95 and 1.97, respectively, where an E value of 2 indicates 100% PCR efficiency. Relative quantification of the *ntcA*, *cpcB* and *mcyD* target genes was compared with the 16S reference gene, which yielded a fold change in transcription compared to the results for the control conditions (excess nitrogen), according Pfaffl (2001).  $\Delta$ CT (delta CT = CT target gene – CT housekeeping gene) values were used for correlation analyses between *mcyD* and *ntcA* genes.

The analysis of the fluorescent melting curve was performed to determine the amplification melting temperature of the single PCR products in the samples, by gradually increasing the temperature from 70°C to 95°C at 0.1°C.s<sup>-1</sup> rate. Fluorescence intensity data were collected continuously and were converted to melting peaks using the LightCycler software (StepOne™ Software, version 2.0).

## 2.4 Statistical analyses

Statistical analyses were performed by general linear model (GLM model) using R software to verify differences between treatments (contrast analysis) and significance levels of the difference. Significant difference was accepted when  $p < 0.05$ .

## 3.0 Results

The treatment with the highest nutrient concentration was always used as a reference for the quantification of the gene expression of the treatments with fewer nutrients.

The *mcyD* gene expression showed changes in all extreme limiting conditions. Under nitrate limitation experiment (fig.1), strain 19 has a significant increase in expression level ( $p < 0.001$ ) in both limited conditions, but strain 26 only in extreme condition ( $p < 0.001$ ), when nutrient was reduced 100 times from the original concentration. In the ammonium limitation experiment (fig.2), increase of *mcyD* gene was observed only at the lowest nutrient level, for both strains (19  $p = 0.020$  and 26  $p < 0.001$ ). For phosphate limitation (fig.3), both strains had a similar response, with significant higher expression in both limited concentrations ( $p < 0.010$ ).

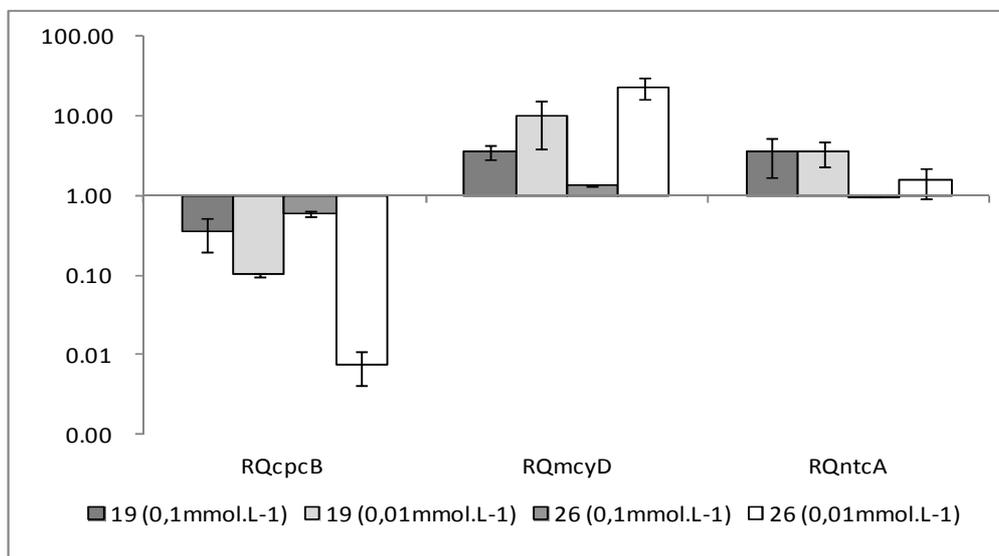
The response of the *ntcA* gene showed a significant increase in its expression ( $p < 0.001$ ) in all experiments under limitation (fig. 1 and 2), but, individual differences were observed. For nitrate, only strain 26 responded in extreme limitation.

The analysis of the expression of the *cpcB* gene revealed a significant decrease in the level of transcripts in all experiments ( $p < 0.001$ ) (fig. 1, 2 and 3). However,

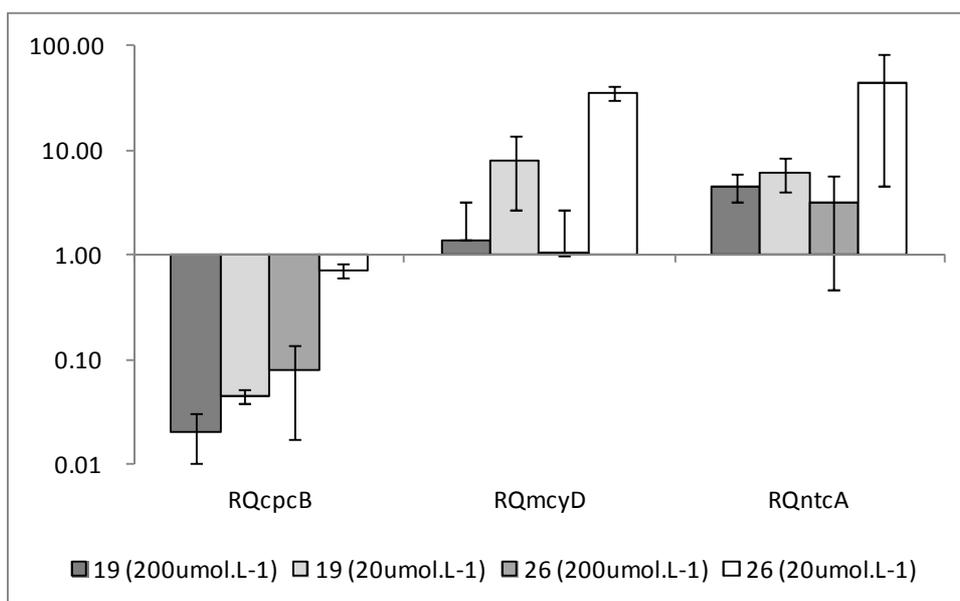
the decrease observed in strain 26 in the phosphorus experiment was significant only for the 3.5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  P-PO<sub>4</sub> concentration.

For the correlation analysis between  $\Delta\text{CT}mcyD$  and  $\Delta\text{CT}ntcA$  (fig. 4), all measured values were pooled together (all replicates and repetitions of all experiments), in order to increase the significance of the correlation. The existence of correlation between these two variables was confirmed for all experiments under nitrate (fig. 4A), ammonia (fig. 4B) and phosphorus limitation (fig 4C).

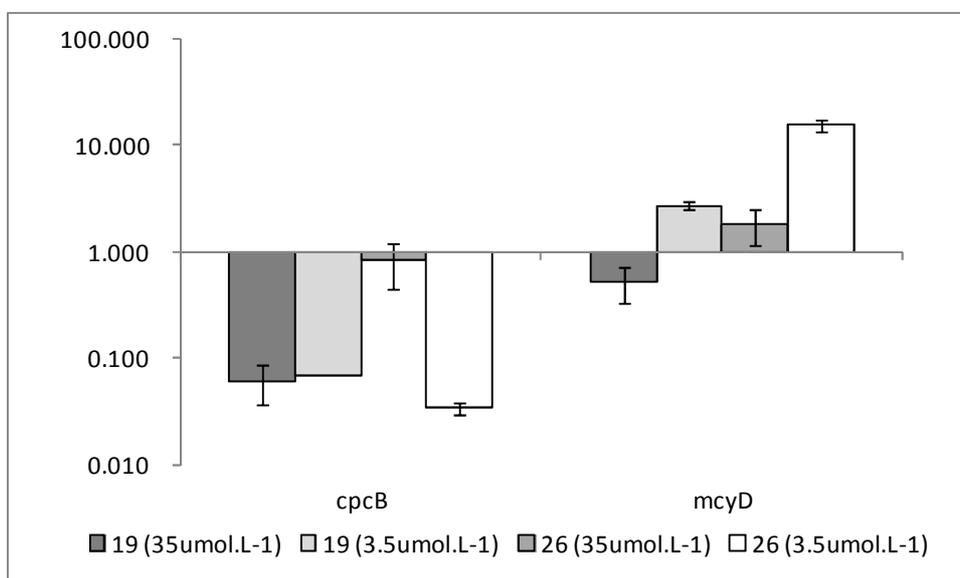
Chlorophyll *a* concentration and cell number decreased as the amount of nitrogen supplied to the medium was reduced ( $p < 0.001$ ). However, we observed a clear and opposite trend for microcystin content per cell (Table 2). For example, at lower nitrate concentration a significantly higher concentration of microcystin was measured ( $p < 0.001$ ).



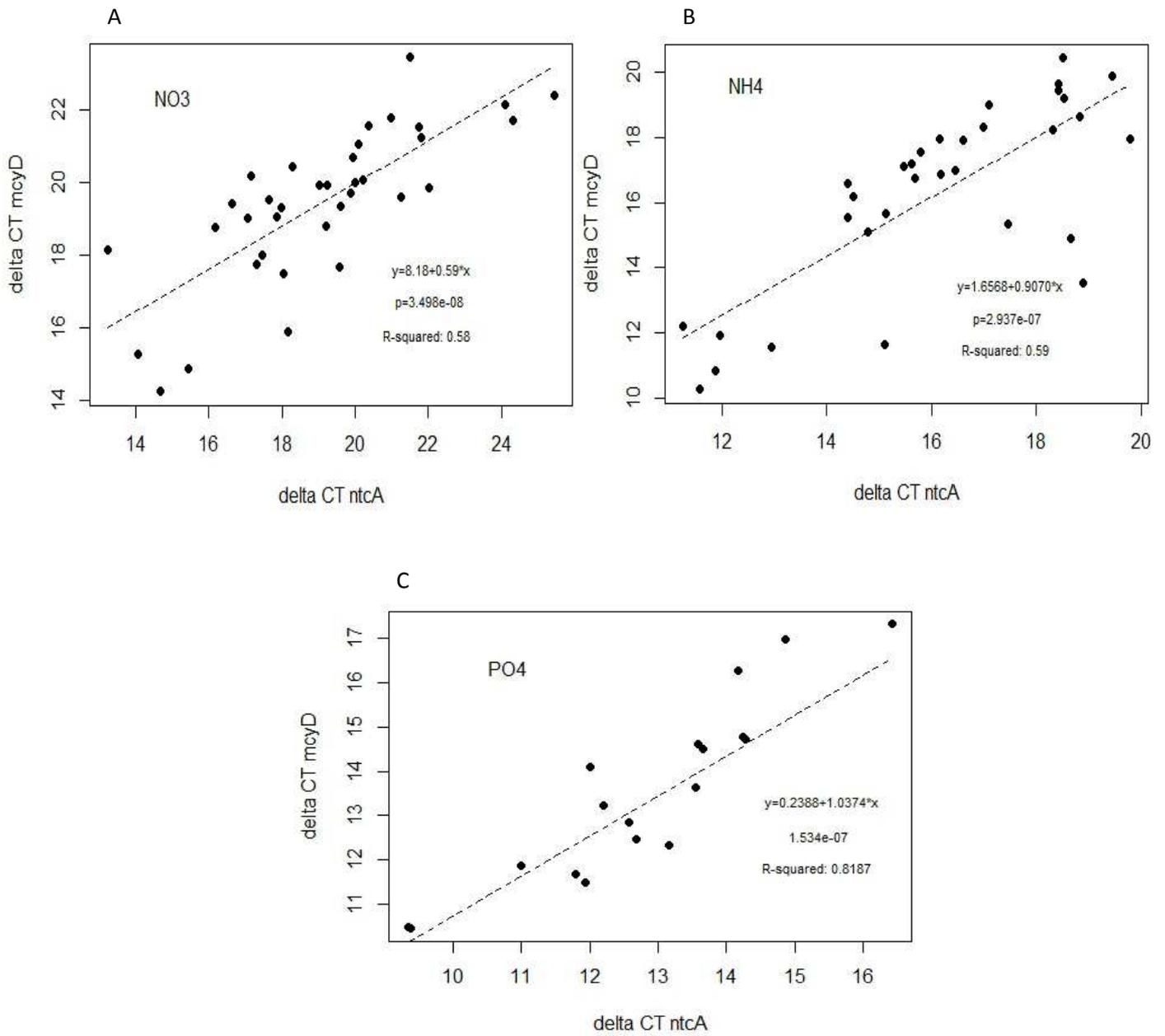
**Figure 1** – Relative Quantification of *cpcB*, *mcyD* and *ntcA* genes in the nitrate assay. The 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  values were used like standard for estimate gene expression in limited conditions. Bars indicate standard deviation and the single or double symbol \* represents a statistically significant difference of  $p < 0.05$  when compared to the control and among themselves.



**Figure 2** – Relative Quantification of *cpcB*, *mcyD* and *ntcA* genes in the ammonium assay. The  $0.2 \text{ mmol.L}^{-1}$  values were used like standard for estimate gene expression in limited conditions. Bars indicate standard deviation and the single or double symbol \* represents a statistically significant difference of  $p < 0.05$  when compared to the control and among themselves.



**Figure 3** – Relative Quantification of *cpcB* and *mcyD* genes in the phosphate assay. The  $350 \text{ μmol.L}^{-1}$  values were used like standard for estimate gene expression in limited conditions. Bars indicate standard deviation and the single or double symbol \* represents a statistically significant difference of  $p < 0.05$  when compared to the control and among themselves.



**Figure 4** – Regression analyses between  $\Delta$ CT of *mcyD* e *ntcA* genes for all experimental data obtained from the nitrate (A) ammonium (B) and phosphorous (C) experiments.

**Table 1:** Sequences of the primers used in this study for the phycocyanin region (*cpcB*), the housekeeping gene (16S rRNA), the nitrogen regulator (*ntcA*) and microcystin (*mcyD*).

<b>Primer</b>	<b>Type*</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>	<b>Reference</b>
<b>q-mcyD</b>	F	GCATCTTCTAAAGAAAAGACTCC	Pimentel & Giani, 2013
<b>q-mcyD</b>	R	TATTCCCAAGATTGCCATAATTT	Pimentel & Giani, 2013
<b>QcpcB</b>	F	GGTATCACCCCGGCGATTG	This study
<b>QcpcB</b>	R	GCAGCAGCAGCGCGATCGAAGTA	This study
<b>QntcA</b>	F	TGCAGGGTTTGTCCCTCGCGG	This study
<b>QntcA</b>	R	CCCGGATGCCATCGGTGGTG	This study
<b>16S-rRNA</b>	F	TGCGTAGAGATTGGGAAGAACATC	Sevilla et al. 2008
<b>16S-rRNA</b>	R	GCTTTCGTCCCTGAGTGTC	Sevilla et al. 2008

**Table 2** – Chlorophyll *a*, microcystin and cell density for each nutrient concentration in the nitrate and phosphate experiments.

Samples	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	MIC ( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )	cel $\text{mL}^{-1}$
19 (0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrate)	6.47 $\pm$ 2.65	0.047 $\pm$ 0.05	1.14E+05 $\pm$ 1.02E+05
19 (0.10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrate)	69.42 $\pm$ 9.30	0.015 $\pm$ 0.00	5.27E+05 $\pm$ 6.56E+04
19 (1.00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrate)	504.84 $\pm$ 18.77	0.003 $\pm$ 0.00	3.36E+06 $\pm$ 3.91E+05
26 (0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrate)	3.90 $\pm$ 9.30	0.073 $\pm$ 0.00	9.79E+04 $\pm$ 1.91E+04
26 (0.10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrate)	96.44 $\pm$ 18.77	0.012 $\pm$ 0.00	1.36E+06 $\pm$ 3.28E+05
26 (1.00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrate)	442.86 $\pm$ 24.46	0.017 $\pm$ 0.01	3.69E+06 $\pm$ 8.01E+05
19 (3.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate)	6.09 $\pm$ 6.86	0.010 $\pm$ 0.00	7.47E+05 $\pm$ 1.63E+05
19 (34.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate)	307.35 $\pm$ 50.67	0.008 $\pm$ 0.01	1.37E+06 $\pm$ 5.52E+05
19 (340.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate)	620.75 $\pm$ 49.80	0.005 $\pm$ 0.00	2.36E+06 $\pm$ 3.44E+05
26 (3.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate)	16.02 $\pm$ 5.68	0.048 $\pm$ 0.01	3.60E+05 $\pm$ 7.55E+04
26 (34.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate)	187.35 $\pm$ 26.17	0.007 $\pm$ 0.01	1.98E+06 $\pm$ 1.78E+05
26 (340.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate)	235.22 $\pm$ 8.85	0.013 $\pm$ 0.00	2.67E+06 $\pm$ 6.87E+05

## 4.0 Discussion

Typically, nitrogen starvation induces a general stress response in the cell like chlorosis, increased uptake of alternative nitrogen sources and, once these reach complete depletion, onset of a dormant state (Schwarz and Forchhammer, 2005). In our experiments, we detected the decrease of *cpcB* gene expression (phycocyanin), of chlorophyll *a* concentration and growth rate, and we observed a loss of the culture pigmentation. Chlorosis can induce cells to acquire nitrogen via degradation of the phycobiliproteins, which normally represent a large part of the protein pool in the cells (Anderson, et al., 2006) and may comprise up to 60% of total cellular protein in cyanobacteria (Sawaki, et al 1998). In addition, during nutrient starvation, ROS (reactive oxygen species) can be formed, due to the existence of several cross-regulatory reactions between photosynthesis, redox-control and nutrient acquisition, establishing a tight control over the C:N balance in the cell (Schwarz and Forchhammer, 2005). Furthermore, according to Dagnino et al (2006), the loss of pigmentation by discoloration that we observed in limiting nutrient conditions is an important sign of occurrence of oxidative stress. Thus, this loss of pigmentation suggest that under nutrient limitation the cultures experienced oxidative stress, although not direct measured of oxidative stress was done in this study.

In the present study, we found that stress conditions affected *mcyD* transcription and microcystin production. In a recent study, higher values of microcystin and nodularin cellular content were observed in cells growing under limiting conditions of phosphate and low light (Kurmayer 2011A). Ginn and collaborators (2010) also observed a reduction in the transcription of the *mcy*

gene in conditions of nitrate starvation. However, Sevilla and colleagues (2010) showed that while a decrease of nitrate caused lower cell growth, it did not directly affect *mcy* transcription or toxin production. Nevertheless the lowest nitrate concentration used by these authors (0.2 mM) was not very limiting and this is probably the reason of the difference in their results. For example, we used concentrations about ten times lower than they used in their work (0,001mmol.L<sup>-1</sup>) and Ginn et al (2010) who found results similar to ours used a entirely N depleted medium (no nitrate addition). Neilan et al (2013) suggested that these contradictory results are common mainly because investigations on regulatory mechanisms of toxin production have not been standardized, experimental designs and growth controls are frequently different, and therefore microcystin regulation is still somewhat controversial.

An interesting result in the present work was the significant correlation observed between the *mcyD* and *ntcA* genes. NtcA activates nitrogen responsive genes and therefore is a good marker in studies on nitrogen deprivation (Lindell and Post, 2001). The autoregulated *ntcA* gene is transcribed at a basal level in the presence of ammonium, and increases in conditions of nitrogen stress (Ginn et al 2010). Recently, Rachid et al (2009) showed that *ntcA* transcription also occurred in ammonium-rich environments. This would suggest a novel function for NtcA group members beyond the nitrogen-responsive regulation of natural product biosynthesis.

In the last years, there was a progress in the understanding of the biological role of microcystin and several studies pointed to a potential intracellular function of this compound. For example, studies done with *mcy* mutants

showed differences in pigmentation (Hesse et al 2001) and toxic and non-toxic strains altered their response to low inorganic carbon concentrations since limited ability of the mutant to adapt to low-C conditions (Jahnichen et al 2007). As previously mentioned, we found that nutrient stress affected *mcyD* transcription and it was directly correlated with *nctA* gene expression. This correlation could be a strong indication of an intracellular function of microcystin. Recently Ginn et al (2010) have identified regions with similarity to the consensus motifs bound by NtcA in the internal *mcyA/D* promoter region in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Similar researches also showed that NtcA binds to the *mcyA* upstream region in the presence of oxoglutarate (2-OG) Kuniyoshi et al (2011) and that NtcA activity could be also dependent on the C to N ratio within the cell (Luque et al 2008). Oxoglutarate is a key indicator of the carbon/nitrogen balance in the cell, suggesting that microcystin synthesis responds to the equilibrium between both metabolisms (Herrero and Flores 2008). Considering the fact that *ntcA* expression is influenced by the cell redox state and NtcA can bind in the *mcy* promoter region, Neilan et al (2013) suggested that microcystin may have a global role in carbon-nitrogen metabolism and in redox control and perception of redox changes.

Changes in the cell redox state are processes that can be intimately linked to the generation of reactive oxygen species and oxidative stress in cyanobacteria (Alexova 2010). Therefore, we believe that the increase of microcystin observed in our experiments could be linked to oxidative stress caused by severe nutrient limitation. Schatz et al (2007) applied H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a culture in logarithmic growth phase inducing *mcyB* accumulation. Other report showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulated

the transcription of the *mcyA* gene and increased the activity of microcystin peptide synthetase (Qian et al 2010). A recent study found that microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions (Zelliges et al 2011). These studies revealed a specific and covalent interaction of microcystin with a subset of proteins resulting in their altered accumulation under different light or oxidative stress conditions. This suggests a protein-modulating role for microcystin within the producing cell, which represents a new addition to the catalogue of functions that have been discussed for microbial secondary metabolites.

In summary, the increase of *mcy* transcription and microcystin production under stress conditions reported here for N and P and in the literature (nitrogen, iron, light, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the binding of microcystin to redox-sensitive proteins and increased sensitivity of microcystin-deficient mutants under oxidative stress conditions (Zilliges et al 2011), may indicate an intracellular function of microcystin related to oxidative stress. Thus, we assume that in our experiments microcystin production may have increased as a form of cell protection against oxidative stress. Further studies targeting on oxidative stress and microcystin can bring new information for a better understanding about the role of microcystin in cyanobacteria cells and may help indicating new approaches for monitoring and preventions of human intoxications by contaminated water.

## Acknowledgments

We thank Dr. Alvaro C. Nunes for assistance in RNA procedures. This work was supported by a scholarship to J.S.M.P. from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and by funds provided by CEMIG (Companhia Energética de Minas Gerais S.A.), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerias) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) to A.G.

## 5.0 References

Alexova, Ralitzia Dimitrova, The regulation of toxin synthesis in *microcystis aeruginosa* (2010). Biotechnology & Biomolecular Sciences, Faculty of Science, UNSW. Thesis.

Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B. C., and Neilan, B. A. (2011) Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ Microbiol* 13:1064-1077.

Anderson, D. C., Campbell, E. L., and Meeks, J. C. (2006) A Soluble 3D LC/MS/MS Proteome of the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *J. Proteome Res* 5: 3096-3104.

Azevedo, S. M. F. O. (1997) Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. *J. Venom. Anim. Toxins* 3: 93.

Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., and Dittmann, E. (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol* 185: 564-572.

Chorus, I. (2001) Cyanotoxin occurrence in freshwaters – a summary of survey results from different countries. In *Cyanotoxins - occurrence, causes, consequences*. Chorus, I. (ed.). Springer Berlin Heidelberg. pp. 75-82.

Dagnino, D., Meireles, A. D., and Almeida, A, J. C. (2006) Growth of nutrient-replete *Microcystis* PCC 7806 cultures is inhibited by an extracellular signal produced by chlorotic cultures. *Environ Microbiol* 8:30-36.

