

FERNANDA RIOS JACINAVICIUS

Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777 - *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (Cyanobacteria).

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em análises Ambientais.

SÃO PAULO

2010

FERNANDA RIOS JACINAVICIUS

Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777- *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (Cyanobacteria).

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. CÉLIA LEITE SANT'ANNA

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Jacinavicius, Fernanda Rios

J12e Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777 – *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (Cyanobacteria) / Fernanda Rios Jacinavicius -- São Paulo, 2010.
80 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010
Bibliografia.

1. Algas. 2. Cyanobacteria. 3. Ecofisiologia. I. Título

CDU: 582.26

Dedico esta dissertação a minha família, em especial aos meus pais, Regina e Orivaldo (in memoriam), aos meus irmãos, Patrícia e Marco e ao meu esposo, Fernando, com muito amor.

***“Há muitos séculos já se cantava a
beleza eterna das coisas e a grandeza da
simplicidade.”***

Érico Veríssimo

AGRADECIMENTOS

Quantos foram os que contribuíram para a elaboração deste trabalho, alguns puderam ver o finalmente, outros já estão distantes e puderam participar dos projetos, e tem aqueles que participaram apenas dos sonhos.

Agradeço...

Primeiramente a Deus pela presença constante em minha vida, pela força e por todas as bênçãos que me concedeu.

À Dra. Célia Leite Sant`Anna, Pesquisadora do Instituto de Botânica, minha orientadora, pela amizade, paciência e confiança, por ter me ensinado a dar os primeiros passos na carreira científica e, com muita sabedoria, respeito e dedicação, esteve ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória... Obrigada por ser minha mãe profissional e competente, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

À Dra. Luciana Retz de Carvalho, Pesquisadora do Instituto de Botânica, exemplo de honestidade e responsabilidade, pela amizade, apoio e intensa dedicação, por me ajudar não somente nas análises cromatográficas, mas por tudo que tem feito por mim. Obrigada por contribuir com tantos ensinamentos, tanto conhecimento, tantas palavras de força e ajuda.

Aos funcionários e amigos do Instituto de Botânica- Seção de Ficologia pela maravilhosa convivência ao longo desses anos: Dra. Andréa Tucci, Dra. Diclá Pupo Santos, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães, Dra.Sílvia Susanne Melcher, Dra. Mutue Toyota Fujii, Dra. Nair Sumie Yokoya, Neide Pozo Rios de Souza, Neuzete Martins Oliveira (“Niu”), Elizete Mítico Mitsugui, José Domingos (“Zé”), Manuel Gomes da Silva (“Manú”).

Aos alunos da Seção de Ficologia que compartilharam comigo os momentos de tristezas e também de alegrias, que não mediram esforços e muito me ajudaram na realização deste trabalho, por serem tão especiais e prestativos: Daniella, Rodrigo (*in memoriam*), Kleber Renan, Elba Renata, Camila Malone, Suzana, Edna, Camilinha, Fernando Pipole, Fernanda Ramlove, Aline, Angélica, Ana Cláudia, Luiz Felipe, Jonatas, Kenner, Sandra, Cesar, Marisa e Raquel

A todo pessoal do Instituto de Pesca - SP, principalmente ao técnico de laboratório Luiz Evangelista e ao pesquisador Dr. Clóvis do Carmo por permitir a realização das análises de clorofila em seu laboratório.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela oportunidade concedida. A Márcia Regina Ângelo (“Marcinha”) e ao Antônio Carlos Borges pelo carinho, dedicação e bom atendimento.

As pesquisadoras, Dra. Fanly Fungyi Chow Ho, Dra. Estela Maria Plastino e Dra. Maria Ângela de Carvalho, pela valiosa contribuição durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Ronaldo Leal Carneiro, pela imensa contribuição e sugestões, por tudo o que me ensinou.

Aos meus amigos que me incentivaram e me apoiaram nos momentos em que mais precisei: Bruna, Elton, George, Cris, Camila, Rodrigo, Cláudia, Harry, Oslain, Elianinha, Willian, Kelly, Gustavo, Felipe, Ebinho...

A família Jacinavicius, por terem me acolhido. Ao Fernando meu esposo, por ser essa pessoa maravilhosa, que sempre me incentivou a dar este grande passo, pela compreensão, pelo amor e companheirismo, por ser amigo e sempre presente. Meu eterno namorado... não tenho palavras para agradecer!

A família Rodrigues pelo incentivo, por terem sido meu apoio. Em especial aos meus irmãos Patrícia e Marco pelos momentos que passamos juntos e pela amizade. A minha mãe Regina, por todo amor e dedicação em todos os momentos de minha vida, por ser esta mulher forte e guerreira, fonte inesgotável de amor, carinho e incentivo, que sempre esteve orando por mim esse tempo todo. Ao meu pai Orivaldo (*in memoriam*), por ter participado deste sonho e por me ensinar a lutar e a reconhecer o que é o amor e a honestidade.... sem a ajuda de vocês, eu jamais teria chegado aqui! Minha eterna gratidão!

Como disse Antonie de Saint-Exupéry em sua obra, O Pequeno Príncipe: “Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante”. Assim, agradeço a todos que passaram pela minha vida nesses sete anos de Botânico e que, mesmo sem saber, me ensinaram mais do que posso dizer em palavras.

Muito obrigada!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ESTADO DA ARTE.....	4
1.1.1. <i>Presença de aerótopos</i>	4
1.1.2. <i>Desenvolvimento</i>	5
1.1.3. <i>Competição com Microcystis aeruginosa</i>	7
1.1.4. <i>Estudos químicos</i>	8
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. CEPAS ESTUDADAS	12
3.2. CULTURAS MONOESPECÍFICAS EM LABORATÓRIO	13
3.3. CONTROLES E TRATAMENTOS	13
3.4. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	14
3.5. PRODUÇÃO DE BIOMASSA	15
3.6. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO	16
3.6.1. <i>Biomassa (Biovolume – mm³ L⁻¹)</i>	16
3.6.2. <i>Densidade (células. mL⁻¹)</i>	16
3.7. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO, TEMPO DE DUPLICAÇÃO E RENDIMENTO CELULAR MÁXIMO.....	18
3.8. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS	18
3.9. ANÁLISE DE CLOROFILA A (µg L ⁻¹)	19
3.10. ESTUDO QUÍMICO.....	20
3.10.1. <i>Preparo dos extratos das biomassas</i>	20
3.10.2. <i>Análise de saxitoxinas</i>	21
Derivatização da amostra	21
3.10.3. <i>Análise de microcistinas</i>	22
Construção das curvas Analítica das microcistinas LR e RR	22
3.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. FASE 1:.....	26
4.2. FASE 2:.....	27
4.3. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> SPC 777	28
4.3.1. <i>Efeito do aumento da temperatura</i>	28
4.3.2. <i>Efeito do aumento da irradiância</i>	30
4.3.3. <i>Efeitos da competição</i>	33
4.4. CLOROFILA A	39
4.5. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC777) DE <i>R. BROOKII</i> NO CONTROLE E NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	42
4.5.1. <i>Descrição do material nos controles</i>	42
SPC 777 - <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützinger) Kützinger	42
SPC338 - <i>Raphidiopsis brookii</i> P. J. Hill	43
4.5.2. <i>Descrição do material nos tratamentos</i>	43
5. ESTUDO QUÍMICO.....	47
5.1.1. <i>Análises Quantitativas de microcistinas por CLAE</i>	48
5.1.1.1. Determinação das Curvas analíticas das Microcistinas LR	48
5.1.1.2. Determinação das Curvas analíticas das Microcistinas RR	49
5.1.1.3. Análise de microcistinas	51
Perfil cromatográfico das Frações 3 das amostras da Cepa SPC 777 (controles) e de amostras dos tratamentos 1 e 2.....	51
5.1.1.4. Tratamento 3 (competição)	57
Perfil cromatográfico das Frações 3 das amostras das Cepas SPC 338 e 777 (controles) e de amostra do tratamento 3.....	57
5.1.2. <i>Análises Quantitativas de saxitoxinas por CLAE</i>	61
5.1.2.1. Determinação da área integral de fluorescência da saxitoxina e de goniatoxina III	61
5.1.2.2. Análise de Saxitoxinas	62
Resumo:.....	68

Abstract	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ASPECTO GERAL DAS CEPAS <i>RAPHIDIOPSIS BROOKII</i> SPC338 E <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> SPC777 CULTIVADAS EM LABORATÓRIO	12
FIGURA 2. ASPECTO GERAL DO BANCO DE CULTURAS DE CIANOBACTÉRIAS DO INSTITUTO DE BOTÂNICA.....	12
FIGURA 3. ESQUEMA DO PROCESSO DE REPICAGEM.	13
FIGURA 4. CÂMARA DE FUCHS-ROSENTHAL UTILIZADA PARA A DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO E EM DESTAQUE UM DOS CAMPOS DA CÂMARA.....	17
FIGURA 5. VALORES DA TAXA DE CRESCIMENTO DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC777) REFERENTES AO CONTROLE E TRATAMENTOS 1 E 2, NA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO.	25
FIGURA 6. VALORES DO RENDIMENTO CELULAR DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) REFERENTES AO CONTROLE E TRATAMENTOS 1 E 2, NA FASE 1.....	26
FIGURA 7. VALORES DO BIOVOLUME DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) REFERENTES AO CONTROLE E TRATAMENTOS 1 E 2, NA FASE 1 – 15º DIA	27
FIGURA 8. VALORES DO BIOVOLUME DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC777) REFERENTES AO CONTROLE E TRATAMENTOS 1 E 2, NA FASE 2 DE CRESCIMENTO	27
FIGURA 9. VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777)	28
FIGURA 10. VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777)	30
FIGURA 11. ASPECTO GERAL DAS CULTURAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> SPC777 NO CONTROLE E NOS TRATAMENTOS 1 E 2.	32
FIGURA 12. ASPECTO GERAL DOS CONTROLES DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC777) E DE <i>R. BROOKII</i> (SPC 338) E DAS CULTURAS NO PRIMEIRO DIA DO TRATAMENTO 3.....	33
FIGURA 13. TAXA DE CRESCIMENTO DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) E DE <i>R. BROOKII</i> (SPC 338) NO CONTROLE E NO TRATAMENTO 3	34
FIGURA 14. VALORES DA RAZÃO CELULAR DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) E DE <i>RHAPHIDIOPSIS BROOKII</i> (SPC 338) NO CONTROLE E NO TRATAMENTO 3 NA FASE 1 DE CRESCIMENTO.....	35
FIGURA 15. VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) E <i>RHAPHIDIOPSIS BROOKII</i> (SPC 338) NAS CONDIÇÕES CONTROLE.....	35
FIGURA 16. VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) E <i>R. BROOKII</i> (SPC 338) NO TRATAMENTO 3.....	36
FIGURA 17. ASPECTO GERAL DAS CULTURAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC777) E <i>R. BROOKII</i> (SPC338) NO TRATAMENTO 3.....	38
FIGURA 18. CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA A DAS CÉLULAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) NO CONTROLE (TEMPERATURA 23 °C) E NO TRATAMENTO 1 (TEMPERATURA 30°C), NAS FASES 1 E 2 DE CRESCIMENTO	39
FIGURA 19. CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA A DAS CÉLULAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC 777) NO CONTROLE (IRRADIÂNCIA 40-50) E NO TRATAMENTO 2 (IRRADIÂNCIA 100-120), NAS FASES 1 E 2 DE CRESCIMENTO	40
FIGURA 20. ASPECTO GERAL DAS CULTURAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> SPC777 NA FASE 1 (15º DIA), NO CONTROLE E NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	41
FIGURA 21. ASPECTO GERAL DAS CULTURAS DE <i>M. AERUGINOSA</i> SPC777 NA FASE 2, NO CONTROLE (31º DIA) E NOS DIFERENTES TRATAMENTOS (27º DIA)	42
FIGURAS 22-29. <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> SPC777 : 22-26. CONTROLE: 22-23. ASPECTO GERAL DAS CÉLULAS EM DIVISÃO NA FASE 1; 24. ASPECTO GERAL DAS CÉLULAS NA FASE 2. 25-26. TRATAMENTO 2: 25. DETALHE DA CÉLULA SEM AERÓTOPOS NA FASE 1; 26. DETALHE DA CÉLULA SEM AERÓTOPOS NA FASE 2. 27-29. <i>RAPHIDIOPSIS BROOKII</i> SPC338 : CONTROLE: ASPECTO GERAL DO TRICOMA NA FASE 1	45
FIGURAS 30-34. <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> SPC777 : TRATAMENTO 1: 30. ASPECTO GERAL DAS CÉLULAS NA FASE 2; 31. DETALHE DA CÉLULA FORMANDO AGRUPAMENTOS EM FILEIRAS NA FASE 2; 32. DETALHE DA CÉLULA SEM AERÓTOPOS NA FASE 1; 33-34- ASPECTO GERAL DAS CÉLULAS EM DIVISÃO NA FASE 2	46
FIGURAS 35-38. <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> SPC777 E <i>RAPHIDIOPSIS BROOKII</i> SPC338 : TRATAMENTO 3 (COMPETIÇÃO) - ASPECTO GERAL DAS CÉLULAS E TRICOMAS.....	46
FIGURA 39. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA CONTENDO MICROCISTINA-LR.....	48
FIGURA 40. ESPECTRO DE UV DA MICROCISTINA-LR.....	49
FIGURA 41. CURVA ANALÍTICA DA MICROCISTINA-LR.	49
FIGURA 42. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA DE PADRÃO DE MICROCISTINA-RR	50
FIGURA 43. ESPECTRO DE UV DA MICROCISTINA-RR.	50
FIGURA 44. CURVA ANALÍTICA DA MICROCISTINA-RR.....	51
FIGURA 45. CROMATOGRAMA DO CONTROLE SPC777, NA FASE 1 DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	51
FIGURA 46. CROMATOGRAMA DA CEPA SPC 777 NO TRATAMENTO 1, FASE 1 DA CURVA DE CRESCIMENTO.	52
FIGURA 47. CROMATOGRAMA DA CEPA SPC777 NO TRATAMENTO 2, FASE 1 DA CURVA DE CRESCIMENTO.	52
FIGURA 48. CROMATOGRAMA DO CONTROLE SPC777, NA FASE 2 DE CRESCIMENTO.....	52
FIGURA 49. CROMATOGRAMA DA CEPA SPC777 NO TRATAMENTO 1, NA FASE 2 DE CRESCIMENTO.	53
FIGURA 50. CROMATOGRAMA DA CEPA SPC777 NO TRATAMENTO 2, NA FASE 2 DE CRESCIMENTO.	53