Dakshini, I. and Dakshini, K. M. M.. (1994) Algal allelopathy. *Bot. Rev.* 60:182–196.

Degerholm, J., Gundersen, K., Bergman, B., and Söderbäck, E. (2006) Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microb Ecol* 58: 323-332.

Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B. A., Von Döhren, H., and Börner, T. (2001) Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*, 147: 3113-3119.

Flores, E., & Herrero, A. (2004) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In *The molecular biology of cyanobacteria* Springer Netherlands. (pp. 487-517).

Flores, E., and Herrero, A. (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 164-167.

Giani, A., Bird, D. F., Prairie, Y. T., and Lawrence, J. F. (2005) Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 62: 2100-2109.

Ginn, H.P., and Neilan, B.A. (2010) NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Appl Environ Microbiol* (in press): doi: 10.1128/AEM.01862-09.

Guillard, R. R. L. and Lorenzen, C. J. (1972) Yellow-green algae with chlorophyllidae C<sup>1,2</sup>. *J. Phycol* 8: 10-14.

Herrero, A. and Flores, E. (2008) *The cyanobacteria: Molecular Biology, Genetics and Evolution*, Caister Academic Press.

Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., and Flores, E. (2001) Nitrogen Control in Cyanobacteria. *J Bacteriol* 183:411-425.

Hesse, k., and j.-g. Kohl. (2001) Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*, In *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*, I. Chorus (ed.), Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. pp. 152-158.

Jahnichen, S., Ihle, T., Petzoldt, T., and Benndorf, J. (2007) Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* 73: 6994–7002.

Kaebernick, M., Neilan, B. A., Börner, T., and Dittmann, E. (2000) Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3387-3392.

Kuniyoshi, T. M., Gonzalez, A., Lopez-Gomollon, S., Valladares, A., Bes, M. T., Fillat, M. F., and Peleato, M. L. (2011) 2-oxoglutarate enhances NtcA binding

activity to promoter regions of the microcystin synthesis gene cluster. FEBS letters, 585: 3921-3926.

Lindell, D., and Post, A. F. (2001) Ecological Aspects of *ntcA* Gene Expression and Its Use as an Indicator of the Nitrogen Status of Marine *Synechococcus* spp. Appl. environ. Microbiol, 67: 3340-3349.

Luque, I., and Forchhammer, K. (2008) Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. In The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution, Herrero, A. and Flores, E. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 335-382.

Lukač, M., and Aegerter, R. (1993) Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon, 31:, 293-305.

Lyck, S. (2004) Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. J. Plankton Res 26: 727-736.

Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., and Peleato, M. L. (2006) Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. Phytochemistry, 67: 876-881.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. EnvironMicrobiol.15:1239-1253.

Oh, H. M., Lee, S. J., Jang, M. H., and Yoon, B. D. (2000) Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. Appl Environ Microbiol 66: 176-179.

Orr, P. T., and Jones, G. J. (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. Limnol Oceanogr, 43: 1604-1614.

Pimentel, J. S., and Giani, A. (2013) Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. J Appl Phycol DOI: 10.1007/s10811-013-9996-4.

Qian, H., Yu, S., Sun, Z., Xie, X., Liu, W., & Fu, Z. (2010) Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. Aquat Toxicol 99: 405-412.

Rachid, S., Gerth, K., and Müller, R. (2009). NtcA—A negative regulator of secondary metabolite biosynthesis in *Sorangium cellulosum*. Journal of biotechnology, 140: 135-142.

- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., and Sivonen, K. (2006) Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl Environ Microbiol* 72: 6101-6110.
- Repka, S., Koivula, M., Harjunpää, V., Rouhiainen, L., and Sivonen, K. (2004) Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaeno peptilide mutant. *Appl Environ Microbiol* 70: 4551-4560.
- Rohrlack T., Christoffersen K., Hansen P.E., Zhang W., Czarnecki O., Henning M., Fastner J., Erhard M., Neilan B. A. and Kaebernick M. (2003) Isolation, characterization, and quantitative analysis of Microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *J. Chem. Ecol.* 29: 1757-70.
- Ross, C., Santiago-Vázquez, L., and Paul, V. (2006) Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Toxicol*, 78: 66-73.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., and Kaplan, A. (2007) Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ Microbiol*, 9: 965-970.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Peleato, M. L., and Fillat, M. F. (2010) Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*, 19: 1167-1173.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2012). An active photosynthetic electron transfer chain required for *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* 21: 811-819.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Fillat, M. F., and Peleato, M. L. (2008) Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ Microbiol* 10: 2476-2483.
- Shan, Y., McKelvie, I.D. and Hart, B.T. (1994) Determination of alkaline phosphatase-hydrolyzable phosphorus in natural water systems by enzymatic flow injection. *Limnol Oceanogr* 39: 1993–2000.
- Schwarz, R., and Forchhammer, K. (2005) Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology*, 151: 2503-2514.

Sivonen, K., Niemelä, S. I., Niemi, R. M., Lepistö, L., Luoma, T. H., and Räsänen, L. A. (1990) Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia*, 190: 267-275.

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

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B. A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. HYPERLINK "<http://biomednet.com/gateways/cmb>" *ChemBiol*, 7: 753-764.

Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., and Sivonen, K. (2002) Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb Ecol* 43: 443-454.

Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N. and Hiroishi, S. (2007) Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Lett* 266:49-53.

Zilliges, Y., Kehr, J. C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., and Dittmann, E. (2011) The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS One*, 6: e17615.

Whitton, B. A. (Ed.). (2012). *Ecology Of Cyanobacteria II: Their Diversity In Space And Time*. Springer.

## CAPÍTULO 2:

**Respostas às mudanças ambientais em populações de  
cianobactérias de dois reservatórios, medidas a partir  
da expressão de genes ligados ao estresse**



## Resumo

Cianobactérias possuem uma alta capacidade de adaptação fisiológica ao estresse, que ocorre a partir de mudanças rápidas no ambiente. Essas mudanças causam induções de genes específicos, requisitados para o processo de aclimatação ou proteção das células contra condições desfavoráveis. O objetivo deste trabalho foi medir a expressão de genes ligados a estresse causado por nitrogênio, fósforo, ferro e estresse oxidativo, em mudanças sazonais de dois ambientes aquáticos distintos. Além disso, foi meta deste estudo mensurar a expressão gênica de cianopeptídeos e verificar se estes compostos podem estar ligados ao processo de aclimatação das células. Para tanto, foram realizados oito coletas no reservatório da Pampulha e quatro coletas em três diferentes pontos, no reservatório de Volta Grande. Parâmetros abióticos e bióticos foram medidos e correlacionados com os dados de expressão gênica. Apesar dos diferentes graus de trofia destes ambientes, os resultados foram parecidos em ambos, sendo variações de temperatura e nutrientes os principais fatores ligados ao estresse. No entanto, nitrogênio foi mais importante no ambiente oligotrófico e fósforo no ambiente hipereutrofico. Também, observamos que o peptídeo cianopeptolina respondeu de forma parecida aos genes de estresse, indicando uma possível função deste peptídeo no processo de aclimatação da célula. Os métodos moleculares utilizados aqui foram muito sensíveis para detectar as variações destes organismos ao estresse causado por modificações do ambiente. A utilização destes métodos em estudos no ambiente pode ajudar a um melhor entendimento do sucesso das cianobactérias e auxiliar em procedimentos de controle ambiental e sua recuperação.

## **Abstract**

Cyanobacteria have a high physiological capacity to adapt to stress, triggered by rapid changes that occur in the environment. These changes cause inductions of specific genes required for acclimatization or for cell protection to unfavorable conditions. The aim of this study was to measure the expression of genes linked to nitrogen, phosphorus, iron and oxidative stress, following the natural seasonal variation in two different aquatic environments. An additional goal was to measure the gene expression of some cyanopeptides and check whether these compounds may be linked to the process of cell acclimation. Therefore, eight samples were collected in Pampulha reservoir and four, at three different stations, in Volta Grande Reservoir. Biotic and abiotic parameters were measured and correlated with gene expression data. Despite the varying degrees in trophic status in these environments, the results were similar in both: temperature and nutrients variations were the main factors related to stress. However, nitrogen was more important in the oligotrophic and phosphorus in the hypereutrophic environment. We also observed that cyanopeptolin responded similarly to the stress genes, indicating a possible role of this peptide in the cell acclimation process. The molecular methods used here were very sensitive to detect changes in these organisms against the stress caused by environmental modifications. The application of these methods in environmental studies may help understanding the success of cyanobacteria and assist procedures for environmental control and recovering.

## **1.0 Introdução**

Estudos ambientais devem considerar o ambiente aquático como sendo uma mistura complexa de reações entre os elementos bióticos e abióticos, controlados por elementos abióticos do meio e possivelmente por interações sinérgicas dos mesmos (Market e Geller 1994). Entretanto, atividades humanas mudam constantemente a composição química da água devido à descarga excessiva de nutrientes e minerais, contaminantes e substâncias tóxicas (Esteves 2001). Todos estes distúrbios podem representar uma importante fonte de estresse para os organismos aquáticos e dentre eles as cianobactérias, que serão alvo do presente estudo.

Cianobactérias ocupam grande variedade de nichos ecológicos, incluindo água doce, marinha e habitats terrestres, sobre uma ampla facha de zona climática. São capazes de formar grandes florações, conhecidas também como “bloom”, caracterizadas pelo intenso crescimento celular. Estas florações podem representar um momento crítico para as células, já que os nutrientes disponíveis podem tornar-se escassos (Ginn et al 2009) e para algumas células, como as do interior das grandes colônias de *Microcystis*, por exemplo, pode também faltar luz e oxigênio.

### **1.1 Estresse em cianobactérias**

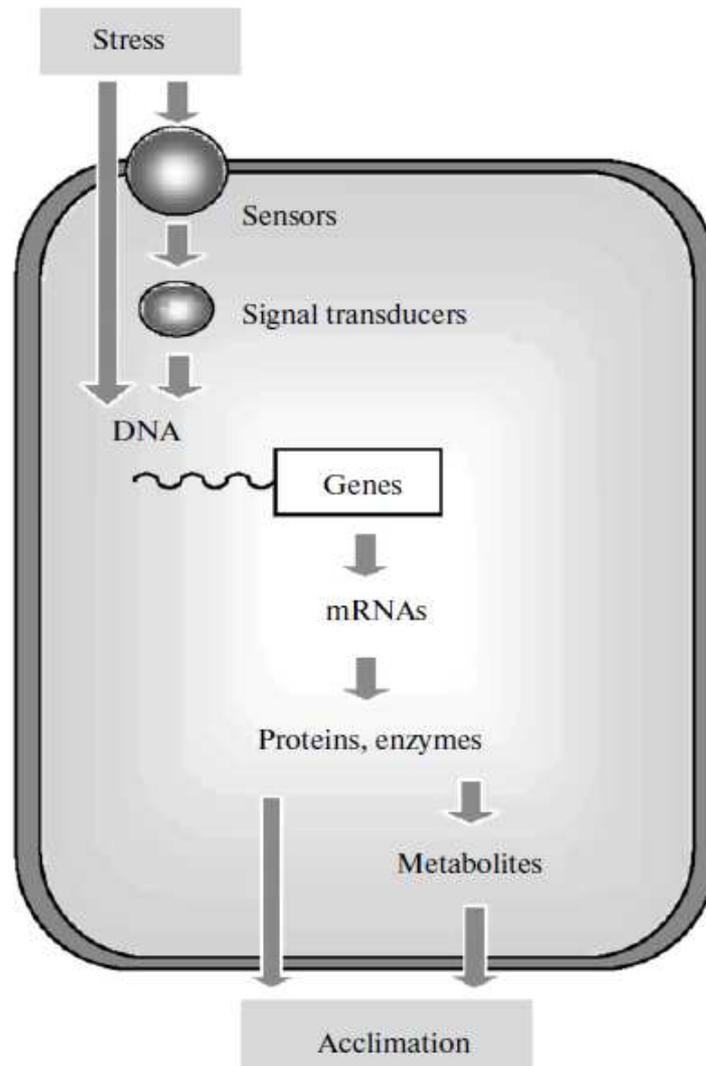
Cianobactérias possuem uma alta plasticidade fenotípica e continuamente são submetidas a condições estressantes, devido a alguma mudança extrema ou rápida no ambiente, através de flutuações sazonais e poluição (Neilan et al. 2012). Elas respondem ao estresse ambiental através de uma série de adaptações fisiológicas pré-determinadas, como modificações nos constituintes

da membrana celular, alteração de caminhos metabólicos, acúmulo de solutos compatíveis e indução de proteínas que respondem ao estresse (Zorina et al 2011). Em geral, uma mudança na transcrição e tradução de genes permite às cianobactérias mudarem seus processos metabólicos e melhorarem suas condições de crescimento e sobrevivência em condições dinâmicas (Ginn et al 2009).

Variações ambientais como temperatura, pH, salinidade, concentração de nutrientes e luz podem desencadear respostas de estresse celular a nível molecular (Fig 1). Mudanças perceptíveis no ambiente, especialmente exposição ao estresse, causam induções de genes específicos, requisitados para o processo de aclimatação ou proteção das células contra condições desfavoráveis. Essas modificações no meio podem primeiramente ser sentidas pela célula através de proteínas especializadas ou sensores, que mudam suas propriedades de acordo com a mudança. Sensores transferem o sinal para outros polipeptídios, os tradutores, que atuam na regulação de genes que respondem ao estresse. Proteínas tradutoras podem reconhecer regiões especiais do DNA diretamente, reagindo com elas e assim regulando sua transcrição. Finalmente, proteínas de proteção e/ou metabólitos são sintetizadas, ajudando o organismo na adaptação ao novo ambiente (Zorina et al 2011).

Alguns genes respondem a somente um tipo específico de estresse enquanto outros genes podem responder a vários (Zorina et al 2011). Em cianobactéria, existem alguns genes que são ativados a partir da percepção pela célula da limitação de algum fator abiótico fundamental. No presente trabalho, nós selecionamos alguns desses genes para estudar a dinâmica de expressão dos

mesmos em diferentes ambientes e condições ambientais. São eles: *pstS*, *ntcA*, *furC* e *perM*, que serão descritos a seguir.



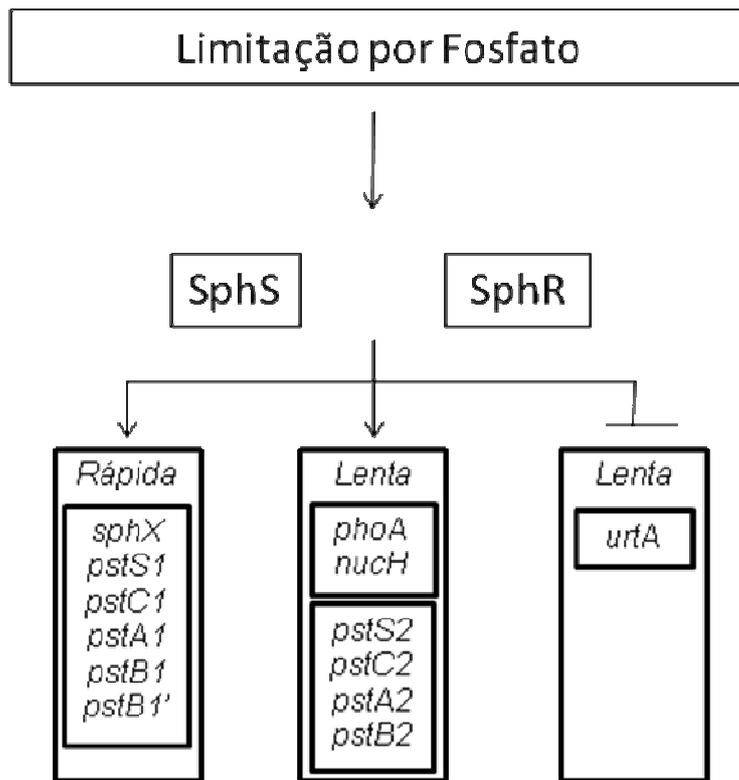
**Figura 1.** Esquema da percepção, tradução e aclimação das células às condições de estresse. Figura retirada de Zorina et al (2011).

### 1.1.1 Limitação por fósforo e o gene *pstS*

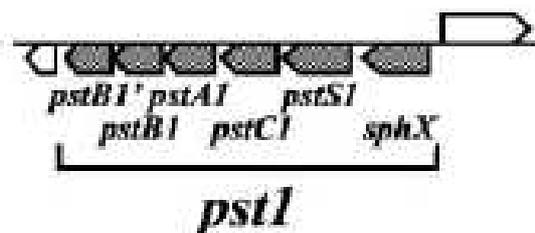
Fósforo (P) é importante na síntese celular de ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana, bem como para transferência de energia através de

nucleotídeos tri e bifosforilado (Degerholm et al., 2006). Em ambientes aquáticos, o fósforo inorgânico dissolvido está biologicamente disponível como ortofosfato (Shan et al., 1994). Entretanto, fosfato é um dos nutrientes com menor disponibilidade no ambiente e por isso, existem nas cianobactérias, mecanismos regulatórios para sua aquisição, estoque e metabolismo. Dentre estes mecanismos podemos destacar a expressão de genes relacionados a proteínas que participam da aquisição do fosfato e/ou aumento da sua disponibilidade sob condições de limitação do mesmo. A expressão gênica sob condições desta limitação já foi observada nas bactérias *E. coli* (Wanner 1996) e *Bacillus subtilis* (Hulett2002), nas cianobactérias *Synechocystis* (Hirani et al 2001), *Synechococcus* (Aiba et al 1994) e *Microcystis* (Harke et al 2012), além de fungos (Ogawa et al 2000) e plantas (Hammond et al 2003 e Wu et al 2003). O primeiro evento é a percepção da limitação e tradução do sinal.

Em um estudo com *Synechocystis* foi observado que 12 genes são regulados durante a limitação por fosfato (Suzuki et al 2004). Estes genes atuam como transportadores ou disponibilizadores de fosfato para a célula. Dentre eles está o *pstS* (fig3), que de acordo com o trabalho citado acima, responde de maneira rápida a limitação por fosfato. Também foi visto que a resposta do gene *pstS* independe da fonte de fósforo (orgânico ou inorgânico) e sim da sua disponibilidade e quantidade no meio (Harke et al 2012).



**Figura 2.** Esquema mostrando a percepção e tradução do sinal de limitação por fósforo em *Synechocystis*. As proteínas SphS e SphR percebem e traduzem o sinal, atuando na regulação dos genes, que podem responder de forma rápida ou lenta a este sinal. Figura adaptada de Suzuki et al (2004).



**Figura 3.** Figura mostrando um conjunto de genes de resposta rápida, dentre eles o *pstS*, à limitação por fósforo. As setas indicam a direção da transcrição e o tamanho da janela aberta de leitura. Adaptado de Suzuki et al (2004).

### **1.1.2 Limitação por nitrogênio e o gene *ntcA***

O metabolismo do nitrogênio é fortemente influenciado pelo ambiente e a assimilação deste nutriente é regulada em resposta a disponibilidade e fonte de nitrogênio (Luche e Forchhammer, 2008). Amônio é a fonte preferencial de nitrogênio para as cianobactérias (Flores e Herrero, 1994), mas outras fontes, como o nitrato, por exemplo, também são bastante utilizados por estes organismos.

NtcA é o principal fator de transcrição envolvido no trabalho de regulação do metabolismo do nitrogênio em procariotos, e é pertencente à família CAP (proteína ativadora de genes por catabólitos) (Herrero et al, 2001). Esse regulador responde ao regime de nitrogênio (N) celular modulando sua própria atividade ou a expressão de outros genes (Flores e Herrero 1994). NtcA percebe o status de N via 2-oxoglutarato (Laurent et al, 2005) e regula positivamente os genes se ligando a regiões promotoras que exibem uma seqüência consenso GTAN<sub>8</sub>TAC. Além do mais, NtcA pode responder a mudanças no estado redox da célula (Jiang et al 1997; Alfonso et al 2001), e também coordenar a aquisição de ferro e o metabolismo de nitrogênio ativando a expressão dos genes *pkn41* e *pkn42* (Cheng et al 2006). Dessa forma, NtcA também pode estar ligado a percepção de outras fontes de estresse celular, atuando como regulador de vários outros genes.

### **1.1.3 Limitação por ferro e *furN***

Ferro é um elemento abundante na crosta da terra, mas devido a sua baixa solubilidade em pH fisiológico, a limitação por Fe é um dos estresses mais

comuns na natureza. Organismos fotossintéticos necessitam de alta quantidade de ferro, já que este é o principal componente de co-fatores de proteínas envolvidas na fotossíntese e no metabolismo do nitrogênio e, em cianobactérias, a disponibilidade de Fe influencia taxas fotossintéticas e fixação de nitrogênio (Straus, 1994; Kustka et al 2002). Processos de minimização deste estresse em procariotos incluem inúmeras respostas de aclimação, muitas delas sobre controle genético da proteína Fur, que é um regulador global e está envolvido na manutenção da homeostase de ferro (Gomollon et al 2007). Fur reconhece seqüências específicas de DNA e coordena o metabolismo de ferro (Andrews et al 2003). Três tipos de Fur parálogas são conhecidas em cianobactérias, e são chamadas de FurA, FurB e FurC (Hernández et al., 2004).

O controle de Fur pode ser observado através da repressão da transcrição de promotores regulados por Fe em resposta ao aumento da concentração de  $Fe^{+2}$  na célula (Hernandez et al 2002). Além do mais, Fur também vem sendo relacionado ao estresse oxidativo (Nunoshiba et al. 1999), estresse ácido (Hall e Foster 1996) ou produção de toxinas em bactérias heterotróficas (Somerville et al. 1999).

#### **1.1.4 Estresse oxidativo e *per***

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ânions superóxidos, é uma consequência inevitável da vida aeróbica. A presença de ROS pode resultar em danos às proteínas, clivagem de ácidos nucleicos e peroxidação de lipídios insaturados (Halliwell e Gutteridge, 1999) e em particular a inibição de síntese protéica (Nishiyama et al

2001). Organismos fotossintéticos geram ROS durante a fotossíntese. Entretanto, ROS podem ser mantidas a níveis não prejudiciais pela ação de sistemas antioxidantes e enzimas como as catalase-peroxidase e tioredoxina-peroxidase em cianobactérias (Tichy e Vermaas, 1999; Yamamoto et al, 1999). Entretanto, suas ações podem não ser suficientes para proteger os componentes celulares em algumas situações de aumento do ROS, resultantes da distorção do metabolismo causados por mudanças nas condições ambientais. Para proteção efetiva da célula, mecanismos envolvidos na percepção do aumento de ROS e regulação da expressão de vários genes, podem conferir habilidade de tolerância ao estresse oxidativo (Kanesaki et al 2007)

Peroxiredoxinas (genes *prx* ou *per*) são conhecidas como tiol-peroxidases ou tioredoxinas peroxidases e catalisam a redução de vários peróxidos de hidrogênio. PerR pode estar envolvida na regulação de 6 genes sendo 4 destes codificando proteínas com função desconhecida (Zorina et al 2011). No entanto, o papel desta proteína no estresse oxidativo vem sendo provado e sabe-se que ela é essencial e indispensável para a célula (Hosoya-Matsuda et al. 2004). Desta forma, mudanças na expressão do gene *perR* podem indicar que a célula está sob um estado redox diferenciado e tentando se proteger contra o mesmo.