FIGURA 51. CROMATOGRAMA DO CONTROLE SPC777, FASE 1 DA CURVA DE CRESCIMENTO.	57
FIGURA 52. CROMATOGRAMA DO CONTROLE SPC338, FASE 1 DA CURVA DE CRESCIMENTO.	58
FIGURA 53. CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 3 (COMPETIÇÃO), FASE 1 DA CURVA DE CRESCIMENTO.	58
FIGURA 54. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA DO PADRÃO DE STX	61
FIGURA 55. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA DO PADRÃO DE GTX-III	62
FIGURA 56. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA CONTROLE SPC338, FASE 1 DE CRESCIMENTO.....	62
FIGURA 57. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA NO TRATAMENTO 3, FASE 1 DE CRESCIMENTO.....	63
FIGURA 58. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SPC777 DO CONTROLE, FASE 1 DE CRESCIMENTO.	63
FIGURA 59. VALORES DAS MÉDIAS DAS MASSAS DE GTX E DE STX DO CONTROLE DE <i>RAPHIDIOPSIS BROKII</i> (SPC338) E DO TRATAMENTO 3 (COMPETIÇÃO).....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASM-1 (GORHAM <i>ET AL.</i> 1964), COM MODIFICAÇÕES (ZAGATTO & ARAGÃO 1992) .	14
TABELA 2. FATORES DE CONVERSÃO PARA DETERMINAÇÃO DO Nº DE CÉLULAS. mL^{-1} (HONDA 2005)	17
TABELA 3. QUANTIDADES DE MICROCISTINA-LR EMPREGADAS PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E OS RESPECTIVOS VOLUMES EM QUE ESTAVAM CONTIDAS (VOLUME DA INJEÇÃO).....	22
TABELA 4. QUANTIDADES DE MICROCISTINA-RR EMPREGADAS PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E OS RESPECTIVOS VOLUMES EM QUE ESTAVAM CONTIDAS (VOLUME DA INJEÇÃO).....	23
TABELA 5. TAXA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE DUPLICAÇÃO DA CEPA SPC 777, NA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO DO CONTROLE E DOS TRATAMENTOS 1 E 2. VALORES MÉDIOS (N=3). MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI SEGUNDO O TESTE DE VARIÂNCIA (ANOVA) FATOR ÚNICO, SEGUIDO DO TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE TUKEY (A= 0,05).....	25
TABELA 6. RENDIMENTO CELULAR (R) DA CEPA SPC 777 NA FASE 1 DE CRESCIMENTO DO CONTROLE E DOS TRATAMENTOS 1 E 2....	26
TABELA 7. TAXA DE CRESCIMENTO (μ) E TEMPO DE DUPLICAÇÃO (G) DE <i>M. AERUGINOSA</i> SPC777 E DE <i>R. BROOKII</i> SPC 338 NO CONTROLE E NO TRATAMENTO 3. VALORES MÉDIOS	33
TABELA 8. RENDIMENTO (R) E RAZÃO CELULAR DE <i>M. AERUGINOSA</i> (SPC777) E DE <i>R. BROOKII</i> (SPC 338) NO CONTROLE E NO TRATAMENTO 3. VALORES MÉDIOS	34
TABELA 9. COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO DIÂMETRO CELULAR (N= 60) DA CEPA SPC777, NO CONTROLE E NOS TRATAMENTOS TESTADOS, NAS FASES: 1 E 2.....	44
TABELA 10. PESOS DAS BIOMASSAS E DOS EXTRATOS BRUTOS LIOFILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS MÉDIAS.	47
TABELA 11. CONCENTRAÇÕES DE MICROCISTINA-LR E CORRESPONDENTES ÁREAS DOS PICOS OBTIDOS POR CLAE.....	48
TABELA 12. CONCENTRAÇÕES DE MICROCISTINA-RR E CORRESPONDENTES ÁREAS DOS PICOS OBTIDOS POR CLAE.	50
TABELA 13. TEMPOS DE RETENÇÃO (Tr.), ÁREAS DOS PICOS E CORRESPONDENTES ESPECTROS DE UV, OBTIDOS POR CLAE NA FASE 1	54
TABELA 14. TEMPOS DE RETENÇÃO (Tr.), ÁREAS DOS PICOS E CORRESPONDENTES ESPECTROS DE UV, OBTIDOS POR CLAE NA FASE 2	55
TABELA 15. TEMPO DE RETENÇÃO E AS CORRESPONDENTES ÁREAS DOS PICOS OBTIDOS POR CLAE PARA O CONTROLE SPC777 E DIFERENTES TRATAMENTOS.....	57
TABELA 16. TEMPO DE RETENÇÃO (Tr.), ÁREAS DOS PICOS E CORRESPONDENTES ESPECTROS DE UV, OBTIDOS POR CLAE.....	59
TABELA 17. TEMPO DE RETENÇÃO E AS CORRESPONDENTES ÁREAS DOS PICOS OBTIDOS POR CLAE PARA OS CONTROLES E TRATAMENTO 3	60
TABELA 18. MASSAS, TEMPOS DE RETENÇÃO E CORRESPONDENTES ÁREAS DOS PICOS DE GTX-III E STX, OBTIDOS POR CLAE.....	61
TABELA 19. TEMPOS DE RETENÇÃO, ÁREAS DOS PICOS, MASSAS E CONCENTRAÇÕES DE GTX III E STX DA CEPA CONTROLE SPC338 E DO TRATAMENTO 3.....	63
TABELA 20. VALORES DO NÚMERO DE CÉLULAS POR mL^{-1} , DAS CONCENTRAÇÕES DE GTX NAS AMOSTRAS, QUANTIDADES DE GTX POR CÉLULA E AS RESPECTIVAS MÉDIAS.	65

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios a ser enfrentado no século XXI é seguramente a questão da qualidade da água de abastecimento público (Tundisi 2003). Nas últimas décadas, a qualidade da água vem decrescendo rapidamente e os relatos de ocorrência de florações de cianobactérias em reservatórios de todo o mundo estão se tornando corriqueiros (Chorus & Bartram 1999).

As cianobactérias têm a capacidade de se desenvolver em vários ambientes, entretanto os ambientes mais favoráveis ao seu crescimento são geralmente aqueles de água doce, temperatura de 15 a 30°C, pH na faixa de 6 a 9 e elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo (Mur *et al.* 1999). Temperaturas elevadas podem afetar processos fisiológicos como a fotossíntese, respiração e taxa de crescimento (Reynolds 1997).

Além destes fatores, a luz também tem grande influência no desenvolvimento das cianobactérias, isto porque em condições de baixas irradiâncias, as cianobactérias têm vantagem sobre os demais grupos do fitoplâncton. As cianobactérias possuem além de clorofila *a*, outros pigmentos fotossintéticos denominados genericamente de ficobilinas. Existem três tipos de ficobilinas: ficoeritina, ficocianina e aloficocianina. Esses pigmentos captam a energia luminosa em regiões do espectro luminoso não absorvido pelas clorofilas, fazendo com que a transmissão de energia luminosa tenha eficiência próxima a 100% (Grossman 2003).

Ao lado da eficiência fotossintética, o nitrogênio e o fósforo podem ser estocados muito eficientemente por cianobactérias, respectivamente, na forma de ficocianina e cianoficina (Falconer 2005) e de grânulos de polifosfato (Lee 2000). Além disso, alguns grupos de cianobactérias são capazes de fixar diretamente o N₂ através de células diferenciadas denominadas heterocitos.

As cianobactérias possuem duplicação celular a uma taxa de 0,3 a 1,4. dia⁻¹ (Chorus & Bartram 1999). Esta taxa de crescimento é menor do que as observadas em grupos eucariontes (1,0 a 1,5. dia⁻¹ para o gênero de alga verde *Scenedesmus* por exemplo) (Nalewajko & Murphy 2001), mas as cianobactérias apresentam um conjunto de adaptações fisiológicas que as tornam intensamente competitivas, principalmente em ambientes eutrofizados.

Ao lado do conjunto de pigmentos fotossintetizantes, fixação do nitrogênio atmosférico e do eficiente estoque de nitrogênio e fósforo, as cianobactérias apresentam aerótopos que são vesículas de gás cuja principal função é controlar a flutuabilidade das colônias e filamentos na coluna de água, em resposta às condições ambientais (Walsby 1994). Os aerótopos são formados por proteínas hidrófobas, sendo altamente permeáveis a todos os

tipos de gases e impermeáveis às moléculas de água (Walsby 1972). As cianobactérias variam sua flutuabilidade em resposta à irradiância: na baixa irradiância os aerótopos são formados e quando a irradiância é elevada ocorre a perda dos mesmos (Visser *et al.* 2005). A flutuabilidade, que representa excelente vantagem competitiva em relação a outros organismos fitoplanctônicos, também é influenciada pelas dimensões das colônias (Falconer 2005), quanto maior a colônia maior a superfície de contato, o que proporciona maior flutuabilidade. Essas vantagens incluem redução da perda por sedimentação, melhor aproveitamento da luz e acesso a camadas mais ricas em nutrientes (Oliver & Ganf 2000).

No Brasil, o controle das cianobactérias e de suas toxinas em água de abastecimento é um dos grandes problemas a serem enfrentados pelas companhias de monitoramento da qualidade de água. Sabe-se que as cianobactérias e suas toxinas estão amplamente distribuídas nas águas continentais como consequência direta do processo de eutrofização (Sant'Anna *et al.* 2007). Uns dos mais favoráveis ecossistemas para a expansão das florações de cianobactérias no Brasil são as represas que em geral são rasas e frequentemente eutrofizadas, além de possuírem alto tempo de retenção de água. Estas condições sempre favorecem o desenvolvimento e a dominância de cianobactérias, cujas florações quase sempre são tóxicas (Costa & Azevedo 1994; Honda *et al.* 2006).

As potentes toxinas que as cianobactérias sintetizam são as microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas (Watanabe 1996; Chorus & Bartram 1999). Segundo suas estruturas químicas, podem ser reunidas em três grupos: alcalóides, peptídeos cíclicos e lipopolissacarídeos (LPS) (Carmichael 1994). Em função da ação farmacológica são classificadas como neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas (LPS) (Sivonen & Jones 1999). As neurotoxinas (saxitoxinas e anatoxinas) e hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas) podem ser consideradas os principais agentes tóxicos produzidos pelas cianobactérias, pois causam sérios danos à vida animal e à saúde humana, podendo até mesmo levar a morte (Jochimsen *et al.* 1998).

As microcistinas são as cianotoxinas mais comuns em águas continentais, estando envolvidas na maioria dos incidentes ambientais e dos casos de intoxicação de animais e de seres humanos e, por isso, são as mais estudadas. As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos e o grupo Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico), que é comum à todas as microcistinas, é apontado como responsável por sua atividade biológica (Chorus & Bartram 1999). A primeira identificação química dessa hepatotoxina foi feita por Bishop *et al.* (1959) que a isolou de uma cultura de *Microcystis aeruginosa*, daí a origem do nome. Atualmente, são conhecidas mais de 70 variantes estruturais deste peptídeo

(Sivonen & Jones 1999; Codd *et al.* 2005). A microcistina-LR é a mais tóxica e a mais comumente encontrada em água doce (Pinho *et al.* 2003).

Além do gênero *Microcystis*, atualmente sabe-se que vários outros como *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc*, também são capazes de produzir microcistinas (Carmichael 1992; Apeldoorn 2007). Até o momento, não há na literatura referência à produção de outro tipo de toxina para seres humanos por espécies de *Microcystis*.

O gênero *Microcystis* é um dos que mais causam problemas em águas continentais de todo mundo devido a sua alta capacidade de formar florações e produzir toxinas. É um gênero colonial que abrange 25 espécies tipicamente planctônicas. As principais características morfológicas desse gênero são colônias formadas por células arredondadas dotadas de aerótopos, arranjas irregularmente em um fino envelope mucilaginoso e cuja divisão celular ocorre em três planos perpendiculares (Komárek 2003).

Ressalta-se que muitos caracteres morfológicos como tamanho das células, espessura da mucilagem e distribuição das células na colônia sofrem alterações quando as células são submetidas a diferentes condições de cultivo (Kuiper-goodman *et al.* 1999; Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001). As mudanças morfológicas que quase sempre ocorrem durante cultura prolongada, geralmente são acompanhadas por mudanças fisiológicas (Whitton & Potts 2000).

A espécie mais conhecida e estudada do gênero é *M. aeruginosa*, que é amplamente distribuída em todo o mundo, frequentemente forma florações e é produtora de microcistinas (Sant'Anna & Azevedo 2000; Hoger 2003).

Outro importante grupo de cianotoxinas, as saxitoxinas, foi inicialmente caracterizado em espécies de dinoflagelados marinhos e foi responsável por diversos casos de intoxicação humana através do consumo de mariscos contaminados (Bittencourt-Oliveira & Molica 2003). Essas toxinas são alcalóides guanidínicos com grupo carbamato que interrompem a comunicação entre neurônios e células musculares pelo bloqueio dos canais de sódio (Roset *et al.* 2001).

A literatura mostra que dentre as cianobactérias somente alguns gêneros filamentosos produzem saxitoxinas: *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* e *Planktothrix* (Sivonen & Jones 1999; Falconer 2005).

Entretanto, durante a triagem toxicológica do banco de cultura de cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica foi encontrada uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (SPC777), isolada do Reservatório Billings, SP, que é capaz de produzir variantes de saxitoxinas (Sant'Anna *et al.* 2010). Porém, após sete anos em cultivo, a

cepa SPC777 deixou de produzir saxitoxinas, além de não mais produzir aerótopos. Segundo Falconer (2005), condições ambientais afetam o desenvolvimento e a concentração de toxinas nas células e tais fatores incluem temperatura, luz, nutriente e estratificação da coluna de água.

Assim, nosso objetivo é o conhecimento dos efeitos da temperatura, irradiância e competição sobre o desenvolvimento, morfometria e produção de cianotoxinas pela cepa SPC777.

1.1. ESTADO DA ARTE

Microcystis aeruginosa é uma espécie de cianobactéria que recebe atualmente grande atenção nas pesquisas em âmbito mundial em razão de possuir ampla distribuição geográfica e formar florações que na maioria das vezes são tóxicas (Falconer 2005).

No Brasil, as florações tóxicas mais bem distribuídas tanto na parte tropical como subtropical do país são aquelas formadas por *M. aeruginosa* (Sant'Anna *et al.* 2008).

Assim, diversos trabalhos são encontrados na literatura referentes às suas toxinas, florações, aspectos ecológicos e fatores relacionados ao seu desenvolvimento. Porém, a quase totalidade desses trabalhos refere-se a cepas isoladas de regiões temperadas.

Em relação a sua ecologia, *M. aeruginosa* tem sido intensamente estudada, especialmente em trabalhos relacionados ao controle de flutuabilidade de suas colônias (Reynolds 1975; Reynolds & Rogers 1976; Reynolds, Jaworski *et al.* 1981; Reynolds 1984; Reynolds *et al.* 1987; Reynolds 1991, 1992, 1997; Silva 2005; Soares 2009).

1.1.1. PRESENÇA DE AERÓTOPOS

Alguns autores relatam que culturas de *M. aeruginosa* quando submetidas a diferentes condições de temperatura, intensidade luminosa e nutriente deixam de produzir aerótopos ou dependendo das condições aumentam o número de aerótopos produzidos (Kappers 1984, Brookes & Ganf 2001).

Kappers (1984) estudou a dinâmica de populações de *M. aeruginosa* no lago Brielle (Holanda) e estudou também material de cultura submetido a diferentes condições de temperatura, intensidade luminosa e nutriente. Culturas com limitação de luz produziram grande número de aerótopos e, por outro lado, quando nitrogênio foi limitante ao crescimento, aerótopos não foram produzidos.

Brookes & Ganf (2001) estudaram a resposta da variação na flutuabilidade de *M. aeruginosa* frente a diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e luz e verificaram que em

culturas de *M. aeruginosa* submetidas à limitação por nitrogênio (0 μM), as células sofriam diminuição no volume dos aerótopos e aumento no conteúdo dos carboidratos, resultando em perda da flutuabilidade. Já as células cultivadas com 100 μM de nitrogênio aumentavam o volume dos aerótopos e metabolizavam carboidratos com mais eficiência do que no tratamento de nitrogênio limitado. Além disso, nas culturas a 100 μM as células apresentavam flutuabilidade positiva. Durante a exposição à luz, as células pré-tratadas a 0 μM de fósforo apresentavam mínimas mudanças na flutuabilidade, embora houvesse diminuição no volume dos aerótopos e aumento dos carboidratos. Em células pré-tratadas a 0,5 μM de fósforo, a proporção de indivíduos flutuantes não mudou embora o volume dos aerótopos e dos carboidratos tivessem aumentado. Em células pré-tratadas a 10 μM de fósforo durante exposição à luz, apresentavam aumento significativo no volume dos aerótopos e, de alguma forma, perda da flutuabilidade devido ao acúmulo de carboidratos.

Mlouka *et al.* (2004) estudaram grupo de genes envolvido na síntese dos aerótopos em *M. aeruginosa* e o rearranjo genético que leva a perda da flutuabilidade. Análises da sequência de um grupo de gene 8.7-kb que compreende 20 genes envolvidos na síntese dos aerótopos foi identificada na tentativa de esclarecer a base para a frequente ocorrência da perda de aerótopos em material de cultura. Para isto quatro aerótopos “mutantes” de duas linhagens de *M. aeruginosa* foram isolados e caracterizados. Seu estudo levantou indícios acerca dos processos envolvidos na perda da flutuabilidade em *M. aeruginosa* e revelou ser necessário a síntese de dois novos genes descritos (*gvpV* e *gvpW*). Porém, os fatores externos envolvidos na perda dos aerótopos em material de cultura não foram ainda esclarecidos.

1.1.2. DESENVOLVIMENTO

No levantamento realizado por Sivonen & Jones 1999, ficou demonstrado que as condições ótimas para o crescimento de *Microcystis* não coincidem necessariamente com as condições ótimas para a produção de microcistinas.

Segundo Chu *et al.* 2007, a temperatura não é somente um fator importante na formação de florações, mas também controla a composição de espécies de cianobactérias. Imai *et al.* (2009) estudaram *in vitro* espécies de *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii* cultivadas em diferentes intervalos de temperaturas (20, 25, 30 e 35°C) e verificaram que a taxa de crescimento de *M. aeruginosa* foi significativamente maior que a de *M. wesenbergii* em temperaturas mais elevadas (30 e 35°C). Entretanto, as taxa de crescimento das duas espécies eram similares em temperaturas mais baixas (20 e 25°C). Nenhuma diferença significativa nas taxas de crescimento entre as duas espécies foi encontrada sob a variação de intensidades de

luz, de concentrações nutrientes ou da presença de predadores. Os autores sugerem que, entre os fatores ambientais examinados, a temperatura da água seja o fator mais importante que determina o domínio das duas espécies de *Microcystis*. Segundo os autores, as mudanças na temperatura da água no verão pode ser um fator fundamental para a sucessão de espécies de *Microcystis*.

Tao *et al.* (2010) estudaram os efeitos de doses sub-letais da irradiação UV-C no crescimento de *M. aeruginosa* e na integridade das células com o objetivo de desenvolver um método potencial para impedir florações de cianobactérias. Os autores verificaram que a sensibilidade de *M. aeruginosa* à irradiação UV-C foi significativamente mais elevada do que aquela observada na clorofícea do gênero *Chlorella*, sugerindo um potencial de aplicação da irradiação UV-C no controle das florações de *M. aeruginosa*.

Nalewajko & Murphy (2001) estudaram o efeito da temperatura e disponibilidade de nitrogênio e fósforo na abundância de *Microcystis* no Lago Biwa, Japão. Estes autores testaram temperaturas de 20, 24, 28, 32 e 35° C na intensidade luminosa de 130 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e verificaram que a menor taxa de crescimento ocorreu na temperatura de 20° C. A taxa de crescimento máxima (1.6 divisões dia^{-1}) ocorreu nas temperaturas de 28° C a 32° C, mas, a temperatura de 35° C não mostrou diminuição significativa no crescimento.

No Brasil há ainda grande lacuna no conhecimento sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis aeruginosa* e apenas alguns trabalhos merecem destaque:

Molica (1996) realizou estudos do efeito da intensidade luminosa no crescimento e na produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* isoladas de corpos de água da cidade do Rio de Janeiro. Uma cepa era produtora de microcistina e a outra não. A intensidade luminosa durante os experimentos foram de 40 e 180 μmol fótons. $\text{m}^2. \text{s}^{-1}$ no entanto, também foi realizado um experimento onde a irradiância foi alterada de 40 para 180 μmol fótons. $\text{m}^2. \text{s}^{-1}$, quando as células atingiram o período entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária. Foram também analisados os seguintes parâmetros fisiológicos: crescimento celular, conteúdo de clorofila *a*, proteínas e carboidratos intracelulares. As maiores velocidades específica de crescimento foram observadas sob a maior irradiância 180 μmol fótons $\text{m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. A síntese de clorofila *a* foi maior nas culturas sob menor intensidade luminosa. A alteração da intensidade luminosa não induziu a produção de microcistinas na linhagem não produtora. A maior concentração de microcistinas ocorreu no período entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária, diminuindo ao longo da fase estacionária. E o maior nível de microcistinas observado ocorreu na intensidade de 40 μmol fótons. $\text{m}^2. \text{s}^{-1}$.

Honda (2005) realizou estudos de desenvolvimento em cepas pertencentes a três morfoespécies de *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. panniformes* e *M. wesenbergii*) submetidas a condições controladas de cultivo. Analisou ainda a variação morfológica em três cepas submetidas a gradientes cruzados entre irradiância e temperatura (*M. aeruginosa* SPC522, *M. panniformes* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771). Os objetivos foram verificar a variabilidade e estabilidade morfológica de *Microcystis* spp. em cultura e natureza e comparar as morfoespécies nas fases exponencial, estacionária e senescente do seu desenvolvimento. De acordo com os experimentos de gradiente-cruzado, as variáveis irradiância e temperatura apresentaram efeito significativo sobre as taxas de crescimento. Sendo a maior taxa de crescimento observada na temperatura de 30 °C e irradiância de 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Além disso, temperatura e irradiância apresentaram efeito significativo sobre o diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso em *M. aeruginosa*.

Bittar *et al.* (2005) avaliaram a liberação de carbono orgânico por células de *M. aeruginosa* em cultura sob diferentes irradiâncias. O objetivo do trabalho foi estudar o efeito da exposição a diferentes irradiâncias nas células de cultura em fase exponencial e inicial de crescimento (8 e 20 dias) de *M. aeruginosa* isolada do Reservatório Barra Bonita, SP. Segundo os autores, as taxas de excreção de matéria orgânica dissolvida, mesmo nas células da cultura mais velhas, foram proporcionais às taxas de fotossíntese em todas as irradiâncias testadas. Entretanto, células das culturas mais velhas liberaram maiores quantidades de compostos de alta massa molecular, incluindo carboidratos, enquanto as das culturas mais novas liberaram compostos de baixa massa molecular, incluindo carboidratos. O decréscimo na concentração de clorofila *a* fornece indícios de ligeira fotooxidação ou fotoaclimação em células no início da fase estacionária.

1.1.3. COMPETIÇÃO COM *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Cianobactérias são conhecidas por serem fortes competidoras por luz (Visser *et al.* 2005). Mas, experimentos com irradiância limitante em culturas contínuas revelaram que *Microcystis* não é particularmente uma forte competidora por luz: segundo Huisman *et al.* (1999), *Microcystis* perdeu a competição quando cresceu em cultura mista com a alga verde *Chorella* e também quando cresceu em cultura mista com a cianobactéria *Aphanizomenon*.

Chu *et al.* (2007) avaliaram os efeitos do EDTA e do ferro no crescimento e na competição de *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus quadricauda* e observaram que a concentração elevada do EDTA diminui a disponibilidade de ferro para *M. aeruginosa*, mas não para o *S. quadricauda*. A razão de responderem diferentemente às concentrações elevadas do EDTA é que suas estratégias da adsorção do ferro devem ser diferentes.

Melgaço (2007) avaliou a influência da luz e nutrientes na competição entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Segundo a autora, é evidente a influência e interação da disponibilidade de luz e nutrientes na competição entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*. No entanto, as respostas são dependentes das cepas, e as generalizações específicas devem ser avaliadas com cuidado.

Granéli & Hansen (2006) realizaram levantamento de espécies de algas e cianobactérias nocivas, das substâncias produzidas por estes organismos e dos efeitos alelopáticos. Neste levantamento, microcistinas produzida por espécie de *Microcystis* spp. foi citada como substância alelopática inibindo a fotossíntese e o crescimento de outros organismos.

Jang & Takamura (2007) examinaram a produção de toxinas por *M. aeruginosa* em resposta à direta exposição de uma cultura axênica da planta aquática *Lemna japonica* Landolt. A exposição da toxina de *M. aeruginosa* inibiu o crescimento de *L. japonica* e a exposição da planta aquática causou aumento de microcistinas produzida e inibiu o crescimento de *M. aeruginosa*. O estudo revelou recíproca resposta alelopática entre *Microcystis* e *Lemna*.

Santos (2009) investigou o impacto provocado por *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre o crescimento de cepa tóxica e não tóxica de *M. aeruginosa* e sobre a produção de microcistinas na cepa tóxica de *M. aeruginosa*. O autor constatou que cepas tóxicas e não tóxicas respondem de forma diferenciada à interação, indicando que microcistina e/ou processos bioquímicos vinculados à sua síntese possam atuar na competição por interferência, produção de alelopáticos e comunicação química.

1.1.4. ESTUDOS QUÍMICOS

A maioria dos trabalhos publicados sobre cianobactérias produtoras de toxinas tem tratado da compreensão dos mecanismos fisiológicos e do papel dos fatores ambientais envolvidos no controle da produção das microcistinas, que são as cianotoxinas com o maior número de registros em todo o mundo. Apesar dos esforços, entretanto, ainda não há uma clareza sobre sua função e nem como sua produção é controlada (Molica & Azevedo 2009).

Compreender como os fatores ambientais afetam a produção das microcistinas em cianobactéria tem sido um desafio para os pesquisadores há quase 40 anos (Orr & Jones 1998). Trabalhos recentes que estudaram cepas de *M. aeruginosa* referem que a produção de microcistinas pode ser influenciada por fatores ambientais como irradiância (Kaebernick *et al.* 2000, Wiedner *et al.* 2003), nitrogênio (Orr e Jones 1998, Long *et al.* 2001), bem como

efeitos alelopáticos interespecíficos (Jang e Takamura 2007), intraespecífico (Santos 2009) e competição (Melgaço 2007).

Minillo *et al.* (2000) estudaram concentrações de microcistinas nas formas coloniais de *M. aeruginosa* em florações no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. e constataram que diferentes formas coloniais de *M. aeruginosa* são indicadoras dos níveis intracelulares de toxinas nos eventos de florações.

Trabalhos com cepas de *Microcystis aeruginosa* e *Oscillatoria agardhii* Gomont, realizados com material de regiões temperadas, indicam que a maior produção de toxinas (microcistinas) ocorre no final da fase exponencial de crescimento e fatores como luz, temperatura e nutrientes têm influência direta sobre esta produção (Van der Westhuizen & Eloff 1985; Sivonen 1990, 1996; Watanabe 1996; Wiedner *et al.* 2003). Tais informações mostram também que estes fatores ambientais possuem papel fundamental sobre a taxa de crescimento, tamanho de células e colônias, além da produção de toxinas em diversas cianobactérias (Sivonen 1990; Wiedner *et al.* 2003, Imai *et al.* 2009).

Van der Westhuizen & Eloff (1985) realizaram estudos com temperatura e produção de toxinas por *M. aeruginosa* e determinaram que a taxa mais elevada de crescimento em cultura foi obtida a 32°C, enquanto a maior produção de microcistinas foi encontrada a 20°C.

Utkilen & Gjølme (1992) investigaram a relação entre intensidade luminosa e produção de toxinas (microcistina) em colônias de *M. aeruginosa* assim como, em células isoladas em cultura, com intensidade luminosa variando de 20 a 75 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O maior pico de produção de toxinas por unidade de peso seco ocorreu na irradiância de 40 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Sivonen & Jones (1999) realizaram levantamento de espécies de cianobactérias tóxicas e sua distribuição geográfica. No levantamento, florações hepatotóxicas de *M. aeruginosa* foram frequentemente citadas em todo o mundo.