#### **1.1.5 Cianopetídeos e sua ligação com o estresse**

Alguns outros genes, ligados a produção de cianopeptídeos (*mcyD*, *cnp* e *aerA*) também foram avaliados neste trabalho com o objetivo de verificarmos a relação da produção destes peptídeos com o estresse em cianobactérias.

Cianobactérias produzem vários peptídeos tóxicos e não-tóxicos, alguns dos quais mostram notável atividade biológica, e por isto atraem a atenção de vários estudiosos. Entretanto, pouco se sabe sobre a função destas moléculas para as cianobactérias e estudos recentes conduzidos com microcistina, mostraram que sua função pode estar relacionada à percepção de estresse do meio pela célula (Ross et al., 2006; Qian et al 2010; Zilliges et al 2011).

O gene *mcyD* está relacionado com a produção de microcistina em cianobactéria e sua produção pode ser influenciada por diferentes parâmetros físicos e químicos, incluindo nitrogênio, fósforo, ferro, temperatura, luz e pH (van der Westhuizen e Eloff, 1985; Sivonen, 1990; Lukac e Aegerter, 1993; Song et al., 1998). Microcistina pode ter um importante papel no metabolismo de carbono e nitrogênio e no controle e percepção de mudanças do estado redox da célula (Neilan 2012). Além disso, a região reguladora central do agrupamento de genes *mcy* possui motivos de ligação das proteínas Fur e NtcA (Ginn et al. 2010; Kuniyoshi et al 2011) o que pode representar um indicativo do envolvimento deste peptídeo na percepção de estresse abiótico.

Também pouco se sabe sobre a função dos outros peptídeos investigados aqui. Cianopeptolina (*cnp*) e aeruginosina (*aer*) são caracterizados como inibidores de proteases e podem ser produzidos por várias cianobactérias. As aeruginosinas já foram isoladas de várias cepas de *Microcystis* (Murakami et al. 1995; Matsuda et al. 1996; Kodaniet al. 1998; Ploutnoet al. 2002; dentre outros), *Planktothrix* (Kodaniet al. 1998; Ishidaet al. 2007) e *Radiocystis* (Lombardoet al. 2006). Já as cianopeptolinas foram isoladas em cepas de *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Lyngbya* (Welker & von Döhren 2006) e *Aphanocapsa* (Choiet al. 2008). A avaliação da expressão

gênica destes cianopeptídeos pode representar um indicativo importante do papel destas substâncias para as cianobactérias.

## **1.2 Justificativa e objetivos do trabalho**

A compreensão de processos ecofisiológicos importantes das cianobactérias no ambiente, como resposta ao estresse, por exemplo, é relativamente difícil, devido a variações e sinergismos entre os fatores abióticos e bióticos. A introdução relativamente recente de técnicas moleculares para quantificação da expressão gênica de amostras do ambiente tem possibilitado um grande entendimento destes processos, e ainda do papel e da diversidade de muitas populações microbianas (Sharkey et al 2004). Apesar disso, estas técnicas são ainda pouco utilizadas em estudos ambientais com cianobactérias. O objetivo do presente trabalho foi medir a expressão de genes relacionados a estresse, já mencionados no texto, para estudar a dinâmica e interação de fatores bióticos e abióticos em dois reservatórios de água doce com características distintas. As mudanças na expressão gênica e de outros parâmetros biológicos foram avaliadas juntamente com as mudanças físico-químicas da água. Padrões de sazonalidade e indicativos de estresse foram medidos e correlacionados com as medidas de expressão dos genes. A detecção e acompanhamento da expressão gênica no ambiente podem representar um importante avanço em estudos da ecologia das cianobactérias e de suas interações no ambiente aquático.

## **2.0 Materiais e Métodos**

As coletas de campo foram realizadas por equipes do laboratório de Ficologia (ICB/UFMG) e de Hidrologia (Engenharia/UFMG) em dois reservatórios distintos: reservatório de Volta Grande e reservatório da Pampulha, descritos na seção área de estudo.

Na Pampulha, amostras foram coletadas na profundidade de 0.5 m (disco de sechhi) com auxílio da garrafa de Van Dorn e levadas para o laboratório. Já a amostragem em Volta Grande foi realizada de maneira integrada em toda a profundidade da zona eufótica (ZE), sendo esta medida através do disco de sechhi. Para tanto, foi utilizado um tubo coletor que quando atingia a profundidade da ZE era tampado e a amostra era então recolhida. Parte desta foi filtrada e congelada (-20°C ou -80°C) e a outra colocada em garrafas apropriadas, para análises de nutriente (congeladas até o momento da análise) e contagem do fitoplâncton (preservadas com lugol acético).

### **2.1 Análises físico-químicas e biológicas**

Diretamente no campo, foram medidos profundidade do disco de Secchi (DS) para cálculo da Zona eufótica, e oxigênio, pH, temperatura e condutividade com auxílio de uma sonda multiparâmetros (YSI 556). No reservatório de Volta Grande (VG), as medidas foram realizadas de 0.5 em 0.5 m até a profundidade de 2 m e depois disso em intervalos de 1 m até o fundo, e os dados de temperatura são resultados da média das temperaturas de toda a zona eufótica (ZE). Já no reservatório da Pampulha, os dados obtidos com a sonda foram coletados somente na profundidade de 0.5 m, já que os valores de

profundidade da lagoa e a ZE são baixos. As análises de nutrientes foram realizadas por métodos espectrofotométricos como descrito em APHA (1995). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Amostras de fitoplâncton foram preservadas com lugol-acético e a quantificação de cianobactérias foi realizada em câmaras de sedimentação usando microscópio invertido (Zeiss), no aumento de 400 vezes, pela técnica de Utermöhl (Utermöhl 1958). Cem células ou colônias da espécie dominante foram contadas e para melhorar a precisão, espécies subdominantes foram usadas na contagem ao invés da dominante, quando havia uma abundância extrema desta última. Essa metodologia permite uma precisão de  $\pm 20\%$  para um limite de confiança de 95% (Lund et al. 1958).

## **2.2 Análises Moleculares**

### **2.2.1 Extração de RNA**

Cerca de 20 mL e 500 mL de amostra ambiental foram filtrados, em filtros de membrana de fibra de vidro (GF microfiltro 47 mm), para Pampulha e VG, respectivamente, e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises.

Para análises de expressão gênica, o RNA foi extraído seguindo-se dois passos: lise celular e purificação do RNA. Trizol (Invitrogen) foi adicionado ao filtro contendo o material coletado, que foi imediatamente congelado com auxílio de nitrogênio líquido. A extração foi realizada pelo procedimento de congelamento ( $\text{N}_2$ ) e descongelamento do material, com auxílio de um homogenizador, por pelo menos cinco vezes. Após isso, foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para a etapa de purificação do RNA. A

partir daí, seguiu-se o procedimento recomendado pelo fabricante do Trizol (Invitrogen). O RNA total foi ressuspendido em 40 µl of H<sub>2</sub>O DEPC e tratado com 1 U/µg de Dnase (promega) a 37°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de “stop solution” e pelo aquecimento de 10 min a 65°C. Após este tratamento, uma PCR foi realizada para a verificação da existência de traços de gDNA na amostra (ver condições abaixo). A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer - NanoDrop Technologies) e algumas medições realizadas em fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

### **2.2.2 RT-PCR e PCR quantitativa**

Para realização das PCRs alguns dos oligonucleotídeos (iniciadores ou primers) utilizados foram desenhados neste trabalho e outros obtidos na literatura (tabela 1). Para o desenho dos iniciadores, seqüências de alguns gêneros de cianobactérias depositadas no banco de dados genéticos (GenBank, NCBI) foram agrupadas (MultAlign Tool - Corpet 1988) e regiões com alta similaridade foram identificadas e escolhidas. Estes oligonucleotídeos foram testados, através de PCR convencional, em diferentes linhagens do banco de cultivo do laboratório de Ficologia da UFMG

A reação de transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada com cerca de 500 ng de RNA e um kit específico (High Capacity Kit - Applied Biosystems), contendo os reagentes necessários para esta reação. Foi utilizado um primer randômico do kit para transformar RNA mensageiro em cDNA. As concentrações e condições de ciclagem da PCR foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante.

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada para a quantificação relativa de transcritos gênicos, dos genes de estresse e de cianopeptídeos. As reações de qPCR foram feitas usando o sistema StepOne (Applied Biosystems), e amostras de cDNA (sem diluição), 0.3 µl de cada iniciador (10pmol/µL), 5 µl de Power SYBR Green I (Applied Biosystems) e água ultra pura estéril, em um volume final de 10 µl. As reações foram realizadas em duplicata e em caso de duvida uma terceira reação era feita. Todas as reações de qPCR foram submetidas às ciclagens recomendados pelo fabricante.

As análises dos dados foram realizadas através do programa StepOne™ Software, version 2.0. Para a quantificação relativa, utilizamos o valor de delta CT que advêm da subtração dos valores de CT do gene alvo e do gene de referencia (16S). O gene 16S é sempre expresso na célula (constitutivo), independente das mudanças ambientais e, portanto é utilizado como uma normalização para que as amostras possam ser comparadas. Valores baixos de delta CT significam uma maior expressão gênica.

Análises da curva de dissociação foram realizadas em todas as reações de qPCR para determinar a especificidade dos produtos amplificados. Esta análise foi realizada no final de cada reação, por aumento gradual na temperatura de 70°C a 95°C, por 0.1°C.s<sup>-1</sup>. Dados da intensidade de fluorescencia foram continuamente gerados e convertidos em picos de dissociação, usando-se o programa LightCycler software.

### **2.3 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o modelo linear generalizado (GLM) no pacote estatístico “R software”. Verificou-se a existência de correlação entre os dados ambientais e moleculares obtidos e a significância destes dados. Também, diferenças sazonais entre seca e chuva foram avaliadas, através do teste t-student, também utilizando o pacote estatístico R. O nível aceito de significância dos dados foi de  $p < 0.05$ .

1 **Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo**

2

<b>Primer</b>	<b>Descrição</b>	<b>Seqüência 5' - 3'</b>	<b>Referência</b>
16S F	Gene de referência	TGCGTAGAGATTGGGAAGAACATC	Sevilla et al 2008
16S R	Gene de referência	GCTTTCGTCCCTGAGTGTCA	Sevilla et al 2008
pstS F	Gene de proteína ligante de fosfato	AACGATGCTTCCCGCCGTCA	Harke et al 2012
pstS R	Gene de proteína ligante de fosfato	TCAATGGTGCGGGCGCTTCT	Harke et al 2012
qntcA F	Gene regulador de nitrogênio	TGCAGGGTTTGTCCCTCGCGG	Esse estudo
qntcA R	Gene regulador de nitrogênio	CCCGGATGCCATCGGTGGTG	Esse estudo
furN	Gene regulador da aquisição de Fe	GATGGGAATTTTGCGGGAGTTG	Marin-Luna et al 2011
furC	Gene regulador da aquisição de Fe	GGATAGGGTTGATTGAGTTCGTAGT	Marin-Luna et al 2011
perM F	Gene da Peroxiredoxina	GATAGCTGGGTGGTGCTGTT	Esse estudo
perM R	Gene da Peroxiredoxina	GGGATTCGGCACTATCCACA	Esse estudo
qmcvD F	Gene da microcistina D	GCATCTTCTAAAGAAAAGACTCC	Pimentel et al 2013
qmcvD R	Gene da microcistina D	AAATTATGGCAATCTTGGGGAATA	Pimentel et al 2013
cnp F	Gene da Cianopeptolina	GCTAGAAATTCACAGCCATCA	Esse estudo
cnp R	Gene da Cianopeptolina	ACCCCCATTGACCAACCATC	Esse estudo
aerA R	Gene da Aeruginosina A	ACCCAGAACGGAAGCTGAACG	Esse estudo
aerA F	Gene da Aeruginosina A	ACTGGCAACGGTGGGGTATT	Esse estudo

### 3 3.0 RESULTADOS

#### 4 3.1 Sazonalidade: Diferenças entre as estações secas e chuvosas

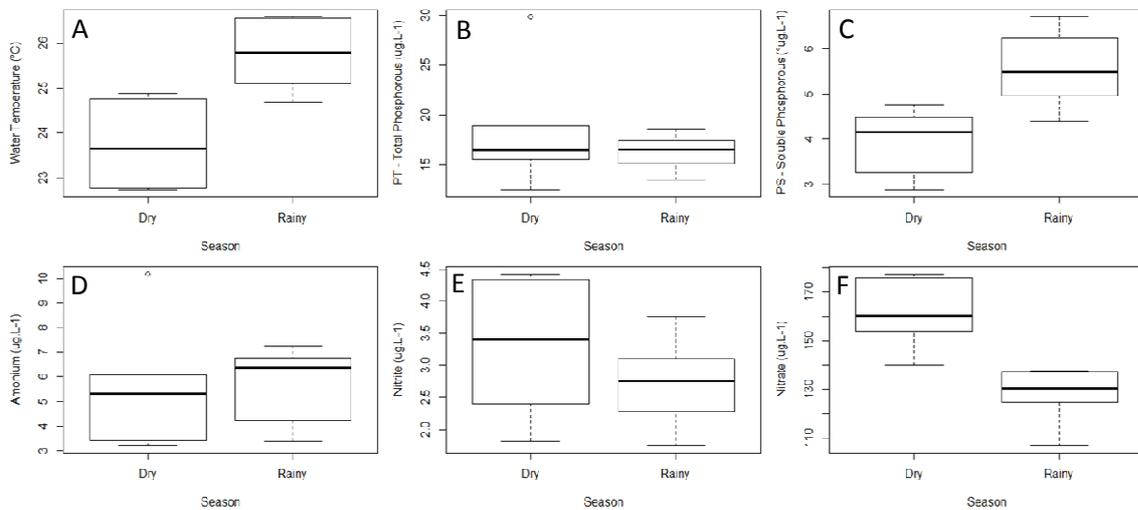
##### 5 3.1.1 Volta Grande

6 No período amostrado no reservatório de Volta Grande (VG) foi encontrada  
7 uma variação sazonal significativa para os parâmetros temperatura da água  
8 ( $p=0.004$ ), nitrato ( $p=0.001$ ), e fósforo solúvel ( $p=0.005$ ), e para a expressão  
9 dos genes *perM* ( $p=0.03$ ), *ntcA* ( $p<0.001$ ) e *pstS* ( $p<0.001$ ) (fig. 6). A  
10 sazonalidade térmica foi observada com diferenças médias de 2°C da  
11 temperatura entre as estações seca e chuvosa, mas uma diferença de 4°C foi  
12 observada entre o primeiro e o último mês amostrado (tab. 2). A menor  
13 temperatura encontrada foi na estação seca. Para dados de nutriente, P-PO<sub>4</sub>  
14 teve menores valores na estação seca, contrariamente ao encontrado para  
15 nitrato (fig. 4). A expressão dos genes ligados ao estresse foi maior na estação  
16 chuvosa (fig. 5).

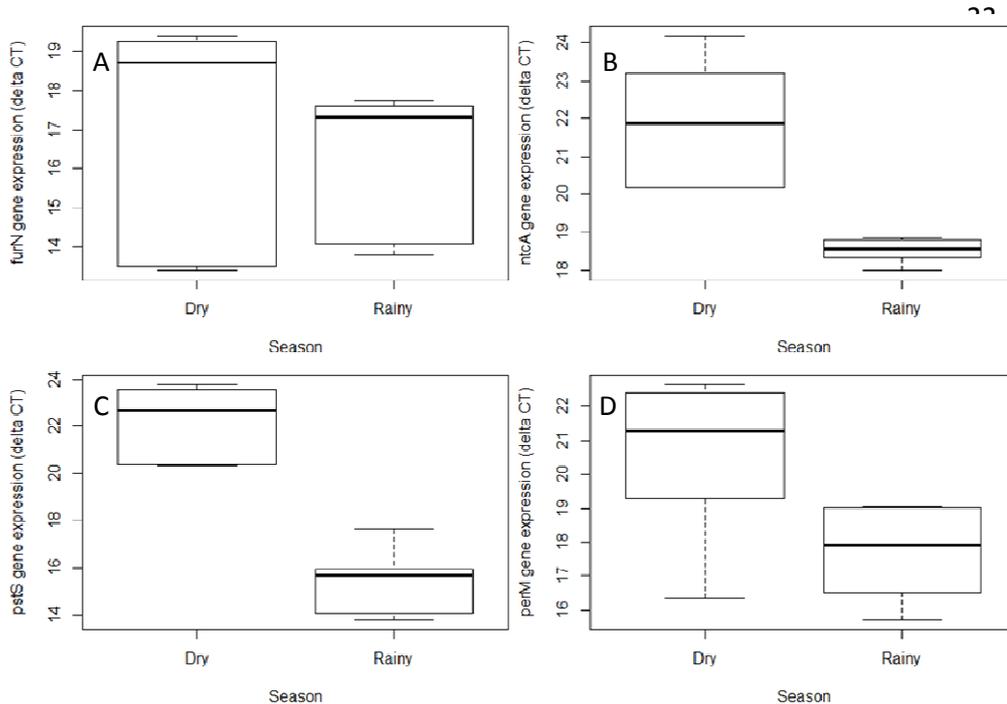
17

18

19



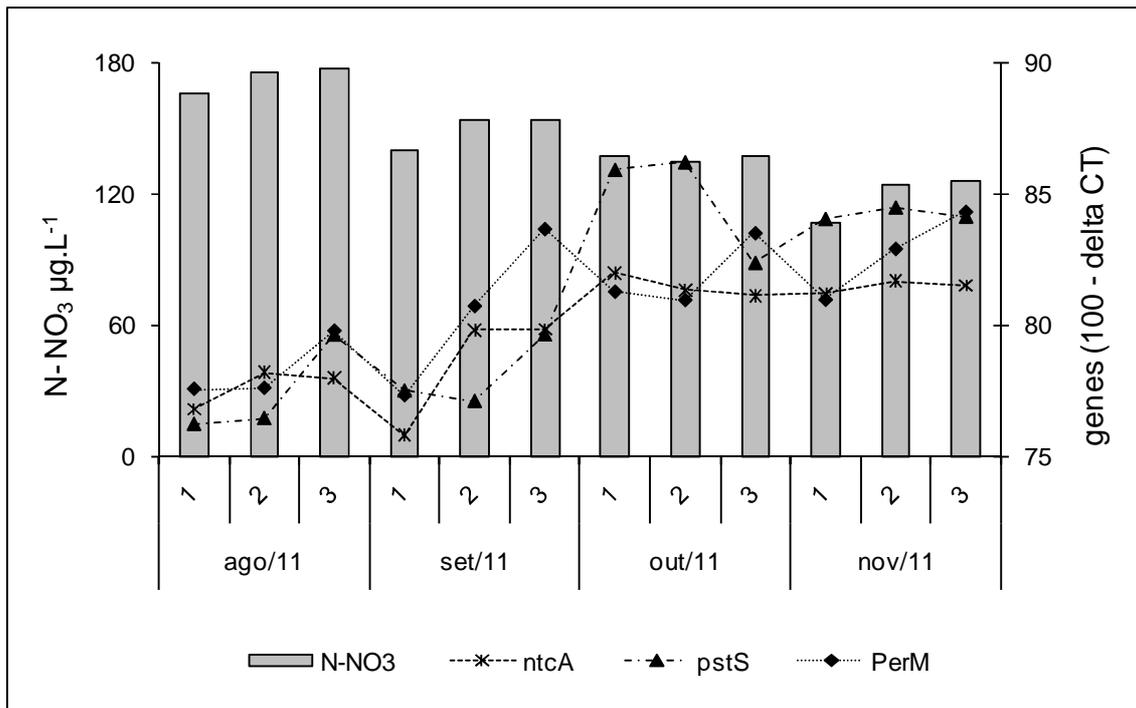
20 **Figura 4.** Variação dos dados ambientais na estação seca e chuvosa em  
VG. (A) Temperatura da água\*, (B) TP, (C) PS\*, (D) Amônio, (E) Nitrito e (F)  
21 Nitrato\*. O símbolo \* indica variação significativa entre as duas estações  
(seca e chuva).



**Figura 5.** Variação dos dados de expressão dos genes ligados ao estresse, nas  
estações seca e chuvosa. (A) *furN*, (B) *ntcA*, (C) *pstS* e (D) *perM*. Baixos valores  
de CT indicam alta expressão gênica. Somente para *furN* não observamos  
variação significativa.

**Tabela 2: Dados ambientais do reservatório de Volta Grande: parâmetros físico-químicos e biológicos**

Coleta	Estação	Temp (°C)	Chl <i>a</i> (µg.l <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	P-total (µg.l <sup>-1</sup> )	P-PO <sub>4</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	Ciano total (cel.mL <sup>-1</sup> )
ago/11 (1)	Seca	22.75	0.79	10.2	166.47	4.29	15.51	4.29	4.51E+02
ago/11 (2)	Seca	22.96	1.21	6.1	175.56	4.43	18.98	4.48	1.43E+02
ago/11 (3)	Seca	22.79	1.46	3.4	177.49	4.33	12.53	4.01	5.08E+03
set/11 (1)	Seca	24.88	1.39	5.7	140.00	1.83	29.87	2.9	1.58E+03
set/11 (2)	Seca	24.36	1.80	5.0	154.30	2.53	17.45	4.8	2.42E+05
set/11 (3)	Seca	24.78	1.64	3.2	153.68	2.40	15.53	3.3	5.58E+03
out/11 (1)	Chuva	25.16	1.61	6.8	137.61	3.11	17.38	4.40	1.01E+04
out/11 (2)	Chuva	25.11	1.94	3.4	134.76	3.77	18.59	5.74	6.91E+04
out/11 (3)	Chuva	24.70	1.36	6.0	137.27	2.91	17.48	4.97	6.49E+03
nov/11 (1)	Chuva	26.44	1.43	6.8	106.80	2.60	13.44	6.71	3.38E+03
nov/11 (2)	Chuva	26.59	1.28	7.3	124.40	2.29	15.16	5.24	1.26E+04
nov/11 (3)	Chuva	26.55	1.47	4.2	126.36	1.75	15.87	6.22	3.05E+04
média	seca	23.75	1.38	5.60	161.25	3.30	18.31	3.95	42466.01
	chuva	25.76	1.52	5.74	127.87	2.74	16.32	5.55	22024.85



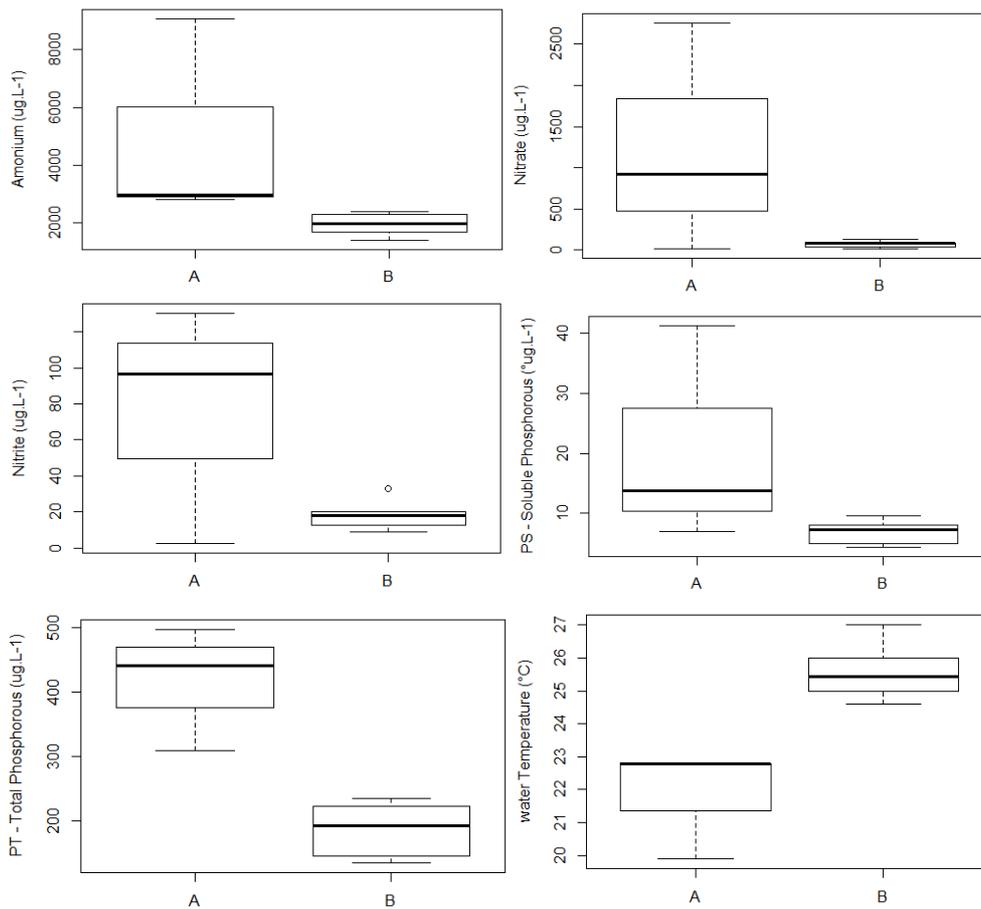
1

2 **Figura 6.** Variação sazonal entre os meses e pontos amostrados e repostas  
 3 dos genes ao estresse no reservatório de Volta Grande.