Em relação à produção de saxitoxinas, poucos trabalhos foram realizados para verificar o papel dos fatores ambientais e a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no controle destas toxinas. Kellmann *et al.* (2008) descreveram o provável cluster de genes (*stx*) responsáveis pela biossíntese de saxitoxinas em cianobactéria. A filogenia do cluster *stx* sugere que o grupo inteiro dos genes exigidos para a biosíntese de saxitoxinas pode se difundir pela transferência horizontal de gene. Sant'Anna *et al.* (2010), ao estudar a linhagem SPC777 *Microcystis aeruginosa*, verificaram que após quatro anos em cultivo a cepa perdeu os aerótopos e, assim, ficou bastante semelhante a outros gêneros de cianobactérias. Por tratar-se de uma linhagem diferente, foram feitos estudos morfológicos e

moleculares para confirmação da espécie. Os estudos moleculares mostraram 100% de similaridade com *M. aeruginosa*. Além disso, foram realizados estudos toxicológicos com esta cepa e detectou-se a presença de saxitoxina e goniautoxinas, o que é totalmente inusitado no gênero *Microcystis*. Como este é o primeiro estudo, em termos mundiais, de produção de saxitoxinas por uma cepa de *M. aeruginosa*, nosso trabalho baseou-se nas informações já existentes para a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Segundo Carneiro *et al.* (2009), concentrações mais elevadas de saxitoxinas (STX) e de neosaxitoxina (NSTX) produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* foram observadas em culturas sob irradiância de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Kellmann & Neilan (2007) descreveram a otimização *in vitro* da biosíntese de saxitoxinas e a caracterização de suas exigências bioquímicas. Os autores demonstraram que a biosíntese de STX é induzida pela luz. Castro *et al.* (2004) estudaram o efeito da temperatura no crescimento e na produção de saxitoxinas de *C. raciborskii* e neste estudo foram testadas temperaturas de 19 e 25 °C. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada no índice de saxitoxinas nas células ou nos meios extracelulares. Ferrão-Filho *et al.* (2008) descreveram que as saxitoxinas causaram efeitos paralisantes nos movimentos natatórios em cladóceros, portanto, possível hipótese para a função das saxitoxinas aponta para o papel contra herbivoria do zooplâncton. Conforme Figueredo *et al.* (2007), a maior parte das espécies “alvo” testadas foi sensível ao extrato de *C. raciborskii*, apresentando intenso efeito inibitório nas atividades fotossintéticas. Já segundo Leflaive & Ten-Hage (2007), dentre as toxinas produzidas por cianobactérias apenas os peptídeos cíclicos são considerados compostos alelopáticos. Além disso, os autores relatam que não haviam sido atribuídas atividades biológicas ou fisiológicas em muitos destes compostos produzidos pelas cianobactérias.

Além da incerteza sobre a função das cianotoxinas, também não é claro o papel dos fatores ambientais no controle da produção dessas toxinas (Molica & Azevedo 2009). Assim, acredita-se que os fatores ambientais influenciam a produção de cianotoxinas de duas maneiras: 1) regulando a abundância das cepas produtoras de toxinas e/ou 2) regulando a produção de toxinas por cepas toxigênicas. Foi com base neste conceito que o presente trabalho foi desenvolvido.

2. OBJETIVOS

1. Conhecer os efeitos da irradiância no crescimento, morfologia e produção de cianotoxinas pela Cepa SPC777.
2. Conhecer os efeitos da temperatura no crescimento, morfologia e produção de cianotoxinas pela Cepa SPC777.
3. Conhecer os efeitos da competição entre *Raphidiopsis brookii* SPC338 e *Microcystis aeruginosa* SPC777, em relação ao crescimento e produção de toxinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS ESTUDADAS

O estudo foi realizado com as cepas *Microcystis aeruginosa* SPC777 (Ordem Chroococcales, Família Microcystaceae) e *Raphidiopsis brookii* SPC338 (Ordem Nostocales, Família Nostocaceae) (figura 1), ambas pertencentes ao Banco de Cultura de Cianobactérias do Instituto de Botânica (figura 2). As cepas são procedentes do Riacho Grande, braço do reservatório Billings, SP, que é um sistema eutrófico e é usado para abastecimento público, recreação, pesca, irrigação e controle de enchentes (Carvalho 2003). A cepa SPC777 foi coletada em fevereiro de 2000 e a cepa SPC338 em agosto de 1997.



Figura 1. Aspecto geral das cepas *Raphidiopsis brookii* SPC338 e *Microcystis aeruginosa* SPC777 cultivadas em laboratório. Escala=10 μ m.



Figura 2. Aspecto geral do banco de culturas de cianobactérias do Instituto de Botânica.

3.2.CULTURAS MONOESPECÍFICAS EM LABORATÓRIO

As culturas foram mantidas em 3 replicas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura ASM-1 (Tabela 1) e pH 7,4 . Antes de se colocar o inóculo, os tubos foram fechados com rolhas de plástico autoclavável ou algodão, e em seguida esterilizados em autoclave por um período de 30 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1,5atm. Depois de esterilizados foram resfriados até temperatura ambiente para o uso. A troca do meio de cultura foi feita a cada 30 dias dentro da câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70% e exposta à luz UV durante 30 minutos. O repique foi feito em dois tubos novos com meio de cultura autoclavado (figura 3) e mantidos em sala com condições controladas: temperatura 23 ± 2 °C, irradiância $40\text{-}50 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 14-10h claro-escuro (Azevedo & Sant'Anna 2003). As cepas foram repicadas com auxílio de pipetas tipo Pasteur, esterilizadas em embalagem hermeticamente fechada e abertas somente dentro da câmara de fluxo laminar.

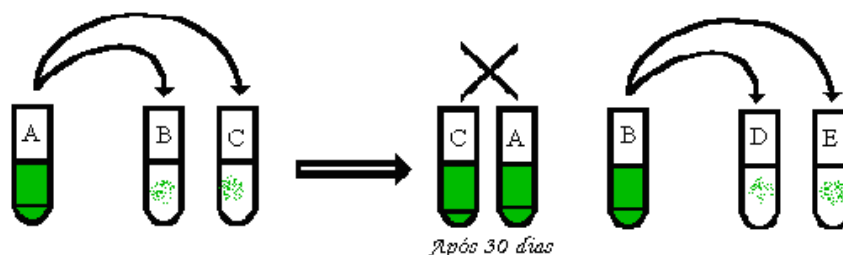


Figura 3. Esquema do processo de repicagem.

3.3.CONTROLES E TRATAMENTOS

Todos os controles e tratamentos foram feitos com três repetições (n=3).

- Controles: Cepas SPC777 e SPC338 mantidas em sala com condições controladas (irradiância de $40\text{-}50 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura 23 ± 2 °C, meio ASM-1 e fotoperíodo de 14h luz: 10h escuro).
- Tratamento 1 (realizado em câmara de crescimento): Cepa SPC777 mantida nas mesmas condições do controle com exceção da temperatura que foi alterada para 30 °C.
- Tratamento 2: Cepa SPC777 mantida nas mesmas condições do controle com exceção da intensidade luminosa que foi alterada para $100\text{-}120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para este tratamento, utilizou-se duas lâmpadas tubulares fluorescentes de 40 W, luz do dia (OSRAM), dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.
- Tratamento 3: Estudo de competição entre *M. aeruginosa* SPC777 e *R. brookii* SPC338. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições do controle. Com base nas

respectivas curvas de crescimento, foram inoculados 50 mL de cada espécie, coletados no ponto de antes do primeiro decréscimo (Fase 1).

Foram realizadas análises morfométricas, de clorofila *a* e produção de cianotoxinas para os controles e tratamentos, sendo as amostras coletadas conforme definido pela curva de crescimento nos seguintes períodos:

FASE (1):

Foi considerado como fase 1 o período entre o 1º e o 15º dia.

FASE (2):

Com base na linha de tendência das curvas, foi possível verificar que as cepas não entraram em senescência até a última contagem (39º dia) e, portanto, decidiu-se retirar uma amostra na fase estacionária de crescimento. Foi considerado como fase 2, o período de maior estabilidade da curva e de menor desvio padrão: para o controle ocorreu no 31º dia e para as cepas mantidas na temperatura de 30º C (tratamento 1) e na intensidade luminosa de 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (tratamento 2) foi no 27º dia.

- ✓ Controle SPC777- Fase 1 e Fase 2 de crescimento;
- ✓ Tratamentos 1 e 2 - Fase 1 e Fase 2 de crescimento;
- ✓ Tratamentos 3 - uma única amostra na Fase 1 de crescimento;
- ✓ Controle SPC338- uma única amostra na Fase 1 de crescimento.

3.4.COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Tabela 1. Composição do meio de cultura ASM-1 (Gorham *et al.* 1964), com modificações (Zagatto & Aragão 1992) .

Composição das Soluções-estoque para ASM-1		
Soluções – estoque	Nutrientes	Quantidade (g L ⁻¹)
Sol. A		
	NaNO ₃	8,5000
	MgSO ₄ 7H ₂ O	2,4500

	MgCl ₂ 6H ₂ O	2,0500
	CaCl ₂ 2H ₂ O	1,4500
Sol. B		
	KH ₂ PO ₄	8,7000
	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	17,8000
Sol. C		
	H ₃ BO ₃	28,4000
	MnCl ₂ 4H ₂ O	13,9000
	FeCl ₂ 6H ₂ O	10,8000
	ZnCl ₂	3,3500
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,1900
	CuCl ₂ 2H ₂ O	0,0140
Sol. D		
	EDTA tritriplex	18,6000

Preparo de 1000 mL de meio ASM-1

Soluções-estoque

A	20 ml
B	2 ml
C	0,1 ml
D	0,4 ml

3.5.PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A produção de biomassa foi realizada a partir de um repique do banco de cultura, nas mesmas condições do controle e conforme as seguintes etapas:

- a) 5 mL de inóculo foram transferidos para recipiente com 50 mL de meio de cultura ASM-1: os frascos foram mantidos em agitador de bancada com rotação constante (70 rotações. minuto⁻¹).
- b) constatado o crescimento da cultura, transferiu-se 50 mL do inóculo para 500 mL de meio, mantendo sempre a mesma rotação mencionada. As cepas ficaram sob esta condição durante 1-2 semanas (tempo médio para que a cultura atinja a fase exponencial de crescimento). Portanto, o inóculo inicial para determinação da curva foi retirado na fase exponencial.
- c) Dos 500 mL de inóculo, 50 mL (10^5 – 10^6 células. mL⁻¹) foram transferidos para erlenmeyer de 1.000 mL com 500 mL de meio de cultura. Os erlenmeyers foram colocados na sala de cultivo com as mesmas condições controladas e sem aeração. As curvas de crescimento foram realizadas a partir desta biomassa e, para os estudos de competição e análises das cianotoxinas, o volume foi aumentado para 1.000 mL.

3.6.DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento foram estabelecidas a partir do biovolume das cianobactérias (mm³.L⁻¹) plotados contra o tempo de cultivo. Foram determinadas seis curvas de crescimento a partir da média de cada controle e cada tratamento (n=3).

3.6.1. BIOMASSA (BIOVOLUME – MM³ L⁻¹)

O volume celular (V) foi obtido a partir da média do comprimento (a) e diâmetro (b) de trinta células, usando modelos geométricos aproximados à forma das células de *M. aeruginosa* e *R.brookii* (Sun & Liu 2003).

O biovolume total foi estimado multiplicando-se a densidade celular por seus respectivos volumes (Sun & Liu 2003). Os valores obtidos em µm³.mL⁻¹ foram divididos por 10⁻⁶ para conversão em mm³.L⁻¹.

3.6.2. DENSIDADE (CÉLULAS. ML⁻¹)

Para determinação das curvas de crescimento de *M. aeruginosa* SPC777 foram realizadas contagens do número de células em câmara de Fuchs-Rosenthal (figura 4). Foram contadas as células de no mínimo uma área da câmara, o que corresponde a 16 quadrados da mesma. As contagens foram realizadas a cada dois dias, sendo estabelecido um número máximo de 200 células por contagem (caso excedesse este número, uma nova contagem teria que ser realizada após a diluição da amostra). Foram feitas contagens nos dois lados da

câmara e, caso houvesse diferença maior que 10% entre os lados, também era realizada uma nova contagem.

Para determinação da curva de crescimento de *R. brookii* SPC338 foram realizadas contagens dos filamentos e este número foi multiplicado pelo número médio de células dos filamentos ($n=90$) e em seguida pelo biovolume. As contagens também foram realizadas a cada dois dias em câmara de Fuchs-Rosenthal, em todo o campo 16 área o que corresponde a 256 quadrados da câmara.

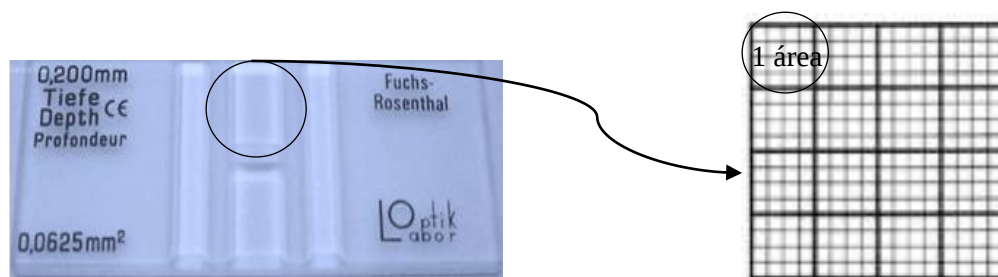


Figura 4. Câmara de Fuchs-Rosenthal utilizada para a determinação das curvas de crescimento e em destaque um dos campos da câmara.

A tabela 2 apresenta o fator de multiplicação necessário para conversão do número de células contadas, para n° . de células. mL^{-1} .

Tabela 2. Fatores de conversão para determinação do n° de células. mL^{-1} (Honda 2005)

Área	n° de células mL^{-1}
1/16 de A	n° de cel. X 80.000
1/8 de A	n° de cel. X 40.000
1/4 de A	n° de cel. X 20.000
1/2 de A	n° de cel. X 10.000
1 A (16)	n° de cel. X 5.000
2 A (32 □)	n° de cel. X 2.500
4 A (64 □)	n° de cel. X 1.250
8 A (128 □)	n° de cel. X 625
16 A (256 □)	n° de cel. X 312,5

3.7. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO, TEMPO DE DUPLICAÇÃO E RENDIMENTO CELULAR MÁXIMO.

Após a determinação da curva, foram calculadas as taxas de crescimento (μ . dia⁻¹) e o tempo de duplicação (G. dia⁻¹) para a fase exponencial de cada espécie analisada. Estas taxas foram calculadas com a média das contagens dos três frascos (n=3), segundo as fórmulas apresentadas por Fogg & Thake (1987):

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) \cdot (t - t_0)^{-1} \quad G = \ln 2 \cdot \mu^{-1}$$

μ é a velocidade específica de crescimento.

G é o tempo de duplicação celular, calculado a partir de μ .

N_0 é o número inicial de células. mL⁻¹ no tempo inicial t_0 .

N é o número final de células. mL⁻¹ no tempo t .

Foi calculado também o rendimento celular máximo (R), medido em células. mL⁻¹, que corresponde ao número máximo de células menos o número de células do inóculo (Carneiro, 2005). Para o estudo de competição foi avaliado, além do R, a razão (Marinho & Azevedo 2007) entre a densidade celular no 15 ° dia e o número de células do inóculo. Os resultados de R e a razão foram baseados na média das contagens de células dos 3 frascos (n=3)

.

3.8. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

As análises morfológicas e métricas foram realizadas em amostras controles e nos diferentes tratamentos, sob microscópio óptico binocular Zeiss Axioskop-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com contraste de fase, ocular micrometrada, câmara clara e câmara digital Sony Cybershot acoplada.

Foram feitas 60 medidas de cada característica métrica de interesse taxonômico: medidas do diâmetro dos filamentos e das células. Todas as diferentes fases de crescimento foram descritas detalhadamente e ilustradas com fotografias. As duas cepas estudadas já foram identificadas em termos morfológicos e moleculares (Melcher 2007; Fiore, comunicação pessoal).

3.9. ANÁLISE DE CLOROFILA *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Para análise de clorofila *a* foram retirados 100- 200 mL de amostra, em três repetições (n=3).

CLOROFILA *a*

As amostras foram filtradas em filtros Whatman GF/F, 47 mm de diâmetro e 0,6-0,7 μm de tamanho de poro. A filtração ocorreu em local protegido de luz direta e sob baixa pressão (0,3 atm). Ao todo foram processadas 30 amostras. A técnica de extração dos pigmentos foi realizada conforme Marker *et al.* (1980) e Sartory & Grobelaar (1984). Os filtros foram colocados em tubos de vidros revestidos com papel alumínio para impedir a exposição da luz que promove a degradação da clorofila. Foram adicionados 10 mL de solvente orgânico etanol 90% (90 mL de etanol para 10 mL de água destilada). Os tubos colocados em um becker coberto com papel alumínio, foram levados ao banho-maria à temperatura de 78 °C, durante 5 minutos. Logo em seguida foi provocado choque térmico. Para isso os tubos foram transferidos para um becker envolvido com papel alumínio e com gelo, a fim de que a temperatura se aproximasse da temperatura ambiente. Cinco minutos após, os tubos foram retirados do recipiente e foram mantidos em geladeira e no escuro (coberto com papel alumínio) por 24 horas.

Para a leitura da amostra, foi utilizado como branco o solvente orgânico (etanol 90%), tanto em 665 nm como em 750 nm. As amostras foram homogeneizadas e imediatamente foi processada a leitura em cubetas de 1 cm nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm.

A fórmula utilizada para obtenção da concentração de clorofila *a* foi a seguinte:

$$\text{Clor } a \text{ } (\mu\text{g.L}^{-1} \text{ ou g.m}^{-3}) = \frac{(E_b - E_a) \cdot (R/R-1) \cdot K \cdot v}{V \cdot L}$$

Onde:

E_b = absorbância do extrato a 665nm, antes da acidificação, menos a absorbância a 750nm.

E_a = absorbância do extrato a 665nm, após a acidificação, menos a absorbância a 750nm.

R = 1,72 (razão de rendimento da clorofila-a não acidificada para acidificada, conforme Wetzel & Likens, 1990).

R/R-1 = 2,39

K = coeficiente de absorção da clorofila *a* = $1000/87 = 11,49$ (para etanol).

v= volume do solvente utilizado (etanol) em ml (usualmente 10 mL)

L = comprimento da cubeta em cm (=1)

V = volume da água filtrada em litros

Os resultados da concentração de clorofila *a* foram transformados para μg de Chl *a* 10^6 células⁻¹.

A amostra foi acidificada com HCL (0,5-1N) até o pH ficar entre 2,6 e 2,8. Aguardou-se cerca de 5 minutos para que toda a clorofila fosse degradada e uma nova leitura foi efetuada em 665 e 750 nm.

3.10. ESTUDO QUÍMICO

A pesquisa de microcistinas e de saxitoxinas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no Laboratório de Química da Seção de Ficologia. Para tanto, de cada amostra cultivada (controles e tratamentos), foram retirados 400 mL (n = 3).

3.10.1. PREPARO DOS EXTRATOS DAS BIOMASSAS

Cada uma das amostras (400 mL) foi submetida ao seguinte procedimento: a biomassa foi liofilizada, pesada e extraída, sob ação de ultrassom (4x, 30 sec., 100 W), com ácido acético 0,1 M (Pyo & Shin 2002). Os extratos combinados foram centrifugados ($1.830 \times g$, 50 min) e o sobrenadante foi coletado e liofilizado. O extrato seco foi fracionado por aplicação à coluna de gel de sílica octadecilsilanizada (C₁₈) (Bond Elut) pré-condicionada, sendo eluído em gradiente formado por:

- (1) ácido acético 0,1 M;
- (2) ácido acético 0,1 M /acetonitrila 80:20 (v/v);
- (3) ácido acético 0,1 M /acetonitrila 50:50 (v/v);
- (4) ácido acético 0,1 M /acetonitrila 10:90 (v:v) e
- (5) acetonitrila 100%.

As frações obtidas, denominadas (1), (2), (3), (4) e (5), respectivamente, foram liofilizadas ou evaporadas para a eliminação do solvente orgânico e a seguir, também liofilizadas (figura 4).

3.10.2. ANÁLISE DE SAXITOXINAS

A fração (1) foi encaminhada para análise de saxitoxinas (Stranghetti 2007) realizada segundo o seguinte protocolo: 5 mg do liofilizado da fração (1) de cada uma das amostras foram re-suspendidos em ácido acético 0,1 M, submetidos à reação de derivatização segundo Lawrence & Niedzwiadek (2001), filtrados através de membrana de porosidade 0,20 µm e submetidos à CLAE, sob as seguintes condições (Stranghetti 2007):

- Cromatógrafo líquido Dionex, equipado com bomba automática P680 HPLC;
 - Coluna analítica C₁₈ ZORBAX ODS, 4,6 x 250 mm, 5 µm; *Loop* de 50 µL;
 - Detector de fluorescência Dionex modelo RF200, com excitação de 340 nm e emissão de 390nm.
 - Injetor automático com injeções variáveis 20 µL – 2.500 µL
 - Software Chromeleon® Chromatography Management System, versão 6.6, para a geração e análise dos cromatogramas.
 - Fases móveis: solvente A – formiato de amônio 0,1 M e solvente B – acetonitrila em formiato de amônio 0,1 M 95:5 (v:v), ambos ajustados para pH 6,0 por adição de 6 mL de ácido acético 0,1 M.
 - Gradiente: 0 a 20% de B nos primeiros 15 minutos; 20 a 80% de B em 23 minutos; 80 a 20% de B em 27,5 minutos e 0% de B em 40 minutos. Fluxo: 1mL/min.
- Padrão de saxitoxinas: Food & Drug.

A quantificação de saxitoxinas foi feita correlacionando-se o valor da área obtida por análise cromatográfica (CLAE) de quantidade conhecida de padrão (Food and Drugs Japan) com as áreas dos picos das amostras, obtidos também nas mesmas condições.

Derivatização da amostra

A derivatização das amostras foi realizada segundo o protocolo: 125 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10% e 1.250 µL de hidróxido de sódio 0,1 M foram adicionados a 500 µL de amostra [fração (1)]; após dois minutos em temperatura ambiente, a reação de oxidação em curso foi interrompida pelo acréscimo de 100 µL de ácido acético glacial (Bates & Rapoport 1975; Lawrence & Niedzwiadek 2001). O processo de derivatização transforma as moléculas das saxitoxinas em derivados fluorescentes (Bates & Rapoport 1975).

3.10.3. ANÁLISE DE MICROCISTINAS

A fração (3) foi analisada segundo método de Harada *et al.* (1999), sob as seguintes condições:

- Cromatógrafo líquido Dionex, equipado com bomba automática P680 HPLC;
- Coluna Zorbax ODS analítica (250 X 4,6 mm com partículas de 5 microns).
- Detector UV-PDA; comprimentos de onda fixos: λ 220 e 239nm
- Injetor automático com injeções variáveis 20 μ L – 2.500 μ L
- Fases móveis: solvente A: ácido trifluoracético (TFA) 0,1% e Solvente B: acetonitrila (ACN)/TFA 0,1%;
- Gradiente: 5 a 95% de B em 60 min.
- Fluxo: 1 mL/min.

A quantificação de microcistinas foi feita utilizando-se curva analítica obtida com os padrões das microcistinas LR e RR SIGMA de 95% de pureza.

Cada uma das substâncias (expressas por picos, nos cromatogramas) teve seu espectro UV comparado aos espectros UV das microcistinas LR e RR, para cálculo de semelhança.

Construção das curvas Analítica das microcistinas LR e RR

As curvas analíticas (4 pontos) das microcistinas LR e RR foram construídas a partir dos dados gerados pela análise cromatográfica (áreas) de amostras contendo pesos crescentes dessas microcistinas, pesos esses mostrados nas tabelas 3 e 4. As concentrações das soluções estoque empregadas, preparadas a partir dos Padrões Sigma[®], foram de 2.500 μ g.L⁻¹ para ambas as microcistinas.

Tabela 3. Quantidades de microcistina-LR empregadas para a construção da curva analítica e os respectivos volumes em que estavam contidas (volume da injeção).

Massa de Microcistina-LR (μ g)	Volume Injetado (μ L)
0,05	25
0,05	25
0,1	50
0,1	50
0,15	75
0,15	75

0,2	100
0,2	100

Tabela 4. Quantidades de microcistina-RR empregadas para a construção da curva analítica e os respectivos volumes em que estavam contidas (volume da injeção).

Massa de Microcistina-RR (µg)	Volume Injetado (µL)
0,025	25
0,025	25
0,05	50
0,05	50
0,075	75
0,075	75
0,1	100
0,1	100
0,2	200
0,2	200

A extração das microcistinas LR e RR com ácido acético, segundo Pyo & Shin (2002), tem rendimento de 100%. Lawton & Edwards (2001), apesar de considerarem a extração com ácido acético menos eficiente, recomendam o método, por considerarem-no correto. Em caso da extração de cianotoxinas alcaloídicas, o ácido acético é o solvente indicado (Lawton & Edwards, 2001).

Para esse estudo, escolhemos realizar a extração de microcistinas e de saxitoxinas com ácido acético 0,1 M, pois um só procedimento possibilitou pesquisar a presença dessas duas classes de substâncias e acompanhar a variação das quantidades, o surgimento e a supressão dos peptídeos eluídos na fração(3).

A afirmativa de que a saxitoxina elui na fração (1), no procedimento de extração em fase sólida descrito anteriormente, baseia-se em estudos prévios. Por motivos idênticos, é possível afirmar que a microcistina elui na fração (3) (Carvalho, L. R *et al.* 2008).

Para compararmos as produções dos metabólitos especiais da cepa SPC777 e de seu competidor SPC 338, comparamos os perfis cromatográficos, obtidos em condições idênticas,

dos extratos das culturas uniespecíficas, com os perfis dos extratos das culturas mistas (cultivo de 2 organismos juntos, em competição).

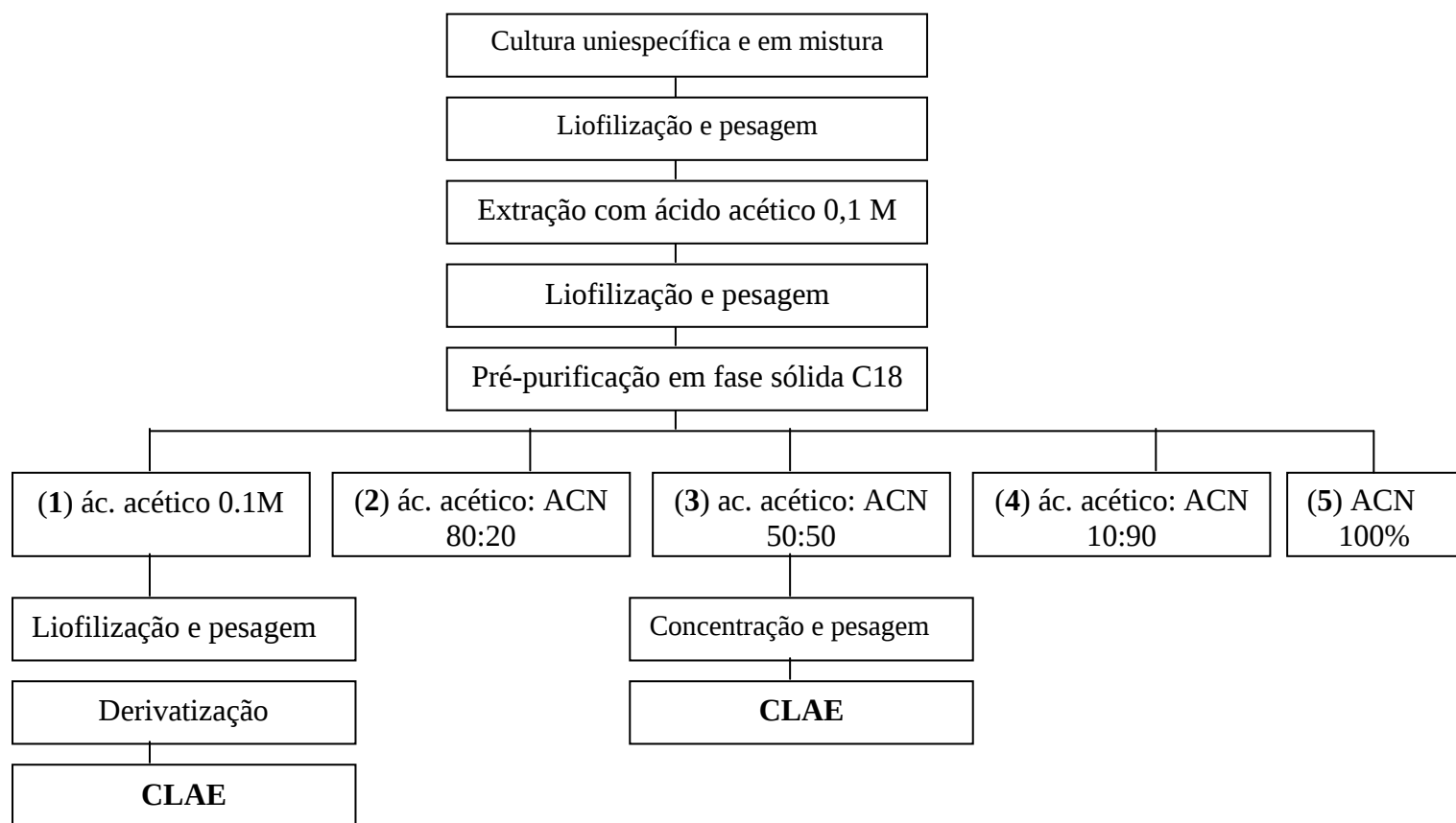


Figura 4. Esquema de fracionamento, purificação e quantificação das microcistinas LR e RR e das saxitoxinas.

3.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator e quando esta análise apresentou variação significativa ($p < 0,05$) foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 5.0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 5 e figura 5 estão ilustradas as taxas de crescimento para a fase exponencial. A taxa de crescimento foi maior no tratamento 2 ($P<0,05$) em relação ao controle e ao tratamento 1. A menor taxa de crescimento ocorreu no T.1 ($P<0,05$), havendo diferenças significativas com relação ao controle e T.2.