4

### 5 3.1.2 Pampulha

6 Para o reservatório da Pampulha, considerando os meses amostrados P1 a P3  
 7 (estação A - Seca) e P4 a P8 (estação B - Chuvosa) como duas estações  
 8 sazonais distintas, foram encontrados uma variação sazonal significativa para  
 9 os parâmetros temperatura da água ( $p < 0.01$ ), fósforo total ( $p = 0.003$ , Fig. 7) e  
 10 também para a expressão dos genes *perM* ( $p = 0.0108$ ), *pstS* ( $p = 0.0108$ ), *furN*  
 11 ( $p = 0.0308$ ) e *cnp* ( $p = 0.0103$ ) (Fig. 8). Os valores de PT diminuíram na estação  
 12 chuvosa, enquanto que a expressão dos genes aumentou nesta mesma  
 13 estação (Fig. 9). A sazonalidade térmica foi observada com diferenças médias  
 14 de 4°C da temperatura da água entre as estações seca e chuvosa. A menor  
 15 temperatura encontrada foi na estação seca.



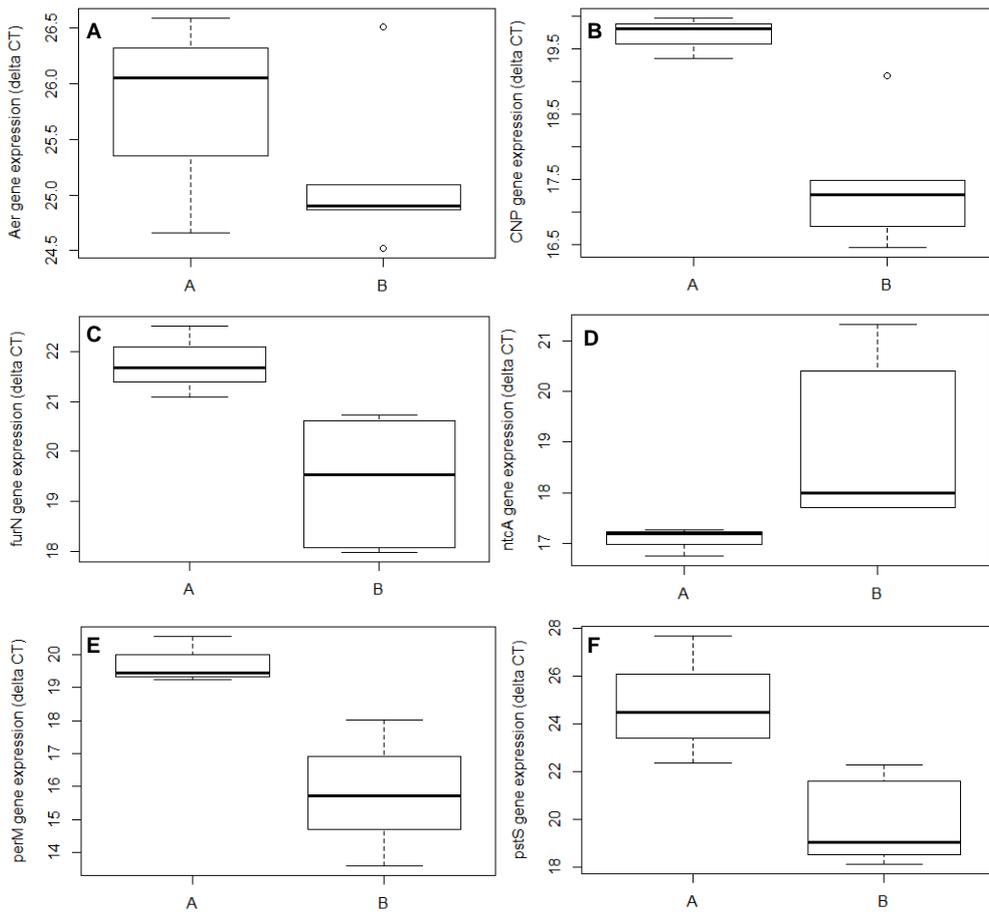
16

17

18

19 **Figura 7.** Variação dos dados ambientais entres as estações seca (A) e  
 20 chuvosa (B). Somente fosforo total (PT) e temperatura da água apresentaram  
 21 variação significativa entres as estações.

22

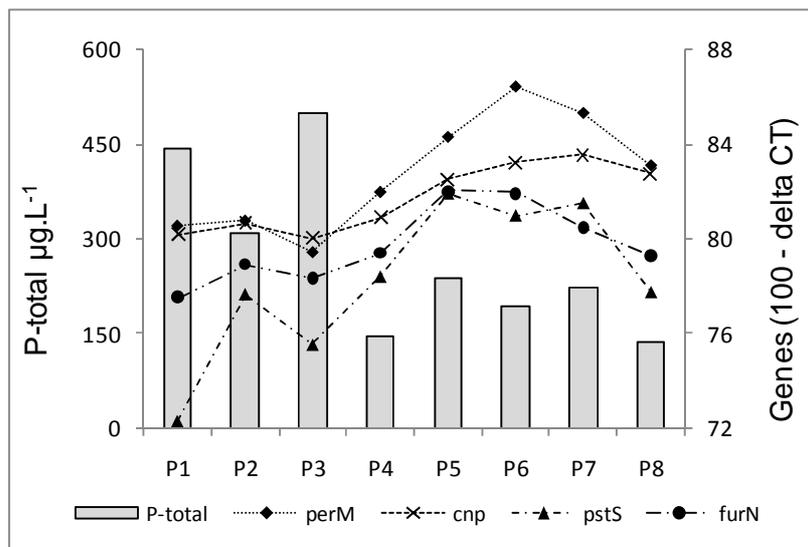


23

24

25

26 **Figura 8.** Variação dos dados de expressão gênica entres as estações seca  
 27 (A) e chuva (B) na Pampulha. (A) *aer*, (B) *cnp*, (C) *furN*, (D) *ntcA*, (E) *perM* e  
 28 (F) *pstS*. Somente os genes *ntcA* e *aer* não apresentaram variação significativa  
 29 entres as estações. Valores baixos de CT indicam maiores valores de  
 30 expressão gênica.



31

32 **Figura 9.** Variação sazonal entre os meses amostrados, e respostas dos genes  
 33 no reservatório da Pampulha.

34 **Tabela 3. Dados ambientais da Lagoa da Pampulha**

35

Coleta	Estação	Temp (C°)	Chl a (µg.l-1)	N-NH4 (µg.l-1)	N-NO3 (µg.l-1)	N-NO2 (µg.l-1)	P-total (µg.l-1)	P-PO4 (µg.l-1)	Umid. Rel (%)	Rad. Glob	Chuv (mm)	Ciano total (cel.mL-1)
23/08/2012 (P1)	seca	19.90	362.65	9085.50	19.20	2.53	441.78	41.33	60.60	142.68	0.00	6.87E+05
10/10/2012 (P2)	seca	22.80	249.04	2966.50	2759.20	130.30	310.00	6.96	52.11	189.78	0.01	2.39E+06
23/10/2012 (P3)	seca	22.80	569.22	2801.00	924.60	96.50	497.60	13.74	53.27	217.11	0.01	4.41E+06
21/11/2012 (P4)	chuva	24.60	153.68	1669.50	82.48	33.00	146.38	4.94	53.53	205.53	0.02	1.38E+06
19/12/2012 (P5)	chuva	x	362.05	2264.50	41.12	12.64	236.16	7.29	76.66	162.53	0.06	2.41E+06
09/01/2013 (P6)	chuva	27.02	284.57	1951.50	128.80	17.98	193.70	4.30	67.35	209.00	0.04	3.23E+06
23/01/2013 (P7)	chuva	25.43	110.31	2370.00	16.17	9.15	224.04	9.56	76.23	255.49	0.09	2.83E+06
08/02/2013 (P8)	chuva	26.00	128.34	1377.00	81.75	20.00	135.60	8.07	56.75	307.84	0.03	6.87E+05
média	seca	21.83	393.64	4951.00	1234.33	76.44	416.46	20.68	55.33	183.19	0.01	2.50E+06
	chuva	25.76	207.79	1926.50	70.06	18.55	187.18	6.83	66.10	228.08	0.05	2.46E+06

36

37

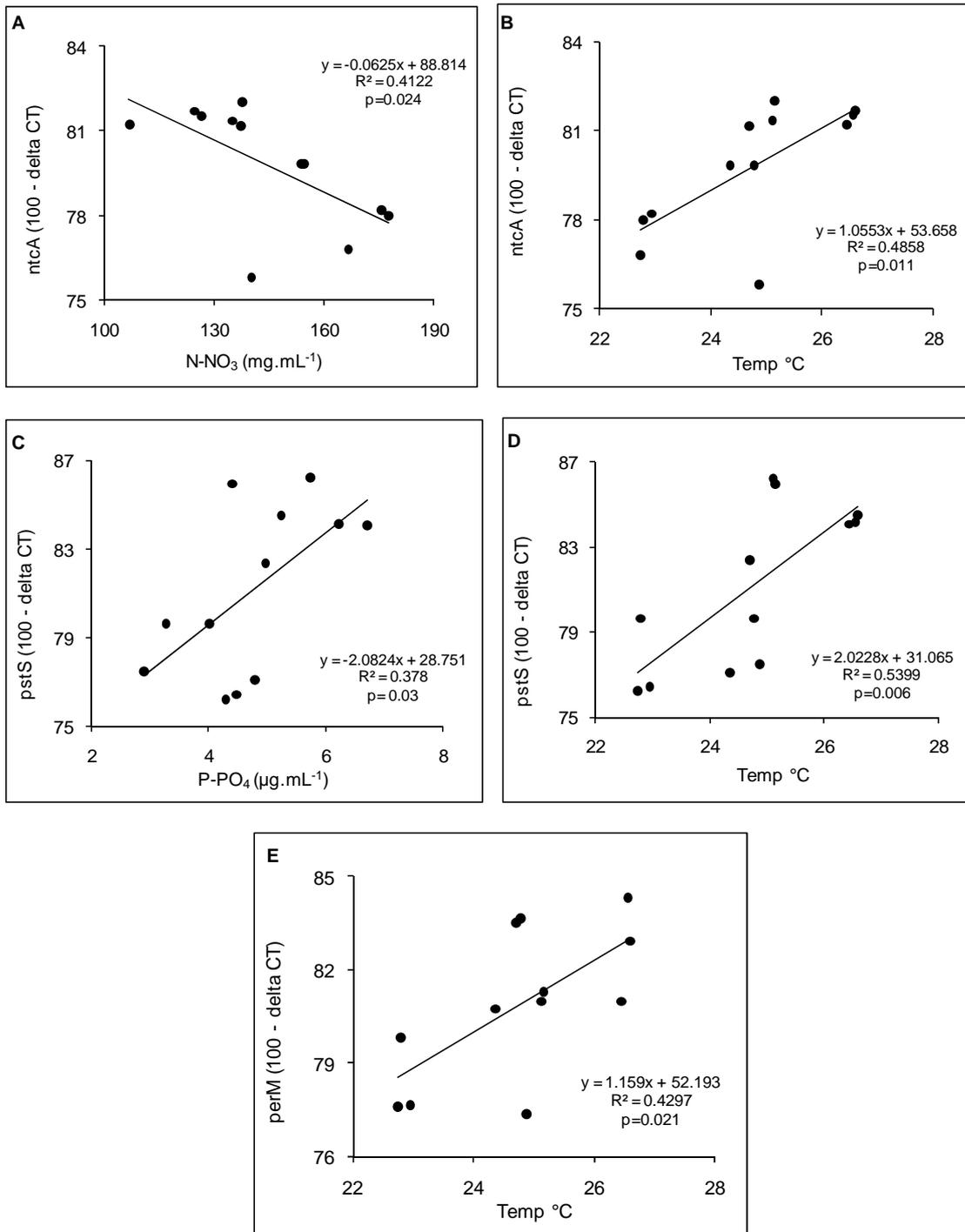
## 3.2 Nutrientes e resposta ao estresse

### 3.2.1 Volta Grande

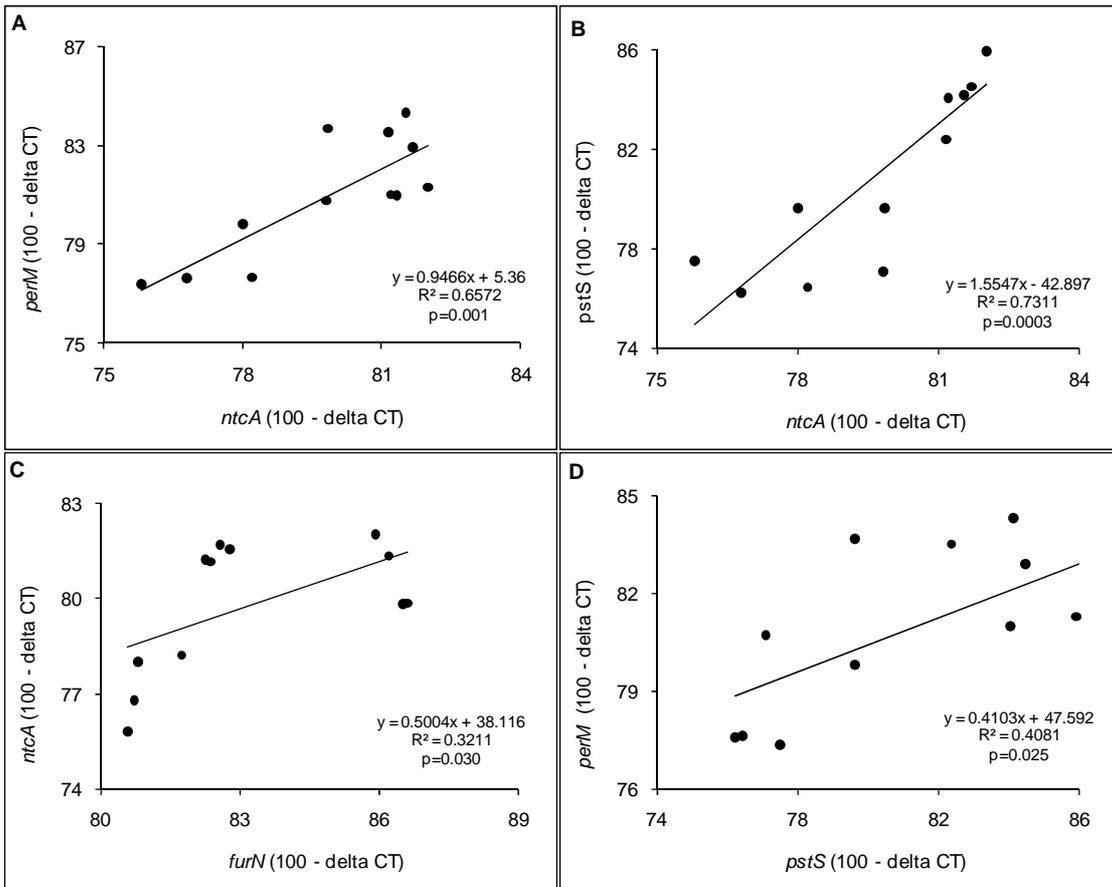
De todos os nutrientes avaliados neste reservatório, o nitrato parece exercer um papel de maior importância dentro do grupo das cianobactérias. O reservatório de Volta Grande (VG) possui valores maiores de nitrato do que de amônio e nitrito, e os valores de fósforo solúvel estão abaixo ou no limite de detecção deste composto. O fósforo total não sofreu alterações sazonais significativas.

Valores de expressão do gene *ntcA* ligado ao estresse por N se correlacionaram de forma negativa com a nitrato ( $r^2=0.41$ ,  $p=0.02$ ), como era esperado (Fig.10A). Entretanto, uma correlação positiva entre P-PO<sub>4</sub> e *pstS* ( $r^2=0.38$ ,  $p=0.03$ , Fig.10C) foi observada. Porém, os valores de fósforo solúvel estiveram abaixo ou no limite de detecção do método, e essa correlação pode não corresponder à realidade.

Valores dos parâmetros ambientais temperatura e nitrato parecem ter sido responsáveis pelas respostas ao estresse observado neste trabalho. Com exceção de *FurN*, que se correlacionou apenas com *ntcA* ( $r^2=0.32$ ,  $p=0.03$ ), todos os genes ligados ao estresse tiveram dados de expressão que se correlacionaram com o aumento da temperatura (Fig. 10B, 10D e 10E) e também entre si (Fig. 11).



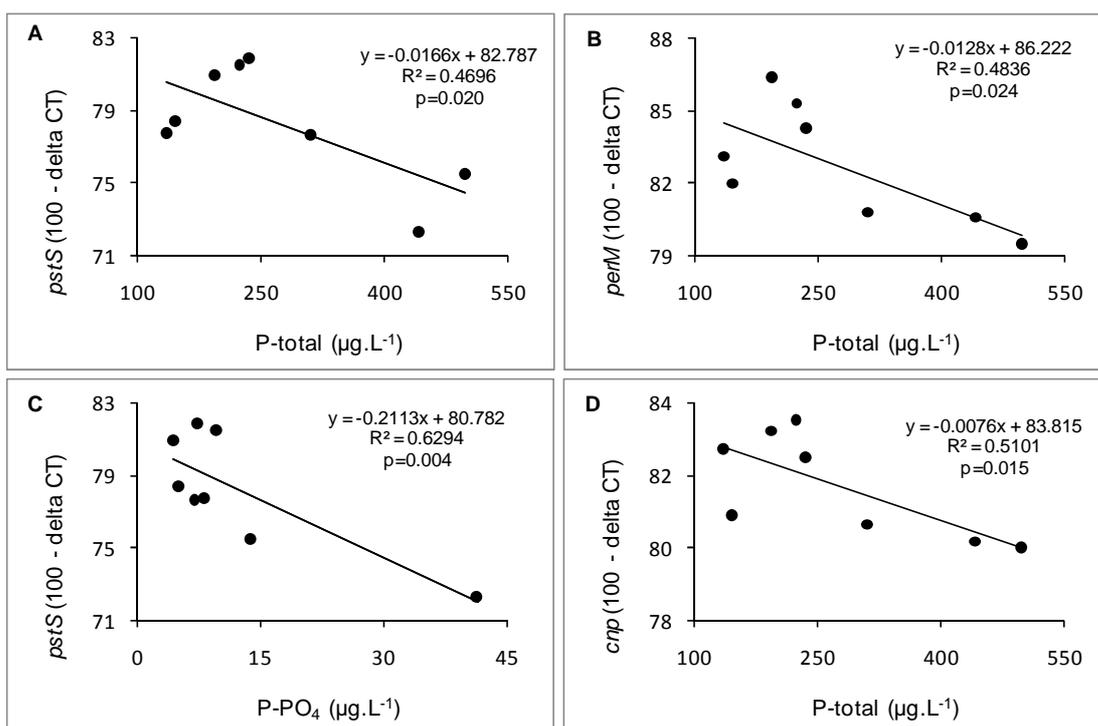
**Figura 10.** Correlação entre os genes de estresse e parâmetros abióticos em VG. (A) Resposta do gene *ntcA* e nitrato; (B) Resposta do gene *ntcA* e temperatura; (C) Resposta do gene *pstS* e fósforo solúvel; (D) Resposta do gene *pstS* e temperatura; (E) Resposta do gene *perM* e temperatura.