Tabela 5. Taxa de crescimento e tempo de duplicação da cepa SPC 777, na fase exponencial de crescimento do controle e dos tratamentos 1 e 2. Valores médios ($n=3$). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

	Fase exponencial (dia)	Taxa de crescimento (μ . dia ⁻¹)	Tempo de duplicação (G. dia ⁻¹)
Controle	4-12	0,183 ^a	3,8 ^a
Tratamento 1 (temperatura 30°)	4-12	0,111 ^b	6,2 ^b
Tratamento 2 (irradiância 100-120 μ mol)	2-8	0,245 ^c	2,8 ^c

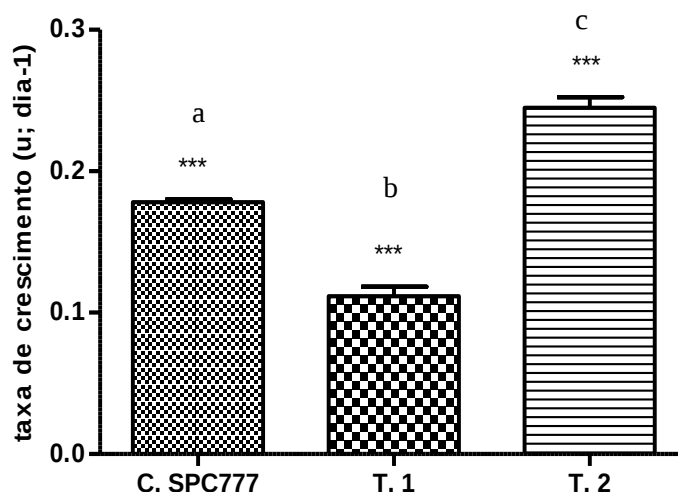


Figura 5. Valores da taxa de crescimento de *M. aeruginosa* (SPC777) referentes ao controle e tratamentos 1 e 2, na fase exponencial de crescimento. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$). C = Controle; T= Tratamento. Asteriscos significam grau de significância.

4.1.FASE 1:

Na tabela 6 e figura 6 estão ilustradas os rendimentos celulares para a fase 1. O menor rendimento celular foi encontrado no T.1 ($P < 0,05$) e não houve diferença significativa do T.2 em relação ao controle.

Tabela 6. Rendimento celular (R) da cepa SPC 777 na fase 1 de crescimento do controle e dos tratamentos 1 e 2. Valores médios ($n=3$). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$).

	Fase 1 (dia)	Rendimento celular (célula. mL ⁻¹)
Controle	1-15	$12,6.10^6$ ^a
Tratamento 1 (temperatura 30°)	1-15	$6,83.10^6$ ^b
Tratamento 2 (irradiância 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	1-15	$12,4.10^6$ ^a

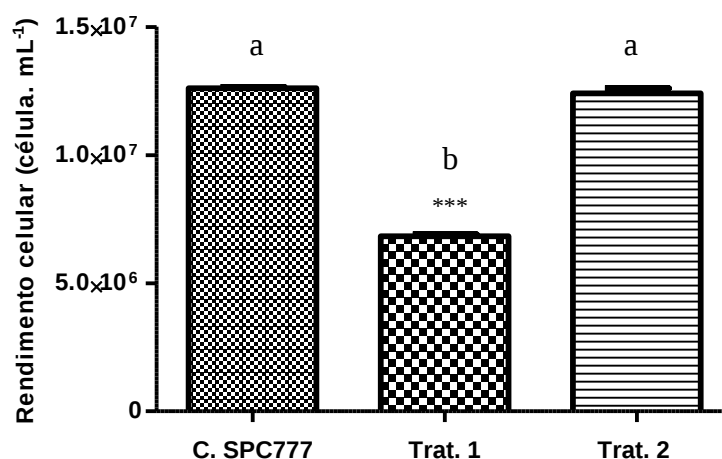


Figura 6. Valores do rendimento celular de *M. aeruginosa* (SPC 777) referentes ao controle e tratamentos 1 e 2, na fase 1. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$). C= Controle Trat= Tratamento. Asterisco significa grau de significância.

Na figura 7 está ilustrada a biomassa (biovolume) para a fase 1. A maior biomassa foi medida no T.1 ($P < 0,05$) e não houve diferença significativa do T.2 em relação ao controle.

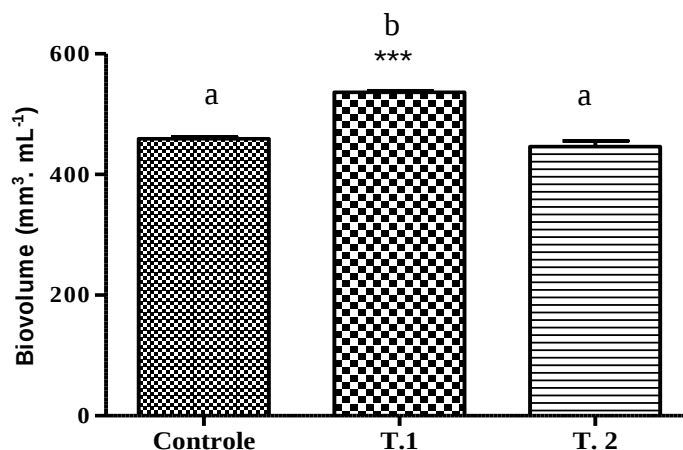


Figura 7. Valores do biovolume de *M. aeruginosa* (SPC 777) referentes ao controle e tratamentos 1 e 2, na fase 1 – 15º dia. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$). T.= Tratamento. Asterisco significa grau de significância.

4.2.FASE 2:

Na figura 8 está ilustrada a biomassa para a fase 2. Pode-se observar que não houve diferenças significativas em relação à biomassa para o controle e tratamentos 1 e 2 ($P > 0,05$).

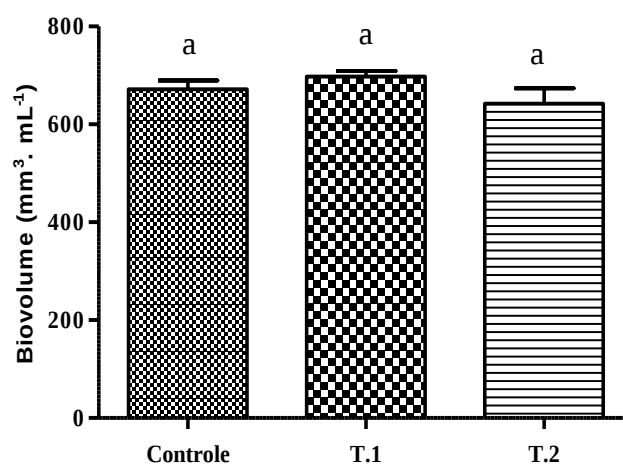


Figura 8. Valores do biovolume de *M. aeruginosa* (SPC777) referentes ao controle e tratamentos 1 e 2, na fase 2 de crescimento. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras similares não diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único. T.= Tratamento.

4.3. CURVA DE CRESCIMENTO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* SPC 777

4.3.1. EFEITO DO AUMENTO DA TEMPERATURA

Na figura 9 são apresentadas as curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (SPC 777) mantidas a 23° C (controle) e a 30° C (tratamento 1). O aumento da temperatura ocasionou o aumento da biomassa das culturas mantidas à 30° C. No entanto, no tratamento 1 houve diminuição do crescimento celular, evidenciado pela menor taxa de crescimento (tabela 5; figura 5) e consequente aumento no tempo de geração (tabela 5) das células ($p < 0,05$).

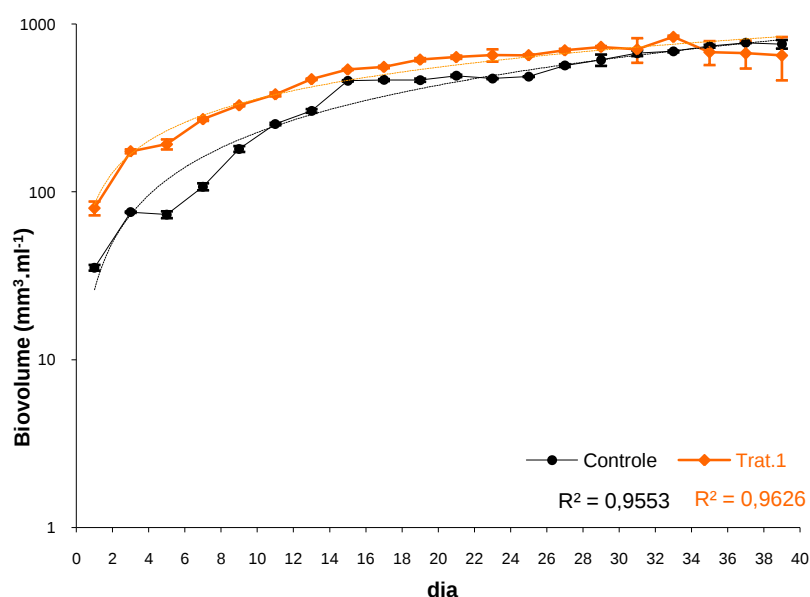


Figura 9. Variação do crescimento de *M. aeruginosa* (SPC 777). Barras indicam o desvio padrão das médias (n=3). Coeficiente de correlação (R^2) corresponde à linha de tendência. Controle, 23±2° C; Tratamento 1, 30° C.

Trabalhos semelhantes que avaliaram a influência da temperatura sobre o crescimento de *M. aeruginosa* demonstraram que a temperatura ótima de crescimento de *M. aeruginosa* foi registrada entre 30 e 35° C (Van der Westhuizen & Eloff 1985; Coles & Jones 2000; Nalewajko & Murphy 2001; Tsujimura 2003; Honda 2005; Chu *et al.* 2007). Diferentemente do que encontrado em nosso estudo, estes autores documentaram maiores taxas de crescimento (μ) nas temperaturas mais elevadas. No entanto, Imai *et al.* (2009a), que estudaram *in vitro* cepas de *M. aeruginosa* em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35° C) na irradiância de 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, não encontraram diferenças significativas entre as temperaturas de 25, 30 e 35° C, respectivamente $\mu = 0,31$, $\mu = 0,47$ e $\mu = 0,45$.

A cepa SPC777 além de apresentar menor taxa de crescimento na temperatura de 30° C, também apresentou taxas inferiores do que relatado na literatura para *M. aeruginosa*, tanto para a temperatura de 23 °C ($\mu = 0,18$), como para a temperatura de 30 °C ($\mu=0,11$) (Van der Westhuizen & Eloff 1985; Nalewajko & Murphy 2001; Tsujimura 2003; Honda 2005; Chu *et al.* 2007; Santos 2009). Por outro lado, Imai *et al.* (2009a) observaram taxa de crescimento semelhante ao presente estudo, para *M. wesenbergii* na temperatura de 25° C ($\mu=0.16$). Entretanto, na temperatura de 30° C esta espécie apresentou taxa de crescimento de 0,20, o que é maior do que a observada para a linhagem em estudo. Com base nas taxas de crescimento, estes autores sugerem ainda que a temperatura favorável para o crescimento de *M. aeruginosa* deve ser mais elevada do que aquelas para *M. wesenbergii*, o que não condiz com nosso trabalho

Deste modo, dentro das condições experimentais adotadas no presente estudo, os resultados obtidos indicam que estas não foram as condições ótimas para o crescimento *in vitro* da cepa *Microcystis aeruginosa* SPC777: na temperatura de 30 °C houve diminuição do rendimento celular e da taxa de crescimento, apesar do aumento da biomassa. Estas diferenças em relação aos dados de literatura podem ser resultantes das características específicas da cepa SPC 777, que se mostrou diferente das demais cepas de *Microcystis* também em relação à produção de toxinas (Sant'Anna *et al.* 2010).

4.3.2. EFEITO DO AUMENTO DA IRRADIÂNCIA

Na figura 10 são apresentadas as curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (SPC 777) mantidas sob 40-50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle) e 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tratamento 2). O aumento da irradiância não ocasionou o aumento da biomassa das culturas mantidas a 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 7 e 8) ($P>0,05$). No entanto, houve relação positiva entre o aumento da irradiância e a taxa de crescimento (tabela 5; figura 5) das células mantidas sob a maior irradiância ($P<0,05$).

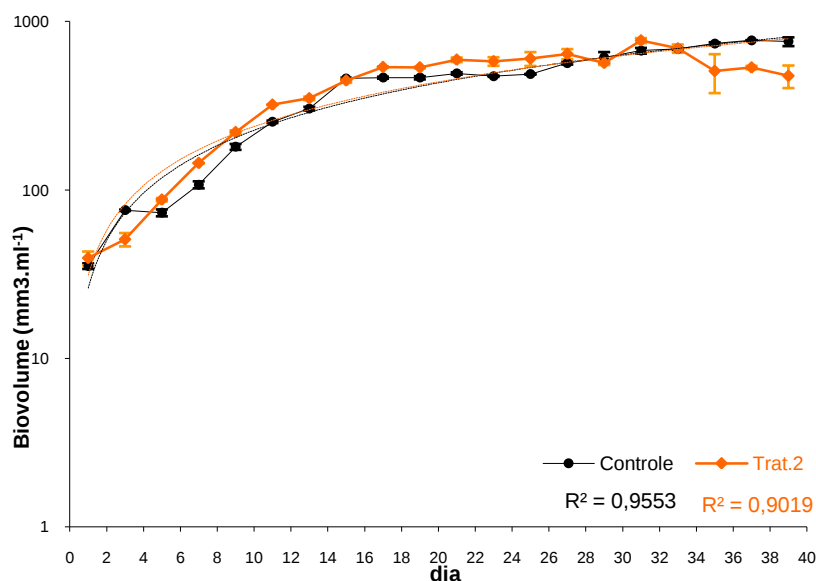


Figura 10. Variação do crescimento de *M. aeruginosa* (SPC 777). Barras indicam o desvio padrão das médias ($n=3$). Coeficiente de correlação (R^2) corresponde à linha de tendência. Controle, 40-50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; Tratamento 2, 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Nossos resultados mostraram que a maior taxa de crescimento foi encontrada na irradiância de 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Trabalhos semelhantes também verificaram que irradiâncias mais elevadas influenciam positivamente a taxa de crescimento (Molica 1996; Carneiro 2005; Honda 2005). Segundo Carneiro (2005), a maior taxa de crescimento para a cepa *M. aeruginosa* (NPJB-1) foi observada a 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (0,37). As culturas mantidas a 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram as menores taxas de crescimento ($\mu=0,20$). Molica (1996) também encontrou resultados semelhantes ao submeter *M. aeruginosa* (NPLJ-4) a duas irradiâncias: 40 e 180 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A maior taxa de crescimento foi observada na cultura submetida à maior irradiância ($\mu=0,47$) e as culturas mantidas a 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tiveram taxa de crescimento de 0,39. Honda (2005), que submeteu *M. aeruginosa* (SPC522) às irradiâncias de 2,56 a 55,52 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, encontrou também

maior taxa de crescimento ($\mu=0,49$) na maior irradiância testada. Entretanto, Hesse *et al.* (2001) não encontraram diferenças entre as taxas de crescimento da cepa de *M. aeruginosa* (PCC 7806) produtora de microcistinas e seu mutante (modificada geneticamente para não produzir microcistinas), crescendo em irradiâncias de 4 a 110 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Além disso, verificaram que as culturas submetidas à irradiância de 40 a 110 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ mantiveram a mesma taxa de crescimento ($\mu=0,20$). Wiedner *et al.* (2003) encontraram taxa de crescimento máxima a 80 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ao estudar a mesma linhagem de *M. aeruginosa* (PCC 7806). Estes autores constataram que irradiâncias mais elevadas não tiveram nenhum efeito na taxa de crescimento que permaneceu constante entre 80 e 403 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\mu=0,39$). Da mesma forma, Imai *et al.* (2009b) não encontraram diferença significativa nas taxas de crescimento de cepas de *M. aeruginosa* submetidas às irradiâncias de 30 e 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\mu= 0,20$ e $\mu=0,21$, respectivamente), embora a taxa de crescimento em 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ fosse baixa ($\mu=0,12$).