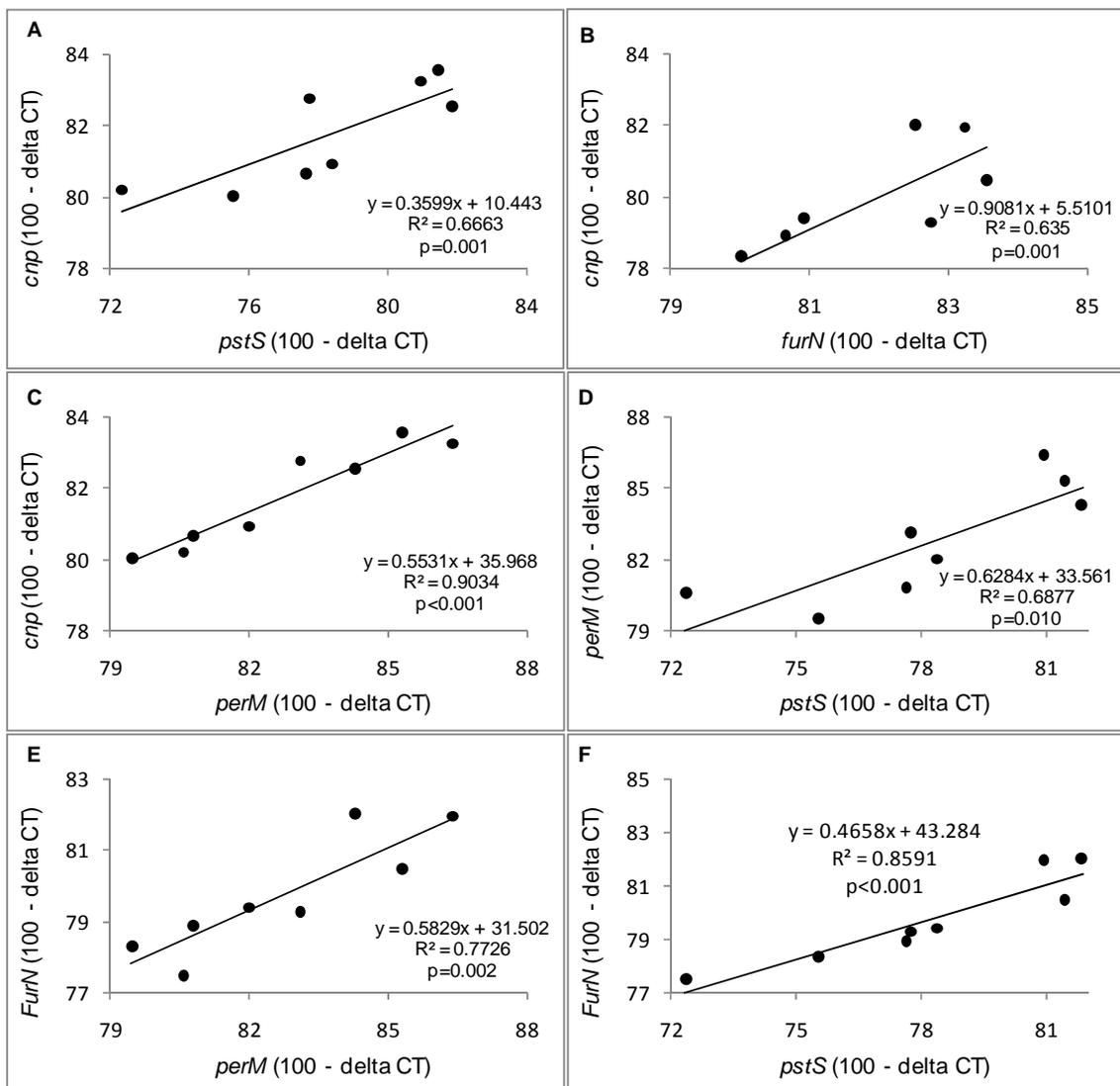
**Figura 11.** Correlação entre os genes ligados ao estresse em cianobactérias em Volta Grande. (A) Genes *perM* e *ntcA*; (B) Genes *pstS* e *ntcA*; (C) genes *furN* e *pstS*; (D) Genes *perM* e *pstS*.

### 3.2.2 Pampulha

No reservatório da Pampulha foram encontradas altas concentrações de todos os nutrientes estudados. Entretanto, somente a variação de fósforo total, juntamente com temperatura da água, pareceu ser importante como indutor de estresse em cianobactérias. Os genes *pstS*, *perM* e *cnp* responderam a diminuição do fósforo total (correlação negativa, Fig. 12) e somente *pstS* se correlacionou, também de forma negativa, ao fósforo solúvel. As correlações entre o gene *pstS* e fósforo eram esperadas, já que este gene responde à limitação por fósforo. Também, foi possível observar, uma correlação positiva entre diversos genes estudados (Fig. 13).



**Figura 12.** Correlações encontradas no reservatório da Pampulha, entre fontes de fósforo e expressão de alguns genes. (A) Resposta do gene *pstS* e fósforo total; (B) Resposta do gene *perM* e fósforo total; (C) Resposta do gene *pstS* e fósforo solúvel; (D) Resposta do gene *cnp* e fósforo total.



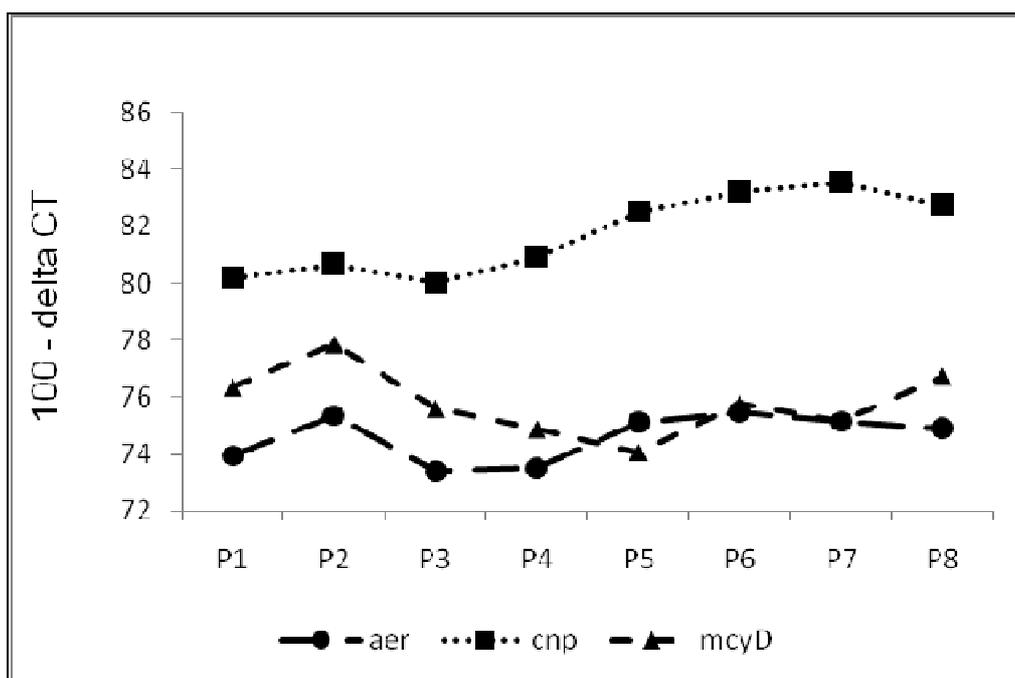
**Figura 13.** Correlações encontradas na Pampulha entre valores de expressão de alguns dos genes estudados. (A) Genes *cnp* e *pstS*; (B) Genes *cnp* e *furN*; (C) Genes *cnp* e *perM*; (D) Genes *perM* e *pstS*; (E) Genes *furN* e *perM*; e (F) Genes *furN* e *pstS*.

### 3.3 Cianobactéria e Cianopeptídeos

As cianobactérias, no reservatório de VG, são representadas majoritariamente por picocianobactérias e espécies potencialmente tóxicas estão presentes somente em alguns meses e pontos estudados. Neste ambiente, como a quantidade de cianobactéria era muito pouca e provavelmente a produção de

cianopeptídeos também era baixa, não conseguimos estudar a expressão dos mesmos neste reservatório.

Entretanto, na Pampulha, encontramos uma alta concentração de cianobactérias, e, portanto a medição da variação de expressão dos genes ligados a produção dos cianopeptídeos, como aeruginosina, cianopeptolina e microcistina, foram possíveis. A expressão dos genes *mcyD* e *aer* não se alteraram de forma significativa entre os períodos sazonais, enquanto que o gene *cnp* teve sua expressão aumentada no período chuvoso (Fig. 14).



**Figura 14.** Variação da expressão dos genes ligados a produção de cianopeptídeos *aer*, *cnp* e *mcyD*, na lagoa da Pampulha

## **4.0 Discussão**

### **4.1 Ambiente e Sazonalidade**

Nos reservatórios estudados foi possível observar sazonalidade para alguns dos parâmetros estudados. A sazonalidade ambiental afeta importantes processos ecológicos e o seu efeito sobre as comunidades no ambiente aquático tem sido o foco de muitos estudos (por exemplo, Flecker e Feifarek, 1994; Bispo et al., 2006). No caso de regiões tropicais, a alta sazonalidade pluviométrica pode ter um forte impacto sobre as flutuações temporais observadas em ecossistemas aquáticos (Bispo e Oliveira, 1998). No presente trabalho, a variação da temperatura observada entre os períodos de seca (baixa temperatura) e de chuva (altas temperaturas) foram os principais fatores responsáveis pela sazonalidade nos reservatórios. Este padrão de seca e chuva é muito comum em reservatórios no Sudeste do Brasil (Tundisi et al 1995, Figueredo e Giani 2001, Greco 2002, Calijuri et al 2002).

Com relação aos nutrientes, alguns deles também apresentaram variações importantes nas estações de seca e chuva. VG, um ambiente com baixo grau de trofia, teve o nitrato como único nutriente com variação sazonal e este elemento pareceu interferir diretamente na comunidade de cianobactérias deste local. Já na Pampulha o fósforo total foi o nutriente mais importante, e apesar do excesso deste nutriente na lagoa, ele parece representar um componente crítico neste ambiente. Processos internos como excreção de nutrientes pelo zooplâncton e metabolismo de bactérias e algas podem contribuir para modificar as taxas de ciclagem de nutrientes em lagos tropicais

e sua disponibilidade, e transformar nutrientes que normalmente estão em excesso no ambiente, em limitantes (Pinto-Coelho 1994).

De acordo com o proposto pelo “esquema de interações tróficas” (Reynolds 1984), existe um efeito sinérgico entre temperatura e outros fatores ambientais, e aumento da temperatura e luminosidade e diminuição da disponibilidade de nutrientes podem ter um efeito considerável no fitoplâncton. O efeito da chuva na diluição dos nutrientes foi evidente neste trabalho apenas para alguns nutrientes. De qualquer forma, os dados de nutrientes que tiveram uma diminuição em sua disponibilidade, no período de chuva, podem ter influenciado a dinâmica de resposta fisiológica das cianobactérias presentes no reservatório, já que os genes relacionados diretamente à limitação destes compostos (*ntcA* e *pstS*) tiveram sua expressão aumentada.

#### **4.2 Estresse em Cianobactérias**

O aumento da temperatura, juntamente com o aumento da chuva e luminosidade parecem ter sido os principais fatores que desencadearam o estresse nas cianobactérias. E o sinergismo destes fatores, acompanhado da diminuição de nutrientes essenciais para as cianobactérias, refletiram nas mudanças de expressão gênica e provável adaptação das cianobactérias a este período.

Altas temperaturas podem ter efeitos diretos e indiretos nos organismos, já que podem afetar solubilidade dos gases, como por exemplo, decréscimo de oxigênio dissolvido (Mota 2006), e ainda diversas outras reações químicas na

água (Giani 1994). Temperatura freqüentemente está correlacionada com saturação de luz e com muitos outros processos celulares, como atividade fotossintética, por exemplo, que aumenta com o aumento da temperatura (Reynolds 2006).

Os genes *ntcA* e *pstS*, ligados a estresse por nutrientes, foram importantes neste estudo e responderam de acordo com a limitação dos nutrientes correspondentes a cada um deles. É interessante notar que, em ambos os reservatórios avaliados, obtivemos resposta de aumento da expressão do gene *pstS* no período da chuva, apesar de somente observarmos uma diminuição significativa de fósforo total na Pampulha, neste mesmo período. Esses dados de *pstS* sugerem que outros fatores abióticos podem interferir na disponibilidade ou assimilação de fósforo pela célula, através de perturbações no estado fisiológico da mesma. Apesar disso, foi mostrado que o gene *pstS* parece responder somente a limitação por fósforo e não a outros fatores de estresse (Harke et al 2012). Alguns outros trabalhos também demonstraram a influência do fósforo na expressão do gene *pstS*. Em um trabalho de expressão gênica no mar Báltico, no final de uma floração, onde os nutrientes já estão escassos, a influência da limitação do fósforo na expressão de *pstS* foi evidente (Jonasson et al 2008). Um aumento na expressão deste gene também foi observado em experimentos de laboratório com *Synechocystis*, como resposta à limitação de fosfato no meio (Suzuki et al 2004). Ainda, várias cepas de *Microcystis aeruginosa* tiveram a expressão do gene *pstS* aumentada quando as células foram expostas a limitação de diferentes fontes de fósforo (Harke et al 2012). Neste último trabalho foi possível observar que este gene é

bastante conservado e, juntamente com alguns outros, pode representar genes de respostas moleculares universais a limitação por P nestas espécies (Harke et al 2012). A habilidade e eficiência de utilização de fósforo pelas cianobactérias, demonstrada pela sua percepção do estresse através da ativação de genes como o *pstS*, por exemplo, que atuam como transportadores de P, pode justificar o sucesso das cianobactérias em ambientes de todo o mundo.

A resposta do gene *ntcA* obedeceu ao exato momento de decaimento de nitrato (limitação) no reservatório de VG. Na Pampulha foi encontrada grande quantidade de amônio em todos os períodos amostrados e esta quantidade não variou de forma significativa dentro deste período. Como *ntcA* responde prontamente a variações deste composto, a expressão deste gene também não se alterou. Estudos de laboratório, com limitação de nitrato mostraram que não somente *ntcA*, mas também outros genes, podem ter sua transcrição aumentada (Ginn et al 2010) em decorrência deste estresse. Nitrogênio também representa um nutriente limitante importante no ambiente aquático. Quando células de cianobactérias são submetidas a concentrações limitantes de nitrogênio, mas com quantidade de carbono adequadas, elas percebem a alta razão C/N e isso determina a expressão de genes que codificam permeases e enzimas requeridas para eficiente assimilação de fontes nitrogênio (Flores e Herrero 2005). Esta ativação requer NtcA (Vega-Palas et al 1990), que se liga a locais específicos nos promotores de genes reguladores ativando sua transcrição (Luque et al 1994). Portanto, estes mecanismos ajudam no processo de aclimatação e sobrevivência das cianobactérias em períodos de estresse relacionados ao nitrogênio.

E ainda, como NtcA é um ativador de transcrição, a alteração deste composto pode levar à atuação do mesmo na regulação de vários outros genes, como foi observado para o gene *mcyB* (Ginn et al 2010) e *mcyD* (Pimentel e Giani 2013 *in prep*), ligados a produção de microcistina. No caso dos estudos realizados aqui, microcistina esteve presente em pequena quantidade e, portanto esta relação não foi possível de ser obtida.

Alfonso e colaboradores (2001) estudaram o papel do estado redox celular na regulação da expressão de *ntcA*. Seus resultados mostraram que luz e nitrogênio controlam o acúmulo de transcritos *ntcA*. Porém eles discutiram que luz, pode ter um efeito indireto no aumento destes transcritos, atuando diretamente na transcrição de outros genes (ligados a fotossíntese) que estimulam então a transcrição de *ntcA* (Alfonso et al 2001). Entretanto, no nosso trabalho na Pampulha, a transcrição deste gene apenas respondeu a status de nitrogênio e não pareceu estar ligada a outras fontes de estresse. Mas, como há uma enorme complexidade no ambiente, e sinergismo e combinação de vários diferentes fatores, mais estudos ambientais como estes são necessários para compreendermos os efeitos dos fatores ambientais na transcrição deste gene. Vários mecanismos podem levar a uma resposta rápida do gene *ntcA* a mudanças das condições ambientais, ajustando sua expressão com a necessidade de atuação da proteína na célula (Alfonso et al 2001).

Cianobactérias possuem vários mecanismos que as auxiliam na adequação do estresse por ferro e Fur é um elemento chave nesta adequação, pois controla a expressão de vários genes, como os de enzimas que sintetizam sideróforos ou proteínas flodoxinas (Hernández et al 2002). Na Pampulha, *furC* teve sua expressão aumentada no período de estresse (chuva) e se correlacionou

positivamente com todos os outros genes de estresse, com exceção do *ntcA*. A expressão do gene *fur* também pode estar relacionado à percepção do estado redox celular (Nunoshiba et al. 1999), o que foi evidenciado neste trabalho pela sua correlação positiva com a transcrição do gene *per*. Em *Anabaena*, também foi observado que a expressão da proteína Fur é estimulada por ROS (López-Gomollón et al 2009). Além do mais, a correlação positiva entre *furC* e o gene ligado a produção de cianopectolina, encontrada neste trabalho, é bastante interessante. Já foi observado que Fur pode também controlar a produção de metabolitos secundários por cianobactérias (Hernandes et al 2002), e no operon *mcy*, ligado a produção de microcistina, existem regiões ligantes para a proteína Fur (Martin Luna et al 2006).

Contrariamente ao observado na Pampulha, em VG apenas *furN* não respondeu com aumento da expressão no período da chuva. Porém uma correlação positiva deste gene com *ntcA* foi observada. Sabe-se que em cianobactéria, outros genes que também respondem a quantidade de ferro no meio, como *nifJ*, *nblA*, *petH* e *pkn41* and *pkn42*, também são controlados por *ntcA* (Valladares et al.,1999; Luque et al., 2001; Cheng et al., 2006), sugerindo que *ntcA* desempenha um papel chave na coordenação da aquisição de ferro e no metabolismo do nitrogênio. E de acordo com Gommolon et al (2007), a interação das proteínas FurA e NtcA com seus locais de ligação resultam em sinais metabólicos celulares que envolvem a relação C/ N, estado redox, a disponibilidade de ferro e/ ou os níveis de ATP (Gommolon et al 2007). Sendo assim, a relação entre estes dois genes encontrada aqui, pode indicar uma regulação e trabalho conjunto destes dois genes.

Organismos fotossintéticos possuem várias respostas de aclimação para mudanças de intensidade luminosa do ambiente. Usando a tecnologia de microarranjo de DNA, Hihara e colaboradores (2001) observaram uma grande dinâmica de regulação de transcritos de genes conhecidos e desconhecidos, durante a aclimação a baixa e alta luminosidade. E aumento da radiação, que pode representar saturação de luz e corresponde ao momento de estresse observado neste estudo, pode ter levado ao estresse oxidativo nas cianobactérias.  $H_2O_2$  é comumente produzido via reações fotoquímicas cujas concentrações variam de acordo com o aumento da quantidade de luz solar (Palenik et al., 1987; Xue et al., 2005). A produção biológica de  $H_2O_2$  pode refletir um estado redox desbalanceado dentro do cloroplasto e dessa forma, pode servir como uma alerta de estresse celular (Twiner e Trick, 2000; Heet al., 2002; Choo et al., 2004). O aumento da expressão do gene *perM*, observada aqui, no período de estresse pode ser um importante indicativo da presença de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, que refletem este estado redox desbalanceado das células, neste momento de perturbação. Em estudos anteriores com *Synechocystis*, também foi encontrado a transcrição do fator *perR* estando envolvida na resposta ao estresse oxidativo (Kanesaki et al 2007). Dados obtidos a partir da análise de microarranjo de DNA de células tratadas com  $H_2O_2$ , mostraram que a maioria dos genes que respondem ao estresse oxidativo são diretamente ou indiretamente regulados por PerR e TrxA (Li et al 2004). Ainda, muitos dos genes que respondem ao estresse oxidativo, também respondem a outros estresses como alta luminosidade (Hihara et al 2001), mudanças redox (Hihara et al 2001), alta salinidade (Kanesaki et al 2002) e alta osmolaridade (Kanesaki et al 2002).

Condições de estresse generalizadas rompem a homeostase celular levando ao aumento da produção de ROS (Li et al 2004). É provável que a necessidade para coordenar a expressão gênica efetivamente nas mudanças das condições ambientais levou para a evolução de um conjunto de caminhos transdutores de sinais que percebe e responde a variadas condições ambientais. Sendo assim, é possível que ROS possam atuar como moléculas sinalizadoras para mediar respostas a estas condições de estresse. Não se sabe ao certo ainda, mas é possível que ROS atue como um sinalizador individual ou como parte de uma resposta sistêmica em cianobactérias. É provável que o equilíbrio redox das células possa controlar eventos celulares através de interações de  $H_2O_2$  com moléculas sensores de redox, como glutathiona, tioredoxinas e peroxiredoxinas. Ainda, os grandes grupos de genes relacionados a estresses peroxidativos provavelmente fazem parte de uma regulação geral de estresse (Li et al 2004).

Nem sempre as células respondem a mudanças no ambiente, somente quando estas excedem um nível crítico para a célula. Entretanto, sistemas de sensores são sempre necessários para a célula reconhecer qualquer mudança mínima no ambiente e produzir respostas adequadas na adaptação a essas mudanças. (Zorina et al 2011)

### **4.3 Cianobactérias e Cianopeptídeos**

O papel das cianobactérias enquanto composição de espécies e seu impacto no ambiente mudam significativamente em relação ao estado trófico do corpo d'água (Weisse 1994). Enquanto as picocianobactérias dominaram o reservatório de VG, as espécies filamentosas foram predominantes na

Pampulha, seguidas de coloniais da ordem Chroococcales. Espécies coloniais e filamentosas parecem dominar e formar florações em lagos eutróficos e hipereutróficos (Paerl 1988). A diversidade taxonômica das picocianobactérias foi considerada menor do que os outros grupos de cianobactérias (Rippka 1988), já que poucos gêneros eram conhecidos, mas estudos recentes têm demonstrado a existência de uma grande diversidade no grupo (Callieri et al 2013). Florações de picocianobactérias, excedendo  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> já foram relatadas em lagos oligo-mesotróficos (Maeda et al 1992), mas em VG, o valor máximo de cel.mL<sup>-1</sup> encontrado foi de  $10^4$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Dentre os genes de cianopeptídeos estudados na Pampulha, somente o gene ligado a produção de cianopeptolina teve um aumento de sua expressão no período chuvoso e pareceu estar em maior quantidade em relação aos outros peptídeos estudados. O gene *cnp* se comportou de forma similar aos genes ligados ao estresse. Isso pode representar um indicio de que este peptídeo pode também estar relacionado a processos de aclimatação das cianobactérias ao estresse. Esta função de resposta ligada a estresse já foi sugerida para o peptídeo microcistina (Alexova et al 2011). Tonk et al (2008) sugeriram que a regulação transcricional de conjuntos gênicos específicos e a disponibilidade intracelular de diferentes substratos para a síntese de peptídeos resultam em diferentes padrões de produção de toxinas sob diferentes condições ambientais. Estes mesmos autores observaram que há uma dinâmica compensatória de diferentes variantes de peptídeos dentro das mesmas classes de peptídeos, sugerindo que a regulação transcricional e a quantidade celular de diferentes substratos têm um maior impacto na produção de toxina.

A relação do conjunto gênico relacionados a produção de oligopeptídeos ainda é desconhecida mas parecem funcionar de forma independente (Fujii et al 2002). Já foi relatado que bloqueio de genes *mcy* não alterou a produção de cianopeptolína (Dittmann et al 1997). Isto sugere que a produção de cianopeptolinas pode responder de forma independente a fatores ambientais que a produção de microcistina. A dinâmica de produção destes e de outros peptídeos merece mais atenção em estudos ambientais futuros com cianobactérias.

## **5.0 Conclusões**

Apesar das diferenças observadas entre os ambientes estudados, as cianobactérias se comportaram, de maneira geral, de forma semelhante em ambos, com relação às suas respostas ao estresse. Temperatura, luz e pluviosidade foram os principais fatores abióticos causadores de estresse e as respostas de expressão gênica foram muito sensíveis, pois permitiram uma avaliação de como as cianobactérias convivem e se destacam em ambientes com tantas perturbações, como as encontradas nos reservatórios avaliados.

O entendimento de processos ecofisiológicos em cianobactéria, ligados a percepção de agentes estressantes e a relação dos mesmos com a produção de cianopeptídeos ou cianotoxinas pode ser bastante interessante do ponto de vista científico e também sob a ótica de monitoramento do risco de contaminação dos corpos d'água. Uma análise compreensiva da produção de toxinas por cianobactérias pode também revelar condições que favoreçam ou

não a floração e dominância destes organismos no ambiente aquático e desta forma auxiliar procedimentos de prevenção e controle de florações tóxicas.

### **Agradecimentos**

Agradecemos as equipes do laboratório de Ficologia/ICB/UFMG e de Hidráulica/Engenharia/ UFMG pela coleta das amostras nos reservatórios e pelas análises físico-químicas, de fitoplâncton e de toxinas. A Cemig, Capes, CNPQ e Fapemig pelo financiamento do trabalho.

## 6.0 Referências

- Agostinho, A. A., Vazzoler, A. E. A. M., Thomaz, S. M., Tundisi, J. G., Bicudo, C. E. M., & Matsumura-Tundisi, T. (1995). Limnology in Brazil. *Limnology in Brazil*.
- Aiba, H., & Mizuno, T. (1994). A novel gene whose expression is regulated by the response-regulator, SphR, in response to phosphate limitation in *Synechococcus* species PCC7942. *Molecular microbiology*, 13(1), 25-34.
- Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B. C., & Neilan, B. A. (2011). Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology*, 13(4), 1064-1077.
- Alfonso, M., Perewoska, I., & Kirilovsky, D. (2001). Redox control of ntcA gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the levels of the NtcA protein. *Plant physiology*, 125(2), 969-981.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215-237.
- APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association Publications, Washington DC. Ed. 19<sup>th</sup>, 1995.
- Bispo, P. C., & Oliveira, L. G. (1998). Distribuição espacial de insetos aquáticos (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) em córregos de cerrado do Parque Ecológico de Goiânia, Estado de Goiás. *Oecologia Brasiliensis*, 5(1), 12.
- Bispo, P. C., Oliveira, L. G., Bini, L. M., & Sousa, K. G. (2006). Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera assemblages from riffles in mountain streams of Central Brazil: environmental factors influencing the distribution and abundance of immatures. *Brazilian Journal of Biology*, 66(2B), 611-622.
- Callieri, C., Coci, M., Corno, G., Macek, M., Modenutti, B., Balseiro, E., Bertoni, R. (2013) Phylogenetic diversity of non marine picocyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 85:293-301.
- Calijuri, M. C., Dos Santos, A. C. A., & Jati, S. (2002). Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP—Brazil). *Journal of Plankton Research*, 24(7), 617-634.
- Cheng, Yong, et al. "A pair of iron-responsive genes encoding protein kinases with a Ser/Thr kinase domain and a His kinase domain are regulated by NtcA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." *Journal of bacteriology* 188.13 (2006): 4822-4829.

- Choi, H., Oh, S. K., Yih, W., Chin, J., Kang, H., & Rho, J. R. (2008). Cyanopeptoline CB071: A Cyclic Depsipeptide Isolated from the Freshwater Cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(8), 1191-1193.
- Choo, K. S., Snoeijs, P., & Pedersén, M. (2004). Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahneriana*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 298(1), 111-123.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids. Res.* 16 (22): 10881-10890.
- Degerholm, J., Gundersen, K., Bergman, B., & Söderbäck, E. (2006). Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS microbiology ecology*, 58(3), 323-332.
- Dittmann, E., Neilan, B. A., Erhard, M., Von Döhren, H., & Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology*, 26(4), 779-787.
- Esteves, F., & Meirelles-Pereira, F. (2011). Eutrofização artificial. *Fundamentos de limnologia*. 3ª ed., Rio de Janeiro, Editora Interciência. [Links], 625-656.
- Figueredo, C. C., & Giani, A. (2001). Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 445(1-3), 165-174.
- Flecker, A. S., & Feifarek, B. (1994). Disturbance and the temporal variability of invertebrate assemblages in two Andean streams. *Freshwater Biology*, 31(2), 131-142.
- Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 164-167.
- Fujii, K., Sivonen, K., Nakano, T., & Harada, K. I. (2002). Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. *Tetrahedron*, 58(34), 6863-6871.
- Giani, A. (1994). Limnology in Pampulha Reservoir: some general observations with emphasis on the phytoplankton community. *Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies*, 151-163.

Ginn, H. P., Pearson, L. A., & Neilan, B. A. (2009). Hepatotoxin biosynthesis and regulation in cyanobacteria—the putative involvement of nitrogen and iron homeostasis mechanisms. *Chiang Mai J. Sci*, 36(2), 200-223.

Ginn, H. P., Pearson, L. A., & Neilan, B. A. (2010). NtcA from *Microcystisaeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4362-4368.

Greco, M. K. B. (2002). Balanço de massa de fósforo, evolução da eutrofização eo crescimento de macrófitas flutuantes no reservatório de Volta Grande (MG/SP). *Balanço de massa de fósforo, evolução da eutrofização eo crescimento de macrófitas flutuantes no reservatório de Volta Grande (MG/SP)*.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (Vol. 135, p. 729). Oxford: Oxford universitypress.

Hammond, J. P., Bennett, M. J., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Eastwood, D. C., May, S. T., Rahn, C., Swarup, R., Woolaway, K. E., and White, P. J. (2003) *Plant Physiol.* 132, 578–596

Harke, M. J., Berry, D. L., Ammerman, J. W., & Gobler, C. J. (2012). Molecular response of the bloom-forming cyanobacterium, *Microcystisaeruginosa*, to phosphorus limitation. *Microbial ecology*, 63(1), 188-198.

He, Y. Y., & Häder, D. P. (2002). Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1), 73-80.

Hernandez, J. A., Artieda, M., Peleato, M. L., Fillat, M. F., & Bes, M. T. (2002, January). Iron stress and genetic response in cyanobacteria: fur genes from *Synechococcus* PCC 7942 and *Anabaena* PCC 7120. In *Annales de limnologie* (Vol. 38, No. 1, pp. 3-11). Paris: Masson.

Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 411-425.

Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., & Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *The Plant Cell Online*, 13(4), 793-806.

Hirani, T. A., Suzuki, I., Murata, N., Hayashi, H., & Eaton-Rye, J. J. (2001). Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant molecular biology*, 45(2), 133-144.

Hosoya-Matsuda, N., Motohashi, K., Yoshimura, H., Nozaki, A., Inoue, K., Ohmori, M., & Hisabori, T. (2005). Anti-oxidative Stress System in

Cyanobacteria significance of type ii peroxiredoxin and the role of 1-cys peroxiredoxin in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 840-846.

Hulett, F. M. (2002). The *pho* regulon. *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. ASM Press, Washington, DC, 193-201.

Ishida, K., Christiansen, G., Yoshida, W. Y., Kurmayer, R., Welker, M., Valls, N., ... & Dittmann, E. (2007). Biosynthesis and structure of aeruginoside 126A and 126B, cyanobacterial peptide glycosides bearing a 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chemistry & biology*, 14(5), 565-576.

JIANG, F., MANNERVIK, B., & BERGMAN, B. (1997). Evidence for redox regulation of the transcription factor NtcA, acting both as an activator and a repressor, in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Biochem. J*, 327, 513-517.

Jonasson, S., Vintila, S., Sivonen, K., & El-Shehawy, R. (2008). Expression of the nodularinsynthetase genes in the Baltic Sea bloom-former cyanobacterium *Nodulariaspumigena* strain AV1. *FEMS microbiology ecology*, 65(1), 31-39.

Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K., & Murata, N. (2002). Salt Stress and Hyperosmotic Stress Regulate the Expression of Different Sets of Genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(1), 339-348.

Kanesaki, Y., Yamamoto, H., Paithoonrangsarid, K., Shumskaya, M., Suzuki, I., Hayashi, H., & Murata, N. (2007). Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Plant Journal*, 49(2), 313-324.

Kodani, S., Ishida, K., & Murakami, M. (1998). Aeruginosin 103-A, a thrombin inhibitor from the cyanobacterium *Microcystis viridis*. *Journal of natural products*, 61(8), 1046-1048.

Kuniyoshi, T. M., Gonzalez, A., Lopez-Gomollon, S., Valladares, A., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2011). 2-oxoglutarate enhances NtcA binding activity to promoter regions of the microcystin synthesis gene cluster. *FEBS letters*, 585(24), 3921-3926.

Kustka, A., Carpenter, E. J., & Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2002). Iron and marine nitrogen fixation: progress and future directions. *Research in Microbiology*, 153(5), 255-262.

- Laurent, S., Chen, H., Bédu, S., Ziarelli, F., Peng, L., & Zhang, C. C. (2005). Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9907-9912.
- Li, H., Singh, A. K., McIntyre, L. M., & Sherman, L. A. (2004). Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerRregulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of bacteriology*, 186(11), 3331-3345.
- Lombardo, M., Pinto, F. C. R., Vieira, J. M. S., Honda, R. Y., Pimenta, A., Bemquerer, M. P., ... & Kiyota, S. (2006). Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria): A Brazilian toxic cyanobacterium. *Toxicon*, 47(5), 560-566.
- López-Gomollón, S., Hernández, J. A., Pellicer, S., Angarica, V. E., Peleato, M. L., & Fillat, M. F. (2007). Cross-talk Between Iron and Nitrogen Regulatory Networks in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: Identification of Overlapping Genes in FurA and NtcARegulons. *Journal of molecular biology*, 374(1), 267-281.
- Lopez-Gomollon, S., Sevilla, E., Bes, M., Peleato, M., & Fillat, M. (2009). New insights into the role of Fur proteins: FurB (AlI2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem. J*, 418, 201-207.
- Lukač, M., & Aegerter, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31(3), 293-305.
- Lund, J. W. G., Kipling, C., & Le Cren, E. D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11(2), 143-170.
- Luque, I., & Forchhammer, K. (2008). Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, 335-382.
- Luque, I., Flores, E., & Herrero, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO journal*, 13(12), 2862.
- Luque, I., Flores, E., & Herrero, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO journal*, 13(12), 2862.
- Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A., & Houmard, J. (2001). Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the

stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Molecular microbiology*, 41(4), 937-947.

Maeda, H., Kawai, A., & Tilzer, M. M. (1992). The water bloom of cyanobacterial picoplankton in Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia*, 248(2), 93-103.

Markert, B., & Geller, W. (1994). Multielement analysis in tropical lakes. *GIANI, A., VON SPERLING, E., and PINTO COELHO.*

Martin-Luna, B., Sevilla, E., Gonzalez, A., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2011). Expression of *fur* and its antisense  $\alpha$ -*fur* from *Microcystis aeruginosa* PCC7806 as response to light and oxidative stress. *Journal of plant physiology*, 168(18), 2244-2250.

Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2006). *Fur* from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*, 67(9), 876-881.

Matsuda, H., Okino, T., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1996). Aeruginosins 102-A and B, new thrombin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis viridis* (NIES-102). *Tetrahedron*, 52(46), 14501-14506.

Mota, H. R. (2006). Análise da influência da geoquímica do ambiente e das características do substrato na estruturação da população de *Corbicula fluminea*, MULLER 1974, (Mollusca, Bivalvia) no reservatório da usina elétrica de Volta Grande-MG/SP.

Murakami, M., Shin, H. J., Matsuda, H., Ishida, K., & Yamaguchi, K. (1997). A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry*, 44(3), 449-452.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2012). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*.

Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A., & Murata, N. (2001). Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *The EMBO journal*, 20(20), 5587-5594.

Nunoshiba, T., Obata, F., Boss, A. C., Oikawa, S., Mori, T., Kawanishi, S., & Yamamoto, K. (1999). Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34832-34837.

Ogawa, N., DeRisi, J., & Brown, P. O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces*

cerevisiae revealed by genomic expression analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4309-4321.

Paerl, H. W., & Sandgren, C. D. (1988). Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, 261-315.

Palenik, B., Zafiriou, O. C., & Morel, F. M. M. (1987). Hydrogen peroxide production by a marine phytoplankton. *Limnology and oceanography*, 32(6), 1365-1369.

Pimentel, J. S., & Giani, A. (2013). Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. *Journal of Applied Phycology*, 1-10.

Pinto-Coelho, R. M. (1994). Limnological perspectives for the control of eutrophication in large tropical reservoirs. *Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais*. Belo Horizonte, 11-26.

Ploutno, A., Shoshan, M., & Carmeli, S. (2002). Three Novel Protease Inhibitors from a Natural Bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of natural products*, 65(7), 973-978.

Qian, H., Yu, S., Sun, Z., Xie, X., Liu, W., & Fu, Z. (2010). Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved in photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 99(3), 405-412.

Reynolds, C. S. (1984). Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biology*, 14(2), 111-142.

Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.

Ross, C., Santiago-Vázquez, L., & Paul, V. (2006). Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 78(1), 66-73.

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

Shan, Y., McKelvie, I. D., & Hart, B. T. (1994). Determination of alkaline phosphatase-hydrolyzable phosphorus in natural water systems by enzymatic flow injection. *Limnology and oceanography*, 39(8), 1993-2000.

- Sharkey, F. H., Banat, I. M., & Marchant, R. (2004). Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 3795-3806.
- 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(9), 2658-2666.
- Somerville, G., Mikoryak, C. A., & Reitzer, L. (1999). Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during exotoxin A synthesis: glutamate, iron limitation, and aconitase activity. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1072-1078.
- Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M. M., Liu, Y., & Kaya, K. (1998). Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological research*, 46(s2), 19-23.
- Straus, N.A. (1994) Iron deprivation: physiology and gene regulation. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 731–750.
- Suzuki, S., Ferjani, A., Suzuki, I., & Murata, N. (2004). The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13234-13240.
- Tichy, M., & Vermaas, W. (1999). In Vivo Role of Catalase-Peroxidase in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of bacteriology*, 181(6), 1875-1882.
- Twiner, M. J., & Trick, C. G. (2000). Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. *Journal of Plankton Research*, 22(10), 1961-1975.
- Uthermohl, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. (1958). *Mit. Ins. Ver. Limnol.*, 9, 1-38.
- Valladares, A., Muro-Pastor, A. M., Fillat, M. F., Herrero, A., & Flores, E. (1999). Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *petH* gene encoding ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS letters*, 449(2), 159-164.
- Van der Westhuizen, A. J., & Eloff, J. N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 163(1), 55-59.

Vega-Palas, M. A., Madueño, F., Herrero, A., & Flores, E. (1990). Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of bacteriology*, 172(2), 643-647.

Wanner, B. L. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: *Cellular and Molecular Biology*, 2nd Ed., pp. 1357–1381, ASM Press, Washington, D. C.

Weisse, T. (1994). Structure of microbial food webs in relation to the trophic status of lakes and fish grazing pressure: a key role of cyanobacteria. *RM, Pinto-Coelho, A. Giani & E. Von Sperling, Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies*, 55-70. Welker & von Döhren 2006

Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F., & Deng, X. W. (2003). Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology*, 132(3), 1260-1271.

Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L., & Wang, X. (2005). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(2), 79-89.

Yamamoto, H., Miyake, C., Dietz, K. J., Tomizawa, K. I., Murata, N., & Yokota, A. (1999). Thioredoxin peroxidase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS letters*, 447(2), 269-273.

Zilliges, Y., Kehr, J. C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., ... & Dittmann, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS One*, 6(3), e17615.

Zorina, A. A., Mironov, K. S., Stepanchenko, N. S., Sinetova, M. A., Koroban, N. V., Zinchenko, V. V., ... & Los, D. A. (2011). Regulation systems for stress responses in cyanobacteria. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(5), 749-767.

### CAPÍTULO 3:

## Diversidade de genótipos de cianopeptídeos no ambiente detectada por meio de PCR



## Resumo

As cianobactérias produzem uma alta quantidade de produtos bioativos, com propriedades e aplicações diversas, além de substâncias tóxicas. Muitos dos cianopeptídeos ainda são pouco estudados e muitos ainda desconhecidos. Além do mais, pouco se sabe sobre a real função destes compostos para as cianobactérias. No presente estudo nós avaliamos a presença de alguns cianopeptídeos em dois reservatórios em Minas Gerais por meio da técnica de PCR. Ainda, através da técnica de PCR quantitativa, nos medimos a quantidade de genótipos produtores de microcistina nestes ambientes. Foram coletadas oito amostras no reservatório da Pampulha e doze em Volta Grande. Nossos resultados mostraram que no ambiente mais eutrofizado (Pampulha) mais cianopeptídeos foram detectados com a nossa técnica, provavelmente associado ao fato também deste ambiente ser mais intensamente povoado por cianobactérias relatadas como produtoras destes compostos. Alguns genes de cianopeptídeos, como aeruginosina e cianopeptolina foram encontrados sempre juntos e podem estar presentes no mesmo genoma. Apesar de encontrarmos genótipos tóxicos em quase todos os meses e pontos avaliados, em ambos os reservatórios, não encontramos uma quantidade alta dos mesmos. Microcistina, portanto, não foi a cianotoxina dominante nestes ambientes, apesar de espécies como *Planktothrix*, por exemplo, terem sido encontradas em grande quantidade e serem freqüentemente relatadas como produtoras de microcistina. É possível que outro grupo de cianotoxina esteja presente no reservatório da Pampulha. Mais estudos são necessários para garantir o conhecimento toxicológico e químico destes ambientes.

## **Abstract**

Cyanobacteria produce a high quantity of bioactive compounds with different properties and applications as well as toxic substances. Many of cyanopeptides are still poorly studied and many still unknown. Moreover, little is known about the actual function of these compounds for cyanobacteria. In this study we evaluated by PCR the presence of some cyanopeptides in two reservoirs in Minas Gerais. Further, through the technique of quantitative PCR, we measured the amount of microcystin producing genotypes in these environments. Eight samples in the Pampulha reservoir and twelve in Volta Grande were collect for this study. Our results showed that in the most eutrophic environment (Pampulha) more cyanopeptides were detected by our technique, probably associated to the fact that this environment was more densely populated by cyanobacteria reported as able to produce these compounds. Cyanopeptolin and aeruginosin genes were always found together and may be present in the same genome. Despite finding toxic genotypes in almost every month and points assessed in both reservoirs, we did not find a high amount of them. Microcystin, therefore was not the dominant cyanotoxin in these environments, although species such as *Planktothrix*, for example, were present at in large numbers and are often reported as microcystin producer. It is possible that another cyanotoxin is present Pampulha reservoir. More studies are needed to ensure the chemical and toxicological knowledge of these environments.

## 1.0 Introdução

As cianobactérias produzem uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo substâncias com atividades anticancerígenas e antivirais, protetoras contra UV, inibidores específicos de enzimas e potentes hepatotoxinas e neurotoxinas. Várias toxinas de cianobactérias são extensivamente estudadas, particularmente microcistinas, nodularinas e anatoxinas (Tonk et al 2008). Porém, nas duas últimas décadas muitos outros compostos bioativos vêm sendo identificados, e mostram que as cianobactérias são fontes potenciais de produtos naturais e com potenciais ações terapêuticas, sendo estas com ação citotóxica, antifúngica, antibacteriana e antiviral (Burja *et al.* 2001), além de atividade anticancerígena (Gerwick *et al.* 1994, Wrasidlo *et al.* 2008) e anti-inflamatória (Villa *et al.* 2010).

Dentre os compostos produzidos por cianobactérias estão os cianopeptídeos como aeruginosina (Murakami et al., 1994), microargininas (Okino et al., 1993), cianopeptolinas (Martin et al., 1993), anabaenopeptolinas (Rouhiainen et al., 2000), microviridinas (Ishitsuka et al., 1990), anabaenopeptinas (Harada et al., 1995), e nostoficinas (Fujii et al., 1999). Esses peptídeos são freqüentemente encontrados nas florações de cianobactérias, juntamente com outros inúmeros peptídeos ainda não identificados (Fastner et al., 2001; Welker et al., 2006). Uma melhor compreensão a cerca da produção e toxicidade destes peptídeos é importante para se propor e planejar controles ambientais da produção destes compostos e para informar sobre o risco de exposição a estes cianopetídeos no ambiente (Tonk et al 2008).

A grande variabilidade de peptídeos produzidos por cianobactérias está ligada ao processo de produção dos mesmos. Muitos destes oligopeptídeos são sintetizados por um complexo enzimático multifuncional, que consiste de módulos de peptídeos sintetases não ribossômicos (NRPS) e sintase de policetônicos (PKS) (Borner e Dittmann, 2005; Welker e von Dohren, 2006). A relação do conjunto gênico destes oligopeptídeos ainda é desconhecida, mas parecem funcionar de forma independente (Fujii et al 2002).

Geralmente, a toxicidade e produção de cianopeptídeos não podem ser atribuídas à determinada espécie; sendo assim, essa é uma característica intraespecífica e não pode ser identificada através de metodologias tradicionais de microscopia. Para tanto, genes ligados a produção de cianotoxinas e a cianopeptídeos tem sido utilizados como marcadores moleculares para identificação das cepas produtoras destes compostos. Trabalhos de identificação e quantificação de genes relacionados à microcistinas são mais comuns (NISHIZAWA *et al.*, 1999; NEILAN *et al.*, 1999; Tillett *et al.*, 2001; KURMAYER *et al.*, 2002; VIA-ORDORIKA *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2005; RINTA-KANTO *et al.*, 2005; FURUKAWA *et al.*, 2006; SAKER *et al.*, 2007; RANTALA *et al.*, 2008), mas a observação e identificação de genes de outros cianopeptídeos também são importantes em estudos ambientais.

As microcistinas são pequenos peptídeos contendo aminoácidos incomuns, e são produzidas por uma alta diversidade de cianobactérias (Carmichael, 1996; Hisbergues *et al.*, 2003). Os genes *mcy* participam da biossíntese da microcistina e são utilizados como marcadores moleculares em estudos ambientais.

Aeruginosina (gene *aer*), Microviridina (gene *mdn*), Anabaenopeptolina (gene *apt*) e Cianopeptolina (genes *oci*, *mcn* ou *apd*) são oligonucleotídeos bioativos produzidos por uma grande diversidade de cepas formadoras de floração. Os agrupamentos gênicos envolvidos na produção destes compostos vêm sendo descritos, possibilitando o uso também destes genes como marcadores.

Aeruginosina foi descrito para quatro linhagens de cianobactérias e os genes denominados de *aerA-N*. No entanto, a presença destes genes, seu tamanho, bem como sua distribuição dentro do agrupamento, podem variar de acordo com a linhagem (Kaneko *et al.* 2007, Frangeul *et al.* 2008, Ishida *et al.* 2009). Microviridina é um peptídeo altamente variável e características do agrupamento de genes envolvidos na produção de microviridina (*mdn* A-E) variam de acordo com a espécie (Ziemert *et al.* 2008). As cianopeptolinas tiveram os agrupamentos gênicos descritos para *Microcystis wesenbergii* e *M. aeruginosa* (genes *mcn* A-F) (Kaneko *et al.* 2007, Tooming-Klunderud *et al.* 2007), *Anabaena* (genes *apd* A-F) (Rouhiainen *et al.* 2000) e *Planktothrix agardhii* (genes *oci* A-D) (Rouge *et al.* 2007)

No presente trabalho, a presença de cianopeptídeos no ambiente foi avaliada através da PCR convencional, para identificação da dinâmica e diversidade química e/ou toxicológica destes ambientes. Adicionalmente, a tecnologia da PCR em tempo real foi utilizada para o estudo quantitativo de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistina nos reservatórios, para avaliação do risco de florações tóxicas e também para avaliar a influência de fatores ambientais na presença e quantidade de genótipos tóxicos no ambiente. Aplicações rápidas e sensíveis de métodos moleculares (PCR), detectando

genes biossintéticos de cianopeptídeos, podem ajudar a entender a dinâmica e comportamento de genótipos produtores ou não destes compostos no ambiente e se esta característica confere alguma vantagem ecológica para as cepas produtoras.