Apesar de apresentar maior taxa de crescimento na irradiância mais elevada, as taxas de crescimento observadas para as irradiâncias testadas (40-50 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e 100-120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) foram inferiores aos dados da literatura (Molica 1996; Nalewajko & Murphy 2001; Wiedner *et al.* 2003; Carneiro 2005; Honda 2005). Assim, para o controle encontramos $\mu=0,18$ e para o tratamento 2 encontramos $\mu = 0,24$.

Quanto ao rendimento celular (R), a cepa SPC777 não apresentou diferenças entre as irradiâncias testadas: o controle e o tratamento 2 apresentaram densidade máxima de $13,6 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} e rendimento de 12,4 células. mL^{-1} na fase 1.

Entretanto, outros trabalhos demonstraram diferenças entre os rendimentos em diferentes irradiâncias testadas para culturas de *M. aeruginosa* (Carneiro 2005). De acordo com Molica (1996), a cepa (NPLJ-4) quando cultivada a 40 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apresentou $R= 9,62 \cdot 10^6$ e quando mantida a 180 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apresentou $R=16,32 \cdot 10^6$. Os resultados mostraram que a irradiância foi o fator limitante para o crescimento das culturas de *M. aeruginosa* (NPLJ-4) que apresentou menor rendimento celular sob menor irradiância. Carneiro (2005) também encontrou diferenças nos rendimentos ao submeter à cepa (NPJB-1) às irradiâncias de 40, 100 e 200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo respectivamente $R= 5,5 \cdot 10^6$, $R= 16,0 \cdot 10^6$ e $R= 17,0 \cdot 10^6$ e Honda (2005) encontrou $R= 3,32 \cdot 10^6$ quando a cepa (SPC522) foi submetida a 25 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Nossos resultados mostraram que a variável irradiância teve efeito significativo sobre as taxas de crescimento, porém não sobre a biomassa e sobre o rendimento celular da cepa SPC777.



Figura 11. Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* SPC777 no controle e nos tratamentos 1 e 2.

4.3.3. EFEITOS DA COMPETIÇÃO

O aspecto geral dos controles de *M. aeruginosa* (SPC 777) e de *R. brookii* (SPC 338) e das culturas no primeiro dia do estudo de competição está ilustrado na figura 12.

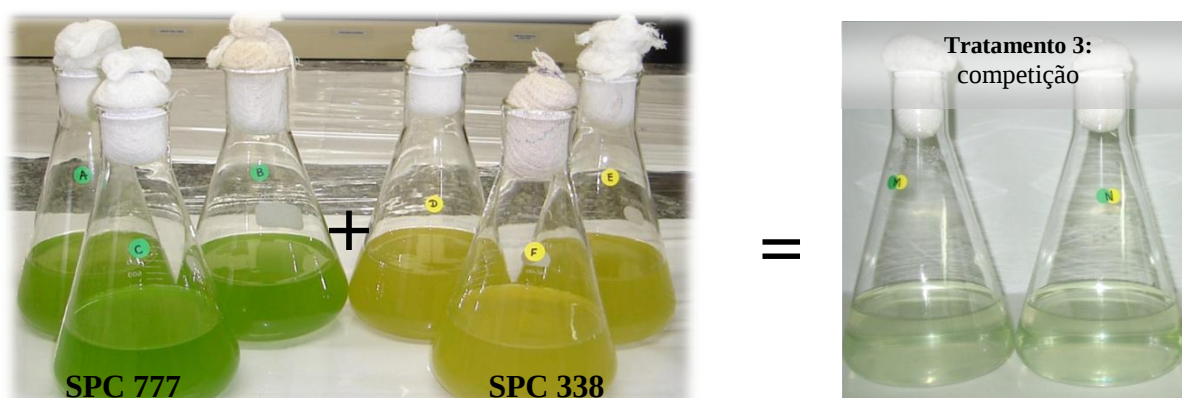


Figura 12. Aspecto geral dos controles de *M. aeruginosa* (SPC777) e de *R. brookii* (SPC 338) e das culturas no primeiro dia do tratamento 3.

Na tabela 7 e figura 13 estão ilustradas as taxas de crescimento para a fase exponencial dos controles e do tratamento 3. A taxa de crescimento da cepa SPC 338, no tratamento 3, foi maior do que a da cepa SPC777 e também foi maior do que a de seu próprio controle. A menor taxa de crescimento ocorreu nos controles ($P>0,05$), tanto da SPC 338 como da SPC 777.

Tabela 7. Taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (G) de *M. aeruginosa* SPC777 e de *R. brookii* SPC 338 no controle e no tratamento 3. Valores médios ($n=3$). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha= 0,05$).

	Fase exponencial (dia)	Taxa de crescimento (μ ; dia ⁻¹)	Tempo de duplicação (G; dia ⁻¹)
Controle SPC 777	5-13	0,18 ^a	3,81
Controle SPC 338	1-5	0,15 ^a	4,56
Tratamento 3 (SPC 777)	7-10	0,32 ^b	2,16
Tratamento 3 (SPC338)	9-11	0,42 ^c	1,64

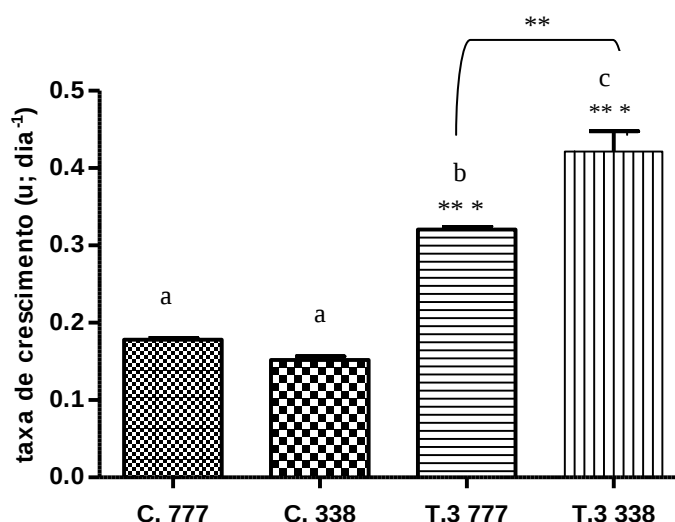


Figura 13. Taxa de crescimento de *M. aeruginosa* (SPC777) e de *R. brookii* (SPC338) no controle e no tratamento 3. Valores médios (n=3). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$). C = Controle; T= Tratamento. Asteriscos significam grau de significância.

De acordo com a tabela 8 e figura 14, pode-se observar diferenças significativas ($P < 0,05$) no rendimento celular dos controles e das cepas SPC777 e SPC338 no tratamento 3.

Tabela 8. Rendimento (R) e razão celular de *M. aeruginosa* (SPC777) e de *R. brookii* (SPC338) no controle e no tratamento 3. Valores médios (n=3) na fase 1 de crescimento. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Controle	Rendimento celular (célula. mL ⁻¹)	Razão celular	Tratamento 3 (competição)	Rendimento celular (célula. mL ⁻¹)	Razão celular
SPC 777	12,6.10 ^{6a}	13	SPC 777	6,04. 10 ^{6c}	8
SPC 338	0,237. 10 ^{6b}	4	SPC 338	1,73. 10 ^{6d}	7

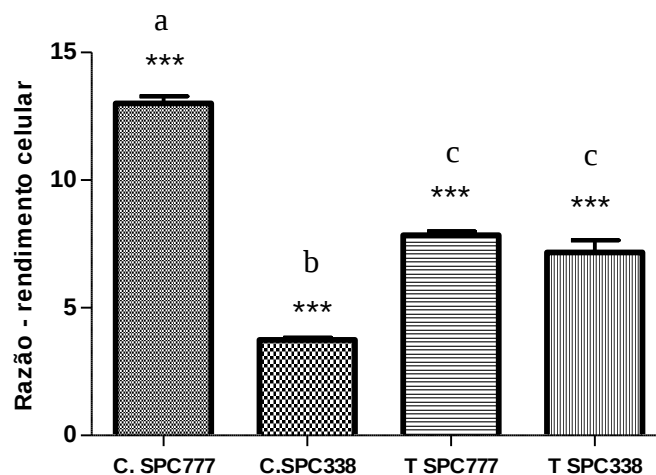


Figura 14. Valores da razão celular de *M. aeruginosa* (SPC777) e de *Rhaphidiopsis brookii* (SPC338) no controle e no tratamento 3 na fase 1 de crescimento. Valores médios (n=3). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$). C= Controle; T= Tratamento. Asteriscos significam grau de significância.

Na figura 15 estão apresentadas as curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (SPC777) e de *R. brookii* (SPC338) mantidas sob condições controle. Nestas condições as linhagens SPC777 e SPC338 apresentaram taxas de crescimento similares ($P > 0,05$). Entretanto, o rendimento celular foi maior para a cepa *M. aeruginosa* (SPC777).

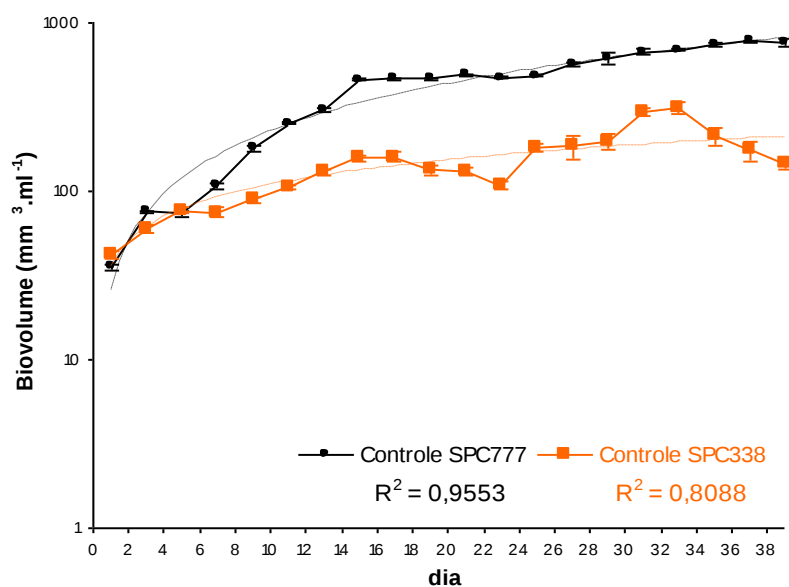


Figura 15. Variação do crescimento de *M. aeruginosa* (SPC777) e *Rhaphidiopsis brookii* (SPC338) nas condições controle. Barras indicam o desvio padrão das médias (n=3). Coeficiente de correlação (R^2) corresponde à linha de tendência.

Em conformidade com nossos resultados, Melgaço (2007) ao estudar competição entre *M. aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* constatou que *M. aeruginosa* obteve rendimento celular maior do que *C. raciborskii*. Segundo a autora, isso reflete sua capacidade de manter o crescimento exponencial por tempo maior, o que pode configurar vantagens em processos competitivos.

Na figura 16 são apresentadas as curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (SPC777) e de *R. brookii* (SPC338) mantidas em competição (tratamento 3).

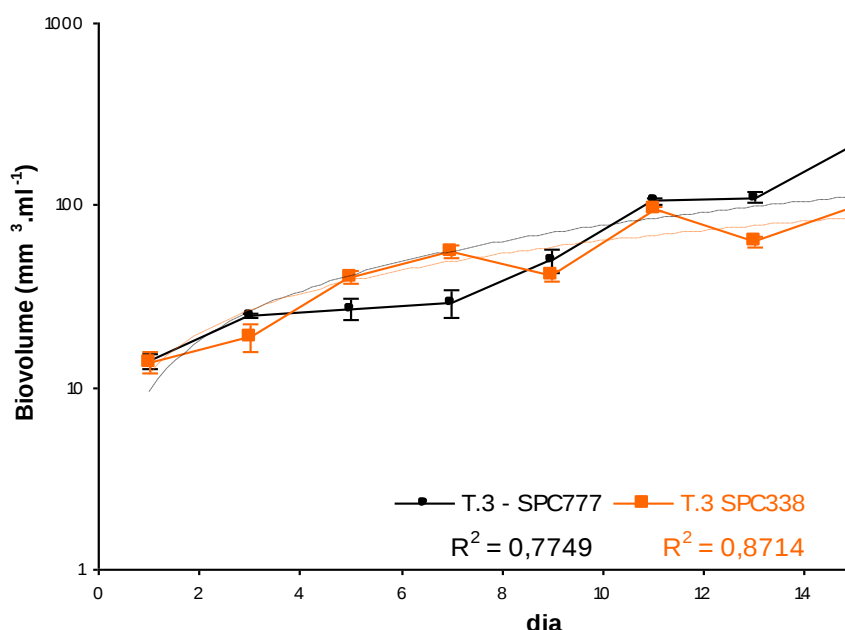


Figura 16. Variação do crescimento de *M. aeruginosa* (SPC777) e *R. brookii* (SPC338) no tratamento 3. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Coeficiente de correlação (R^2) corresponde à linha de tendência.

O estudo de competição mostrou que as taxas de crescimento aumentaram ($P < 0,05$) com a diminuição do tempo de geração das células das duas linhagens em competição (tabela 8 e figura 13). A cepa SPC 338 teve grande influência sobre o desenvolvimento da cepa SPC777, diminuindo o seu rendimento celular em 40%. Em relação à linhagem SPC338, após 14 dias de coexistência, esta apresentou aumento da biomassa, uma vez que a razão entre a densidade final e o inóculo foi maior do que o controle ($P < 0,05$) em 90% (figura 14). Portanto, pode se concluir que a linhagem SPC777 sofreu muito mais com a competição por recursos, o que foi evidenciado pela drástica redução do seu rendimento celular se comparada à linhagem SPC338. No entanto, mesmo com a influência da cepa SPC338, a cepa SPC777

apresentou maior rendimento celular ($6,04 \cdot 10^6$) do que a cepa SCP 338 cujo rendimento foi de $1,73 \cdot 10^6$, conforme pode ser visto na tabela oito.