## **2.0 Materiais e Métodos**

Foram avaliados dois diferentes ambientes, descritos anteriormente na tese no tópico área de estudo. O período de estudo foi o mesmo descrito para o capítulo 2: oito amostras para o reservatório da Pampulha (set/12 a fev/13) e doze amostras para o reservatório de Volta Grande (ago/11 a nov/11).

### **2.1 Análises físico-químicas e biológicas**

Vários parâmetros ambientais foram medidos e posteriormente avaliados quanto a sua influência na produção de microcistina e/ou quantidade de genótipos tóxicos nos ambientes estudados.

Diretamente no campo, foram medidos profundidade do disco de Secchi (DS) para cálculo da ZE, e oxigênio, pH, temperatura e condutividade com auxílio de uma sonda multiparâmetros (YSI 556). Em VG estes dados foram obtidos de 0.5 em 0.5 m até a profundidade de 2 m e depois disso em intervalos de 1 m até o fundo. Os dados de temperatura utilizados nas análises deste trabalho são resultados da média das temperaturas de toda ZE. Já na Pampulha, os dados obtidos com a sonda foram coletados somente na profundidade de 0.5 m, já que a profundidade da lagoa é baixa e como ali existe muito material em suspensão, o valor da ZE também é baixo. As análises de nutrientes foram

realizadas por métodos espectrofotométricos como descrito em APHA (1995). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Amostras de fitoplâncton foram preservadas com lugol-acético e a quantificação de cianobactérias foi realizada em câmaras de sedimentação usando microscópio invertido (Zeiss), no aumento de 400 vezes, pela técnica de Utermöhl (1958). Cem células ou colônias da espécie dominante foram contadas e para melhor precisão, espécies subdominantes foram usadas na contagem ao invés da dominante quando havia uma abundância e elevada desta última. Essa metodologia permite uma precisão de  $\pm 20\%$  para um limite de confiança de 95% (Lund et al. 1958). Espécies potencialmente produtoras de microcistina (“espécies potencialmente tóxicas”) foram aqui intituladas assim, devido a relatos da literatura para encontro desta toxina nestes gêneros.

Análises de microcistina foram realizadas pelo método imunoenzimático ELISA, através de um kit específico (Abraxis, ADDA Elisa) para a detecção de microcistina. Os procedimentos para esta análise seguiram as recomendações do fabricante. Nesta reação colorimétrica podemos observar que a intensidade da coloração da reação é inversamente proporcional à concentração de microcistina na amostra. A leitura das amostras foi realizada em um leitor de ELISA (Bio-Tek, model Elx 800) a 405 nm.

## **2.2 Análises Moleculares**

### **2.2.1 Extração de ácidos nucléicos**

Cerca de 20 mL e 500 mL de amostra ambiental foram filtrados, em filtros de membrana de fibra de vidro (GF microfiltro 47 mm), para Pampulha e VG, respectivamente, e estocadas a - 20°C, até o momento das análises.

A extração de DNA dos filtros contendo as amostras coletadas foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por Kurmayer et al (2003), com algumas modificações. Para o procedimento de lise celular, foi utilizado um tampão contendo sucrose, proteinase K e lisozima e para a purificação dos ácidos nucléicos foi utilizado fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. A ressuspensão do DNA foi realizada com etanol absoluto e a limpeza do mesmo foi feita com etanol 70%. O extrato obtido foi quantificado em Nanodrop (espectrofotômetro) a 260 e 280 nm, e sua qualidade foi verificada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

### **2.2.2 PCR convencional e PCR quantitativa**

Para realização das PCRs, alguns dos oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados (tabela 1) foram desenhados neste trabalho e outros obtidos na literatura. Para o desenho dos iniciadores, seqüências de alguns gêneros de cianobactérias depositadas no banco de dados genéticos (GenBank, NCBI) foram agrupadas (MultAlign Tool - Corpet 1988) e regiões com alta similaridade foram identificadas e escolhidas. Estes oligonucleotídeos foram testados, através de PCR convencional, em diferentes linhagens do banco de cultivo do laboratório de Ficologia da UFMG

A PCR convencional foi realizada com o DNA genômico das amostras ambientais ou de cultivo, sendo este último usado somente para teste dos primers. Todas as reações foram realizadas em um termociclador (MyCycler, Bio-Rad) com volume total final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo: 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de DNTP, 1.0 U de Taq polymerase, 0.5  $\mu\text{L}$  (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) de cada iniciador e 1  $\mu\text{L}$  de DNA diluído (no mínimo 20X). O programa de ciclagem consistiu em um pré-aquecimento inicial de 94°C por 3', seguido por 35 ciclos de 94°C a 30", 52°C a 30" e 72°C a 40" e finalmente 72°C a 2'. A amplificação dos produtos de PCR foi visualizada em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo, junto com um padrão de peso molecular de 50 pb ou 100 pb (Fermentas).

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada para quantificação absoluta do DNA de genótipos produtores de microcistina (*mcyD*) do ambiente, de acordo com o descrito em Pimentel e Giani (2013). As reações de qPCR foram feitas usando o sistema SetpOne (Applied Biosystems) com 1  $\mu\text{l}$  de DNA (diluído) ou amostras de cDNA (sem diluição), 0.3  $\mu\text{l}$  de cada iniciador (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{l}$  de Power SYBR Green I (Applied Biosystems) e água ultra-pura estéril, em um volume final de 10  $\mu\text{l}$ . As reações foram realizadas em duplicata e em caso de duvida uma terceira reação era feita. Todas as reações de qPCR foram submetidas às ciclagens recomendados pelo fabricante.

As análises dos dados foram realizadas através do programa StepOne™ Software, version 2.0. Genótipos *mcyD* das amostras de campo foram quantificados usando-se o numero CT obtido na qPCR para o calculo em uma equação de regressão obtida a partir de uma curva padrão (Pimentel e Giani, 2013).

Análises da curva de dissociação foram realizadas em todas as reações de qPCR para determinar a especificidade dos produtos amplificados. Esta análise foi realizada no final de cada reação, por aumento gradual na temperatura de 70°C a 95°C, por 0.1°C.s<sup>-1</sup>. Dados da intensidade de fluorescência foram continuamente gerados e convertidos em picos de dissociação, usando-se o programa LightCycler software.

### **2.3 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o modelo linear generalizado (GLM) no pacote estatístico “R software”. Verificou-se a existência de correlação entre os dados ambientais e moleculares (MIC e mcyD) e a significância destes dados. O nível aceito de significância dos dados foi de  $p < 0.05$ .

**Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo**

Nome	Sequência 5'-3'	Peptídeo Alvo	Cianobactéria	Tamanho	Origem
aerA_F	ACCCAGAACGGAAGCTGAACG	Aeruginosina A	<i>Microcystis, Anabaena e Planktothrix</i>	199 bp	Neste estudo
aerA_R	ACTGGCAACGGTGGGGTATT				
ANP A F	CCGGACTGTCGGTTGGTTTA	Anabaenopeptolina	<i>Anabaena e Planktothrix</i>	108 bp	Neste estudo
ANP A R	TAGGCGACGCAGTTGTTCTT				
ANP P F	ACCACCCTATTTCCAGTGCG	Anabaenopeptolina	<i>Plankthotrix</i>	99 bp	Neste estudo
ANP P R	CACGATTGGGTAAACGACGC				
CNP F	GCTAGAAATTCACAGCCATCA	Cianopeptolina	<i>Plankthotrix e Microcystis</i>	140 bp	Neste estudo
CNP R	ACCCCCATTGACCAACCATC				
MDN M F	CAGGGGTTATTGCAGGTGGT	Microviridina	<i>Microcystis</i>	180 bp	Neste estudo
MDN M R	TAGGCTCAGGGGAAGGAGAC				
MDN P F	AGTCAAGGCGAGTCTGAACG	Microviridina	<i>Plankthotrix</i>	161 bp	Neste estudo
MDN P R	GTGACTCCACCCTCAACAGG				
qmcyD F	GCATCTTCTAAAGAAAAGACTCC	Microcistina	<i>Microcystis, Anabaena e Planktothrix</i>	103 bp	Pimentel & Giani 2013
qmcyD R	AAATTATGGCAATCTTGGGGAATA				

### 3.0 Resultados e Discussão

#### 3.1 Volta Grande

As cianobactérias, no reservatório de Volta Grande (VG), são representadas majoritariamente por picocianobactérias e espécies potencialmente tóxicas estiveram presentes somente em alguns meses e pontos estudados (fig.1). Das células potencialmente produtoras de microcistina observadas, *Microcystis* foram dominantes, mas também observamos a ocorrência de *Planktothrix* e *Anabaena* (ou *Dolichospermum*) no mês de outubro, nos pontos 1 e 2, respectivamente. Estudos prévios sugeriram que a presença de *Microcystis* produtora de microcistina está associada a altas concentrações de fosfato (Rapala e Sivonen 1998, Downing et al. 2001, Giani et al. 2005). No presente trabalho, encontramos uma correlação positiva ( $r^2=0.68$ ,  $p<0.01$ , fig. 2) entre genótipos tóxicos *mcyD* e fosfato, confirmando a importância deste nutriente para a dinâmica entre genótipos tóxicos e não tóxicos neste ambiente oligotrófico. Entre todos os parâmetros ambientais avaliados, fósforo total foi o único que pareceu influenciar a presença de genótipos tóxicos no ambiente.

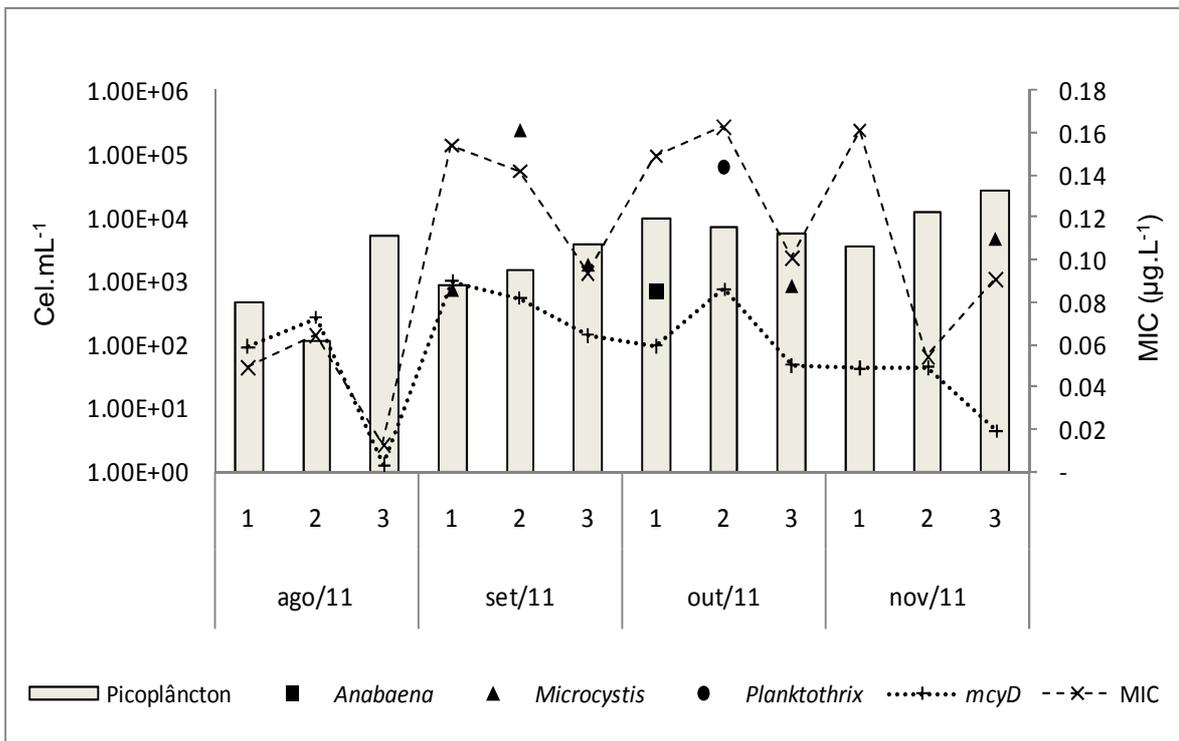
Apesar da baixa quantidade de espécies tóxicas em VG, genótipos *mcyD* e microcistina (MIC) foram encontrados, mesmo que em pequena quantidade, na maioria dos meses e pontos amostrados (fig. 1). Porém, uma correlação significativa entre estes dados não foi observada. O ponto 3 apresentou menor toxicidade do que os outros e os pontos 1 e 2 foram similares, com exceção do mês de novembro. Sendo assim, florações tóxicas podem ocorrer em um futuro próximo e perturbações antrópicas, as quais este ambiente está freqüentemente sujeito, deveriam ser evitadas. O aumento de espécies tóxicas

no reservatório pode acarretar graves conseqüências para a biota e também para atividades humanas de abastecimento e recreação.

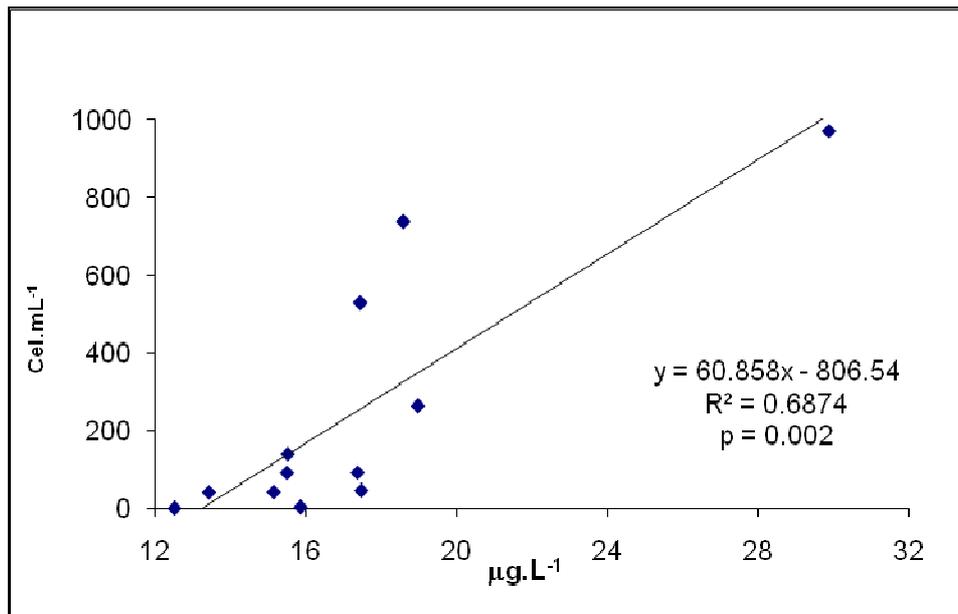
Dentre os cianopeptídeos avaliados, aeruginosina e cianopectolina foram encontrados em grande parte das amostras, e quase sempre apareceram juntos com microcistina, no mesmo ponto e com bandas na mesma intensidade (Fig. 3 A). Isso pode indicar que estes compostos estão sendo produzidos pelo mesmo organismo (espécie), em VG. Dois isômeros, derivados de aeruginosina, já foram caracterizados para uma linhagem brasileira, *Radiocystis fernandoi*, que também é produtora de microcistina (Lombardo *et al.* 2006). Também, foi observado que diferentes gêneros de cianobactérias que podem produzir cianopectolinas também são produtores de microcistinas, o que sugere a coexistência dos dois agrupamentos gênicos envolvidos na síntese destes cianopeptídeos em um mesmo genoma (Welker & von Döhren 2006). Juntamente com as microcistinas, as cianopectolinas parecem ser os peptídeos mais comuns produzidos por espécies do gênero *Microcystis*. Em estudos realizados por Welker *et al.* (2006), a produção de cianopectolinas foi detectada em 60% das colônias isoladas de *Microcystis*.

O gene da microviridina foi visualizado apenas no ponto 2, com exceção do mês de novembro, e anabaenopeptolina em nenhum dos meses e pontos estudados. A baixa diversidade química observada neste reservatório pode representar um reflexo da composição de espécies deste ambiente, já que os peptídeos estudados aqui foram descritos principalmente para espécies que não fazem parte da comunidade de VG ou estas apareceram em pouca quantidade. Ainda não se sabe se as picocianobactérias, por exemplo, que

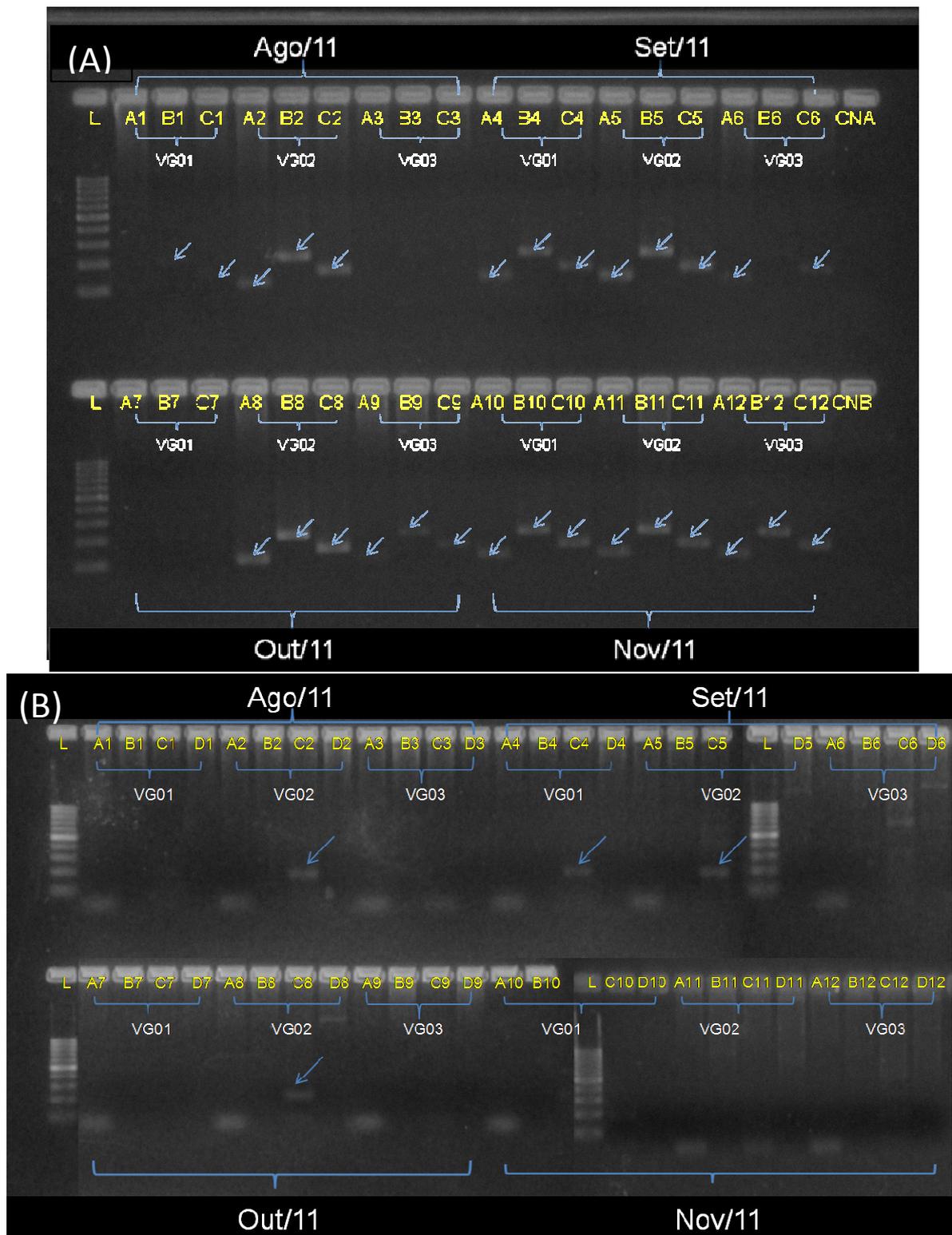
representaram a grande maioria dos organismos encontrados em VG, produzem estes compostos estudados aqui. Culturas destes organismos são necessárias para se certificar a sua composição. Outra possibilidade é ainda a baixa biomassa de cianobactérias, que dificultaria sua detecção.



**Figura 1.** Variação da presença de cianobactérias potencialmente produtoras de MIC (*Microcystis Planktothrix* e *Anabaena*), picoplâncton e toxicidade (MIC e *mcyD*) no reservatório de Volta Grande, no período de agosto a novembro de 2011, em três pontos amostrados.



**Figura 2.** Correlação entre genótipos que apresentaram o gene *mcvD* e fósforo total.



**Figura 03.** Gel de agarose mostrando a variação da presença/ausência dos peptídeos durante o período estudado em VG. Gel (A): (A) *mcyD*, (B) *aerA*, (C) *cnp*; Gel (B): (A) *anptP*, (B) *anptA*, (C) *mdnM*, (D) *mdnP*. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As setas representam as bandas específicas dos genes.

### 3.2 Pampulha

Mais de um milhão de células por mililitro de cianobactérias foram encontrados em todos os períodos amostrados na Pampulha e genótipos produtores de microcistina, organismos potencialmente produtores de microcistina e MIC foram encontrados em todas as amostras avaliadas (fig. 4). Apesar disso, não houve grande produção de microcistina neste reservatório, com exceção da amostra p2 (início de outubro) onde foram encontrados valores de MIC acima do permitido para água potável ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , WHO 2003 e portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011). Grupos dos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* são os principais causadores de florações e produtores de microcistina em todo o mundo (WHO 2003). Na Pampulha, observamos a presença de *Microcystis* e *Planktothrix*, sendo este último dominante na maioria das amostras estudadas (Fig. 5). *Sphaerocavum* também foi freqüentemente encontrado nas amostras, mas ainda pouco se sabe sobre seu potencial tóxico. Também, cianobactérias produtoras de outras cianotoxinas, como *Cylindrospermopsis*, por exemplo, foram observadas neste ambiente.

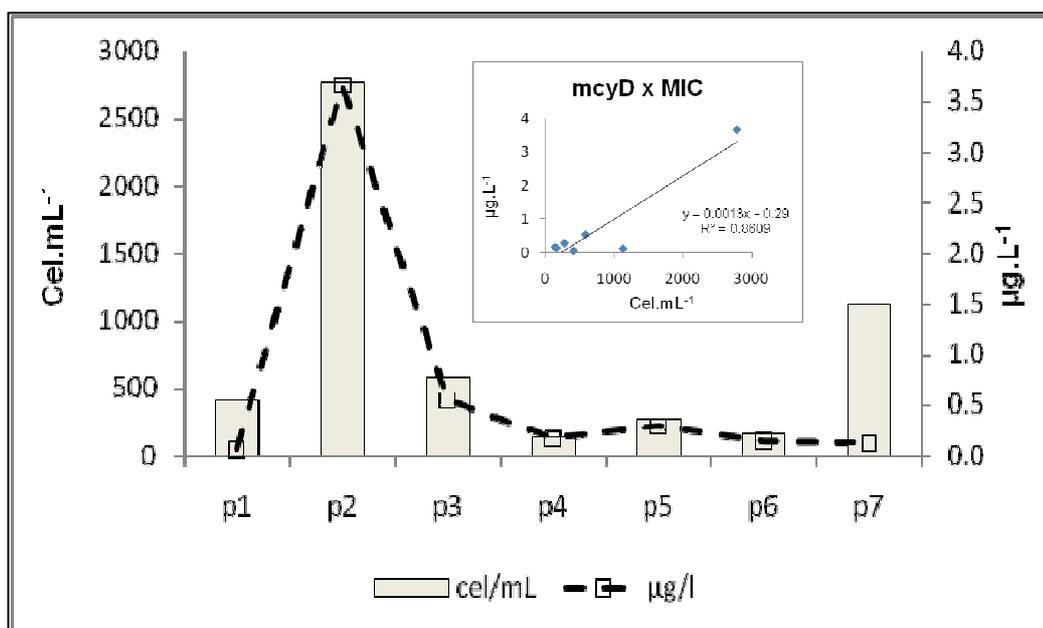
Sabe-se que a produção de microcistina é uma característica genética e dentro da mesma espécie existem cepas tóxicas e não tóxicas (Vezie *et al*, 1998). No presente trabalho, apesar da presença de grande quantidade de espécies que já foram citadas na literatura como sendo produtoras de microcistina, as análises moleculares mostraram a existência de poucos genótipos *mcyD* na Pampulha, apesar de terem sido encontrados em todo o período amostrado. Estes dados se correlacionaram de forma positiva e significativa com os dados de toxina (MIC) (Fig. 4,  $r^2=0.86$ ,  $p<0.01$ ), o que também foi observado em

vários outros trabalhos (Yoshida et al 2008; Ha et al 2009; Okello et al 2010; Ostermaier and Kurmayer 2010). Esta correlação sugere que dados obtidos pela qPCR podem ser usados como estimativa de concentração de microcistina na água neste ambiente.

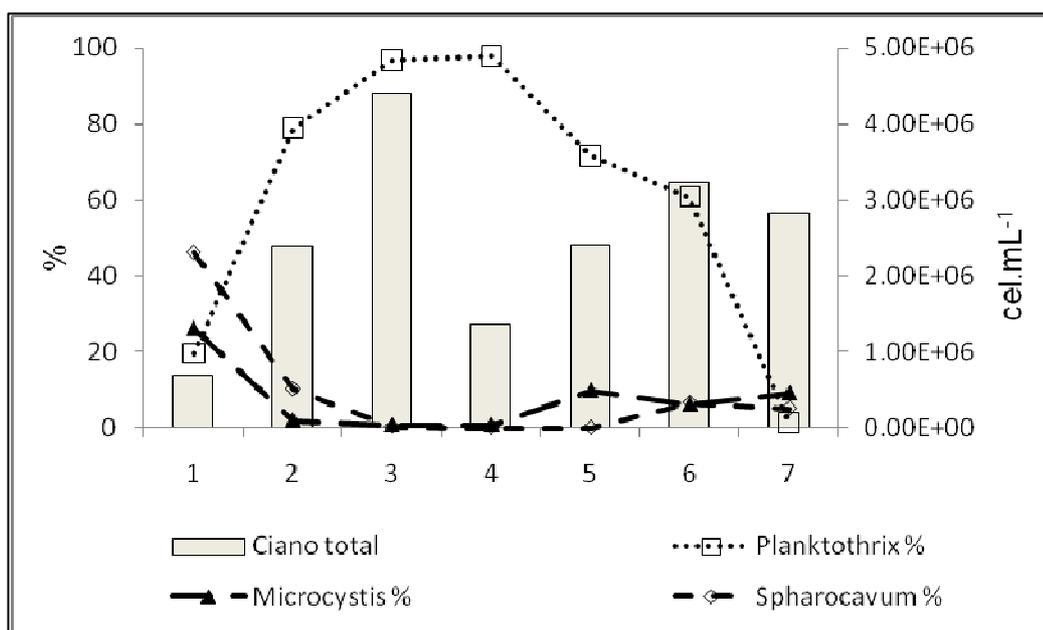
Devido à baixa quantidade de microcistina encontrada no reservatório, acreditamos que *Planktothrix*, que foi o organismo dominante na Pampulha no período estudado, possa estar envolvido com a produção de outros cianopeptídeos que não microcistina. A produção de vários outros compostos já foram descritos para *Planktothrix*, dentre eles as neurotoxinas (anatoxina-a e saxitoxina) e os cianopeptídeos (cianopeptolina, microviridina, aeruginosina e anabaenopetinas) (WHO 2003; Rounge et al 2008; Ishida et al 2009; Ziemart et al 2010). Medidas das neurotoxinas não foram realizadas aqui, mas vários genótipos de cianopeptídeos foram observados neste trabalho (Fig. 6), mostrando a diversidade deles neste reservatório.

Aeruginosina e cianopeptolina estiveram presentes em todas as amostras estudadas na Pampulha. Estudos também conduzidos no Brasil, porém com cepas isoladas em laboratório, mostraram que diversas cianobactérias são produtoras de aeruginosina e cianopeptolina (Silva et al 2011, Pereira et al 2012) evidenciando, portanto, que estas substâncias podem ser muito comuns em nossos reservatórios (Stenico et al 2012). É interessante observar que estes compostos na Pampulha, assim como ocorreu em VG, apareceram juntos e com a mesma intensidade de banda. É bem provável que aqui também o mesmo organismo (genoma) tenha os genes biossintéticos para ambos os peptídeos.

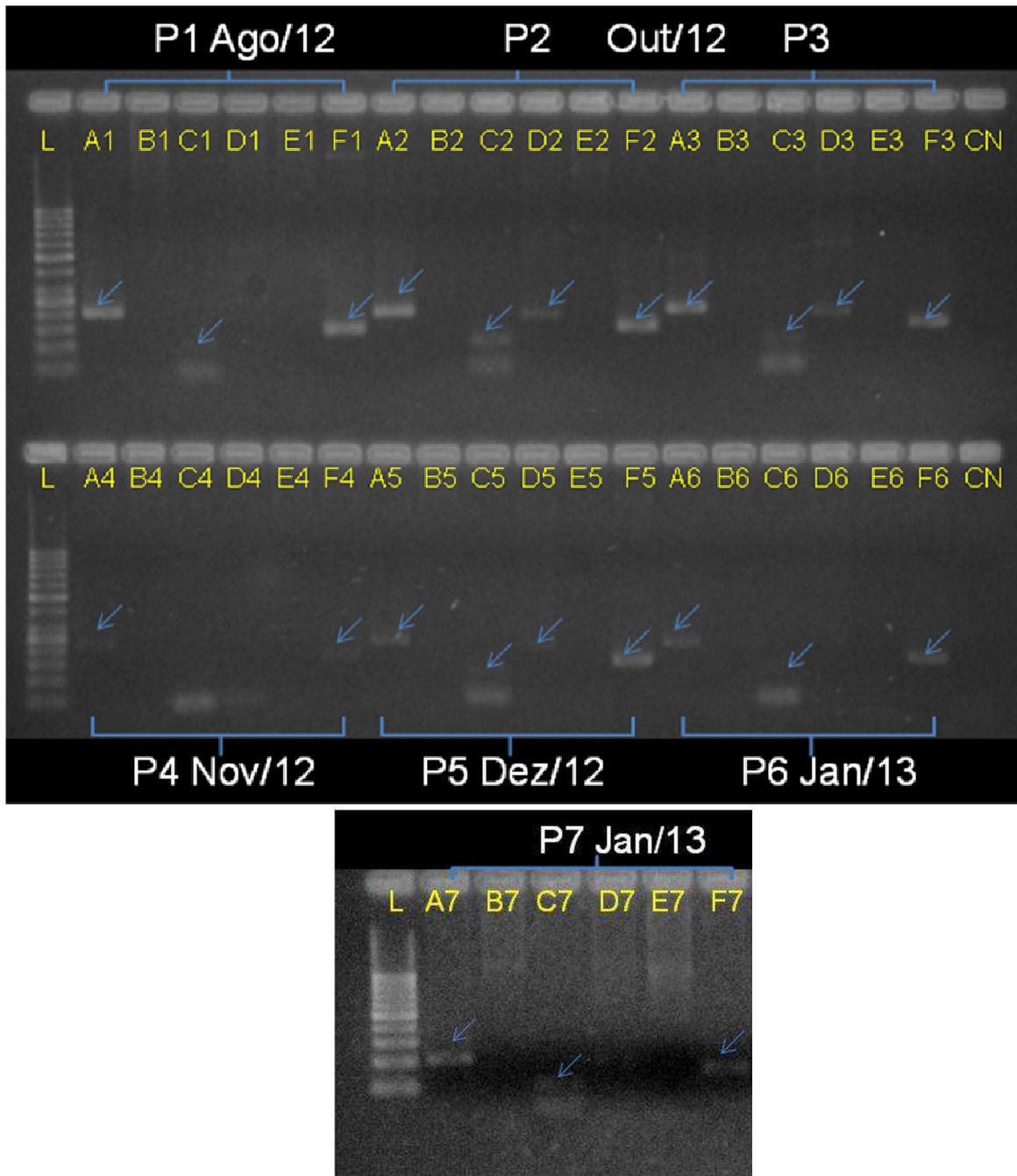
Amplificações a partir de Iniciadores de anabaenopeptolina, específicos para *Planktothrix*, foram observadas em quase todas as coletas. Genótipos de microviridina apareceram somente nas coletas P2, P3 e P5, e podem ser associados à *Microcystis*, já que os iniciadores que geraram a amplificação eram específicos para este gênero. Entretanto, amplificações de microviridina específicas para *Planktothrix* não foram observadas, apesar da dominância deste gênero na lagoa. A maior diversidade química/ toxicológica no reservatório da Pampulha pode estar associada à grande quantidade de cianobactérias potencialmente tóxicas encontradas neste ambiente. A produção de uma ampla faixa de variantes de peptídeos, com funções potencialmente similares, está sendo sugerida como um fator que daria às cianobactérias melhores chances para sustentar a produção constitutiva destas classes de peptídeos em condições de mudanças no ambiente (Tonk et al 2008; Pereira et al. 2012). Devido ao pouco conhecimento sobre a toxicidade e efeito destes compostos sobre outros organismos, mais estudos são necessários. Eles podem inclusive estar ligados ao processo de aclimação das cianobactérias ao estresse e sobrevivência, e ao sucesso destes organismos no ambiente aquático.



**Figura 4.** Variação de genótipos *mcyD* ( $\text{cel.mL}^{-1}$ ) e microcistina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do período estudado no reservatório da Pampulha. A figura inserida mostra a correlação entre ambos os parâmetros.



**F**  
**figura 5.** Variação das espécies potencialmente produtoras de microcistina (em %) em relação ao número total de cianobactérias (em  $\text{cel.mL}^{-1}$ ) no reservatório da Pampulha, no período de estudo.



**Figura 6.** Gel de agarose mostrando a variação da presença/ausência dos peptídeos durante o período estudado na Pampulha. (A) *aerA*, (B) *anptA*, (C) *anptP*, (D) *mdnM*, (E) *mdnP* e (F) *cnp*. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. As setas representam as bandas específicas dos genes.

#### 4.0 Conclusões

Microcistina não foi um composto importante nos ambientes estudados durante os períodos amostrados, mas a existência de genótipos *mcyD* em ambos reservatórios indica que uma floração tóxica pode ocorrer no futuro e medidas de mitigação precisam ser tomadas a fim de se evitar os problemas causados por esta toxina. Entretanto, diversas espécies de cianobactérias foram visualizadas na Pampulha, provavelmente produtoras de outras cianotoxinas tão ou mais perigosas que a microcistina. Portanto, deve-se tomar bastante cuidado com a exposição a este ambiente já que há um forte indicio de insalubridade do mesmo.

A diversidade de cianopeptídeos foi maior na Pampulha do que em Volta Grande. Ambientes hipereutróficos tendem a ser dominados por cianobactérias potencialmente tóxicas (Giani et al., 2005), e muitos dos cianopeptídeos avaliados aqui já foram identificados nestes mesmos grupos de cianobactérias. Portanto, uma floração tóxica pode vir acompanhada de várias outras substâncias, das quais pouco se sabe sobre seus efeitos na comunidade aquática e também sobre as pessoas que de alguma forma se beneficiam desta água. Sendo assim, estudos ambientais envolvendo cianobactérias e seus cianopeptídeos devem ser mais bem explorados, já que podem ajudar na compreensão dos efeitos destes compostos para seu entorno e desta forma, auxiliar procedimentos de monitoramento ambiental e cuidados com a saúde humana. Além disso, existe um grande potencial destas substâncias para uso

farmacêutico e biotecnológico e estudos como estes podem apontar direções para estas aplicações.

## **Agradecimentos**

Agradecemos as equipes do laboratório de Ficologia/ICB/UFMG e de Hidráulica/Engenharia/ UFMG pela coleta das amostras nos reservatórios e pelas análises físico-químicas, de fitoplâncton e de toxinas. Agradecemos a Fapemig, CNPq, CAPES e CEMIG pelo financiamento desta pesquisa.

## **5.0 Referências**

- APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association Publications, Washington DC. Ed. 19<sup>th</sup>, 1995.
- Börner, T., & Dittmann, E. (2005). Molecular biology of cyanobacterial toxins. In *Harmful cyanobacteria* (pp. 25-40). Springer Netherlands.
- Burja, A. M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Grant Burgess, J., & Wright, P. C. (2001). Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57(46), 9347-9377.
- Carmichael, W.W. Toxic Microcystis and the environment. In: Watanabe, Harada, K.I., Carmichael, W.W. And Fujiki, H. Toxic *Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, 1996. p.1-11.
- Fastner, J., Erhard, M., & von Döhren, H. (2001). Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp.(Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5069-5076.
- Frangeul, L., Quillardet, P., Castets, A. M., Humbert, J. F., Matthijs, H. C., Cortez, D., ... & De Marsac, N. T. (2008). Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *BMC genomics*, 9(1), 274.

Fujii, K., Sivonen, K., Nakano, T., & Harada, K. I. (2002). Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. *Tetrahedron*, 58(34), 6863-6871.

Fujii, K., Sivonen, K., Kashiwagi, T., Hirayama, K., & Harada, K. I. (1999). Nostophycin, a novel cyclic peptide from the toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. 152. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(16), 5777-5782.

Furukawa, K., Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T., & Inamori, Y. (2006). Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(2), 90-96.

Gerwick, W. H., Proteau, P. J., Nagle, D. G., Hamel, E., Blokhin, A., & Slate, D. L. (1994). Structure of Curacin A, a novel antimitotic, antiproliferative and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *The Journal of Organic Chemistry*, 59(6), 1243-1245.

Giani, A., Bird, D. F., Prairie, Y. T., & Lawrence, J. F. (2005). Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(9), 2100-2109.

Ha, J. H., Hidaka, T., & Tsuno, H. (2008). Quantification of toxic *Microcystis* and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environmental science & technology*, 43(3), 812-818.

Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., & Börner, T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, 180(6), 402-410.

Ishida, K., Welker, M., Christiansen, G., Cadel-Six, S., Bouchier, C., Dittmann, E., ... & de Marsac, N. T. (2009). Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 75(7), 2017-2026.

Ishitsuka, M. O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (1990). Microviridin. A novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. *Journal of the American Chemical Society*, 112(22), 8180-8182.

Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T., & Neilan, B. A. (2002). Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial. *Applied and environmental microbiology*, 68(2), 449-455.

Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., ... & Watanabe, M. M. (2007). Complete genomic structure of the bloom-forming

toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA research*, 14(6), 247-256.

Kurmayer, R., & Kutzenberger, T. (2003). Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6723-6730.

Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., & Chorus, I. (2002). Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial ecology*, 43(1), 107-118.

Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M., & Oshima, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 37(10), 1359-1373.

Lombardo, M., Pinto, F. C. R., Vieira, J. M. S., Honda, R. Y., Pimenta, A., Bemquerer, M. P., ... & Kiyota, S. (2006). Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteriae): A Brazilian toxic cyanobacterium. *Toxicon*, 47(5), 560-566.

Lund, J. W. G., Kipling, C., & Le Cren, E. D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11(2), 143-170.

Martin, C. O. R. N. E. L., Oberer, L. U. K. A. S., Ino, T. O. M. I. O., König, W. A., Busch, M. I. C. H. A. E. L., & Weckesser, J. Ü. R. G. E. N. (1993). Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. *The Journal of antibiotics*, 46(10), 1550.

Murakami, M., Shin, H. J., Matsuda, H., Ishida, K., & Yamaguchi, K. (1997). A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry*, 44(3), 449-452.

Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M. F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., ... & Oishi, S. (2003). Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*, 42(5), 533-538.

Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., & Börner, T. (1999). Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 181(13), 4089-4097.

- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. I., & Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *Journal of Biochemistry*, *126*(3), 520-529.
- Okello, W., Ostermaier, V., Portmann, C., Gademann, K., & Kurmayer, R. (2010). Spatial isolation favours the divergence in microcystin net production by *Microcystis* in Ugandan freshwater lakes. *Water Research*, *44*(9), 2803-2814.
- Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1993). Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, *34*(3), 501-504.
- Kurmayer, R., & Kutzenberger, T. (2003). Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(11), 6723-6730.
- Pereira, D. A., Pimenta, A., & Giani, A. (2012). Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoi* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiological Research*, *167*(7), 413-421.
- Pimentel, J. S., & Giani, A. (2013). Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. *Journal of Applied Phycology*, 1-10.
- Rantala, A., Rizzi, E., Castiglioni, B., De Bellis, G., & Sivonen, K. (2008). Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip. *Environmental Microbiology*, *10*(3), 653-664.
- Rapala, J., & Sivonen, K. (1998). Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microbial Ecology*, *36*(2), 181-192.
- Rinehart, K. L., Namikoshi, M., & Choi, B. W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, *6*(2), 159-176.
- Rinta-Kanto, J. M., Ouellette, A. J. A., Boyer, G. L., Twiss, M. R., Bridgeman, T. B., & Wilhelm, S. W. (2005). Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science & Technology*, *39*(11), 4198-4205.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R., & Sivonen, K. (2000). Genes encoding synthetases of cyclic

depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Molecular microbiology*, 37(1), 156-167.

Rounge, T., Rohrlack, T., Kristensen, T., & Jakobsen, K. (2008). Recombination and selectional forces in cyanopeptolin NRPS operons from highly similar, but geographically remote *Planktothrix* strains. *BMC microbiology*, 8(1), 141.

Rounge, T. B., Rohrlack, T., Tooming-Klunderud, A., Kristensen, T., & Jakobsen, K. S. (2007). Comparison of cyanopeptolin genes in *Planktothrix*, *Microcystis*, and *Anabaena* strains: evidence for independent evolution within each genus. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7322-7330.

Saker, M. L., Vale, M., Kramer, D., & Vasconcelos, V. M. (2007). Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(2), 441-449.

SALOMON, P. S., YUNES, J. S., & PARISE, M. (1996). Toxicidade de um extrato de *Microcystis aeruginosa* da lagoa dos patos sobre camundongos e suas alterações sobre o tecido hepático. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 313-321.

Stenico, M. E., Lorenzi, A. S., Silva, C. S., Rigonato, J., & Fiore, M. F. (2012). INIBIDORES DE PROTEASES PRODUZIDOS POR CIANOBACTÉRIAS: UMA REVISÃO. *Oecologia Australis*, 16(2), 183-209.

Silva-Stenico, M. E., Silva, C. S. P., Lorenzi, A. S., Shishido, T. K., Etchegaray, A., Lira, S. P., ... & Fiore, M. F. (2011). Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*, 166(3), 161-175.

Sivonen, K.; Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxin. In: Chorus, I.; Bartram, J. (Ed.). Toxic cyanobacterial in water. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. London: Spoon. chap. 3, p. 41-111.

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B. A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chem Biol*, 7: 753-764.

Tillett, D., Parker, D. L., & Neilan, B. A. (2001). Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2810-2818.

Tonk, L., Visser, P. M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E. O., Wiedner, C., ... & Huisman, J. (2005). The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5177-5181.

Tooming-Klunderud, A., Rohrlack, T., Shalchian-Tabrizi, K., Kristensen, T., & Jakobsen, K. S. (2007). Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from *Microcystis*: implications for evolution of cyanopeptolins. *Microbiology*, 153(5), 1382-1393.

Uthermohl, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. (1958). *Mit. Ins. Ver. Limnol.*, 9, 1-38.

Vezie, C., Briant, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J. C., & Salkinoja-Salonen, M. (1998). Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecology*, 35(2), 126-135.

Via-Ordorika, L., Fastner, J., Kurmayer, R., Hisbergues, M., Dittmann, E., Komarek, J., ... & Chorus, I. (2004). Distribution of Microcystin-Producing and Non-Microcystin-Producing *Microcystis* sp. in European Freshwater Bodies: Detection of Microcystins and Microcystin Genes in Individual Colonies. *Systematic and applied microbiology*, 27(5), 592-602.

Villa, F. A., Lieske, K., & Gerwick, L. (2010). Selective MyD88-dependent pathway inhibition by the cyanobacterial natural product malyngamide F acetate. *European journal of pharmacology*, 629(1), 140-146.

Watanabe, M. F., Tsujimura, S., Oishi, S., Niki, T., & Namikoshi, M. (2003). Isolation and identification of homoanatoxin-a from a toxic strain of the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja isolated from Lake Biwa, Japan. *Phycologia*, 42(4), 364-369.

Welker, M., & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 530-563.

WHO, G. (2003). Guidelines for drinking water quality. *WHO: World Health Organization*.

Wrasidlo, W., Mielgo, A., Torres, V. A., Barbero, S., Stoletov, K., Suyama, T. L., ... & Stupack, D. G. (2008). The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2313-2318.

Yoshida, M., Yoshida, T., Kashima, A., Takashima, Y., Hosoda, N., Nagasaki, K., & Hiroishi, S. (2008). Ecological dynamics of the toxic bloom-forming

cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3269-3273.

Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Kondo, R., & Hiroishi, S. (2005). Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata. *Environmental toxicology*, 20(3), 229-234.

Ziemert, N., Ishida, K., Weiz, A., Hertweck, C., & Dittmann, E. (2010). Exploiting the natural diversity of microviridin gene clusters for discovery of novel tricyclic depsipeptides. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3568-3574.

Ziemert, N., Ishida, K., Liaimer, A., Hertweck, C., & Dittmann, E. (2008). Ribosomal Synthesis of Tricyclic Depsipeptides in Bloom-Forming Cyanobacteria. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(40), 7756-7759.

## 9.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises de expressão gênica, realizados no laboratório e no campo, apontaram para uma relação entre parâmetros físico-químicos e a regulação de cianopeptídeos. No laboratório, nutrientes foram a fonte de estresse para a célula e no campo temperatura e luminosidade foram os fatores que mostraram influências significantes de mudança celular. Como houve uma relação positiva entre estresse e aumento de microcistina (no laboratório) e aumento de cianopeptolina (no campo), é possível então, que fontes de estresse abiótico possam levar à produção de cianopeptídeos, pelas cianobactérias. Sendo assim, esses peptídeos poderiam estar contribuindo para o processo de aclimação e sobrevivência celular.

Neste trabalho também foi possível observar o potencial de produção de alta variedade de peptídeos no ambiente, principalmente no reservatório eutrofizado, evidenciando a importância do conhecimento da diversidade e toxicidade destes metabólitos para o ambiente.

As técnicas moleculares apresentaram resultados sensíveis e muito precisos para os estudos propostos aqui. Portanto, a utilização mais frequente destas técnicas em estudos ambientais poderá melhorar as informações sobre a dinâmica das espécies no ambiente e também poderá contribuir para uma melhoria de procedimentos que visem ao controle das cianobactérias.