Trabalho semelhante que avaliou a interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* mostrou que tanto *C. raciborskii* quanto *M. aeruginosa* apresentaram vantagem competitiva em pelo menos um dos ensaios (Santos 2009). Segundo este autor, a cepa *C. raciborskii* (BB048) teve vantagem competitiva sobre cepas tóxicas e atóxicas de *M. aeruginosa*. Por outro lado, cepa tóxica de *M. aeruginosa* teve vantagem competitiva sobre uma linhagem atóxica de *C. raciborskii*. No experimento onde as cepas não apresentaram toxicidade, a competição se igualou. No entanto, a interação entre estas cepas modificou o crescimento das culturas reduzindo em até 22% a taxa de crescimento das espécies em todos os experimentos realizados. Ao contrário do nosso estudo, o trabalho de Santos (2009) mostrou que quando as cepas foram mantidas juntas, as taxas de crescimento foram inferiores às encontradas pelos controles.

Nossos resultados mostraram que estas respostas são dependentes das cepas. Dentro das condições experimentais adotadas no presente estudo, a linhagem SPC338 mostrou ser melhor competidora do que a linhagem SPC777. Além disso, dentre as várias hipóteses para explicar a produção de cianotoxinas, uma delas refere-se a estes compostos como tendo efeito alelopático (Granéli & Hansen 2006), inibindo a fotossíntese e o crescimento de outros organismos. Como a cepa SPC777 não produziu toxinas (como pode ser visto nos resultados do item “Estudos químico”) e a cepa SPC338 é produtora de saxitoxinas, a hipótese levantada é de que essas cianotoxinas podem ter influenciado o desenvolvimento da cepa SPC777.



Figura 17. Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* (SPC777) e *R. brookii* (SPC338) no tratamento 3.

4.4. CLOROFILA *a*

A figura 18 mostra a variação da concentração de clorofila *a* em 10^6 células de *M. aeruginosa* (SPC777) do controle (23 °C) e do tratamento 1 (30 °C), nas Fases 1 e 2 de crescimento. Foi possível observar que não houve diferenças significativas entre o controle e o T.1, tanto na Fase 1 quanto na Fase 2 ($P>0,05$).

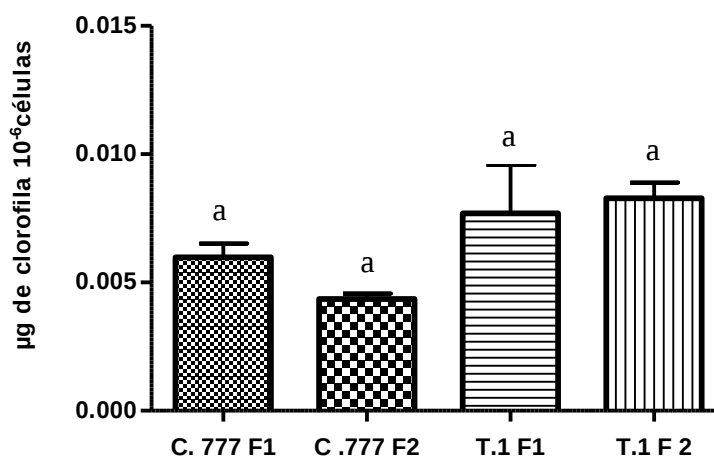


Figura 18. Concentração de clorofila *a* das células de *M. aeruginosa* (SPC 777) no controle (temperatura 23 °C) e no tratamento 1 (temperatura 30°C), nas Fases 1 e 2 de crescimento. Barras indicam o desvio padrão. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras similares não diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único ($\alpha= 0,05$). C= Controle; T= Tratamento.

A figura 19 mostra a variação da concentração de clorofila *a* em 10^6 células de *M. aeruginosa* (SPC 777), do controle e do tratamento 2 nas Fases 1 e 2 de crescimento. A irradiância de 100-120 μmol fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (T.2) apresentou menor concentração de clorofila *a* em relação ao controle (40-50 μmol fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) na Fase 1 ($P<0,05$), porém não houve diferenças significativas na fase 2.

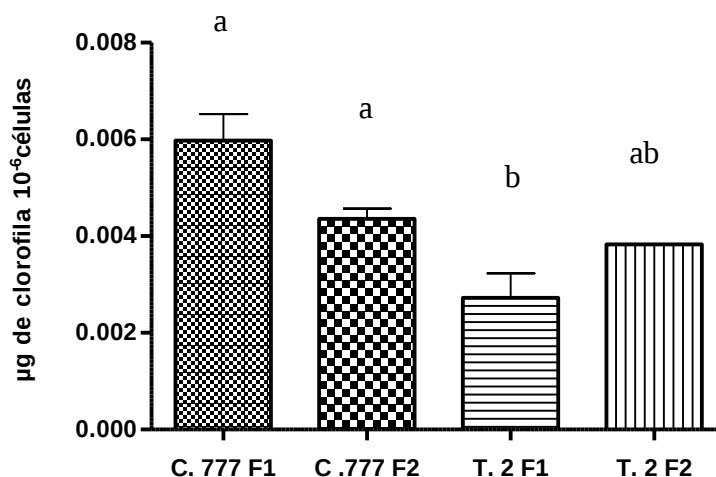


Figura 19. Concentração de clorofila *a* das células de *M. aeruginosa* (SPC 777) no controle (irradiância 40-50) e no tratamento 2 (irradiância 100-120), nas Fases 1 e 2 de crescimento. Barras indicam o desvio padrão. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$). C= Controle; T= Tratamento.

Assim como documentado no presente estudo, Raps *et al.* (1983), Molica (1996), Hesse *et al.* (2001) e Carneiro (2005) também encontraram menor concentração de clorofila *a* ao submeter *M. aeruginosa* a irradiâncias mais elevadas. No entanto, Santos *et al.* 2007 submeteram culturas de *M. aeruginosa*, com 14 e 49 dias de cultivo, por 4 horas de exposição a diferentes irradiâncias: 33, 66, 166, 376, 547, 1.062 e 2.000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e verificaram queda significativa na concentração de clorofila *a* somente quando exposta a irradiância de 2.000 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Além disso, ainda relataram que apesar da queda na concentração de clorofila ser estatisticamente significativa, não houve foto-oxidação do pigmento, sendo mais provável que esta seja uma resposta foto-adaptativa da cianobactéria, na qual os níveis de clorofila e de outros pigmentos como carotenóides decaíram. Deste modo, acredita-se que o mesmo pode ter ocorrido com a cepa SPC777 mantida sob a irradiância de 100-120 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ (tratamento 2), pois ao ser mantida nestas condições, a cepa não diminui o rendimento celular em relação ao controle ($p > 0,05$), no entanto apresentou menor concentração de clorofila *a*. Quanto ao aspecto, esta cepa apresentou coloração amarelada ao longo de todo o experimento (figuras 20 e 21), diferenciando-se da sua aparência no controle e na temperatura de 30 °C (tratamento 1), que apresentaram coloração verde mais escuro. Raps *et al.* (1983) também relataram que culturas de *M. aeruginosa* submetidas a irradiâncias elevadas apresentam coloração verde-amarelada e em baixas irradiâncias mantinham a cor característica verde-

azulado. De acordo com esses autores, esta mudança na coloração foi associada primeiramente com as mudanças no conteúdo de clorofila *a* e ficocianinas por célula. Verificaram também que quantitativamente o índice total de carotenóides por célula permaneceu relativamente constante com mudanças na irradiância, mas houve alteração qualitativa nos componentes principais dos carotenóides. Segundo os autores, estas mudanças nos carotenóides podem estar relacionadas ao seu papel protetor contra a foto-oxidação da clorofila. Walsh *et al.* (1997) obtiveram resultados diferentes e verificaram que em irradiância elevada, *M. aeruginosa* apresentou concentrações de carotenóides de duas a dez vezes maiores em relação à irradiâncias menores. Com base nos dados de literatura, seria possível dizer que a coloração amarelada típica das culturas da cepa SPC777, no tratamento 2, poderia estar relacionada às mudanças qualitativas e/ou quantitativas dos carotenóides. Tais mudanças teriam relação com a fotoaclimação da cepa SPC777, induzida pela redução da concentração da clorofila *a* nesse tratamento.

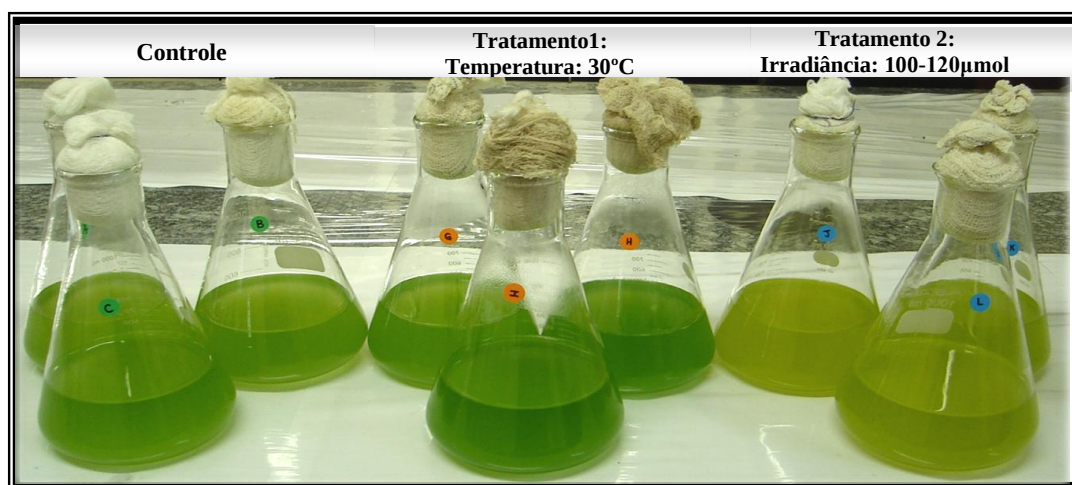


Figura 20. Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* SPC777 na Fase 1 (15º dia), no controle e nos diferentes tratamentos.

Na figura 21 observa-se que a cepa mantida na irradiância de 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (tratamento 2), permaneceu com coloração amarelada ao longo de todo o experimento.

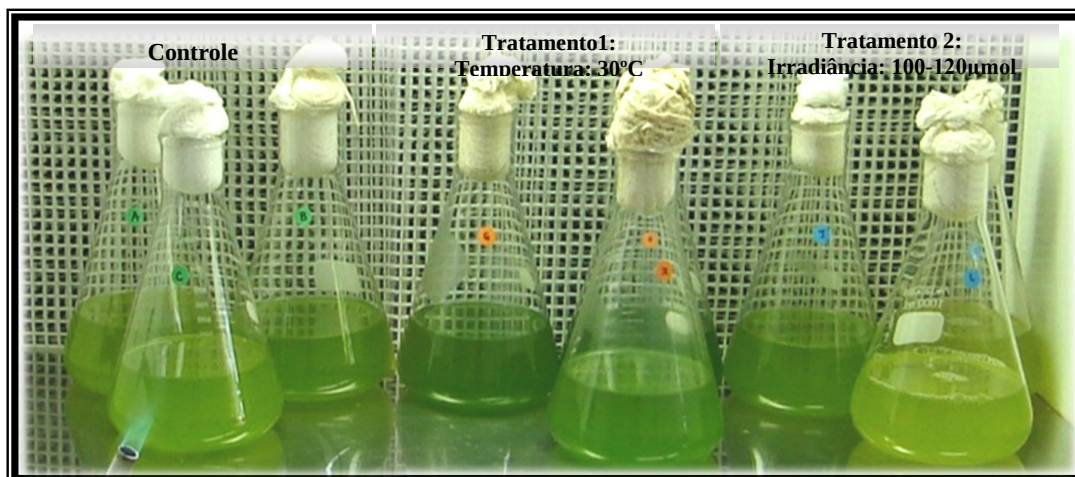


Figura 21. Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* SPC777 na Fase 2, no controle (31º dia) e nos diferentes tratamentos (27º dia).

4.5. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS DE *M. AERUGINOSA* (SPC777) DE *R. BROOKII* NO CONTROLE E NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.

4.5.1. DESCRIÇÃO DO MATERIAL NOS CONTROLES

Ordem Chroococcales

Família Microcystaceae

SPC 777 - *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger

FASE 1

Figuras 22-23, tabela 9.

Células soltas, 3,1- 4,3 μm de diâmetro (média 3,8 μm); conteúdo celular verde-azulado.

FASE 2

Figura 24, tabela 9.

Células soltas, 3,3 - 4,3 μm de diâmetro (média 3,7 μm); conteúdo celular verde-azulado.

Apesar dos aerótopos serem uma característica do gênero *Microcystis*, a cepa SPC777 deixou de produzi-los após alguns anos em cultivo e mesmo em diferentes tratamentos, estes não voltaram a ser produzidos.

Ordem Nostocales

Família Nostocaceae

SPC338 - *Rhaphidiopsis brookii* P. J. Hill

FASE 1

Figuras 27-29

Tricomas retos ou curvos, sem constrição nos septos. Células apicais cilíndricas com ápice arredondado ou cônicas com ápice acuminado, 5,5 - 34,5 µm de comprimento, 1,8 - 2,5 µm de diâmetro. Célula cilíndricas, 4,9 - 14,8 µm de comprimento (média 9,2 µm), 1,8 - 3,3 µm de diâmetro (média 2,6 µm).

4.5.2. DESCRIÇÃO DO MATERIAL NOS TRATAMENTOS

A cepa SPC 777 manteve as mesmas características do controle nos tratamentos 2 (irradiância 100-120) e 3 (competição) em relação a aparência e as dimensões celulares (tabela 9). No entanto, segundo Harris 1986 (*apud* Molica 1996) células do fitoplâncton com alta taxa de crescimento tendem a ter volume celular menor. Porém, em nosso estudo a maior taxa de crescimento ocorreu no tratamento 2 ($p < 0,05$), porém a cepa submetida a estas condições não se diferenciou do controle quanto às dimensões celulares. Por outro lado, o tratamento 1 (temperatura de 30 °C) diferenciou-se do controle e dos demais tratamentos apresentando células com dimensões maiores, tanto na Fase 1 como na Fase 2 de crescimento (tabela 9). Na Fase 2, as células apresentaram intensa divisão celular, formando agrupamentos em fileiras com até 4 células (figura 31). Portanto, a maior biomassa encontrada no tratamento 1, mesmo este apresentando menor rendimento celular ($p < 0,05$), foi induzida pelo aumento do diâmetro celular que ocorreu tanto na fase 1 quanto na fase 2 de crescimento. Krüger *et al.* 1981 (*apud* Molica 1996), também verificaram aumento no diâmetro celular de *M. aeruginosa* e, segundo os autores, o volume celular aumentou em resposta ao “stress fisiológico”, no caso, a falta de CO₂. O mesmo pode ter ocorrido com a cepa SPC777 submetida à temperatura de 30 °C já que está apresentou células distintas daquelas observadas no controle.

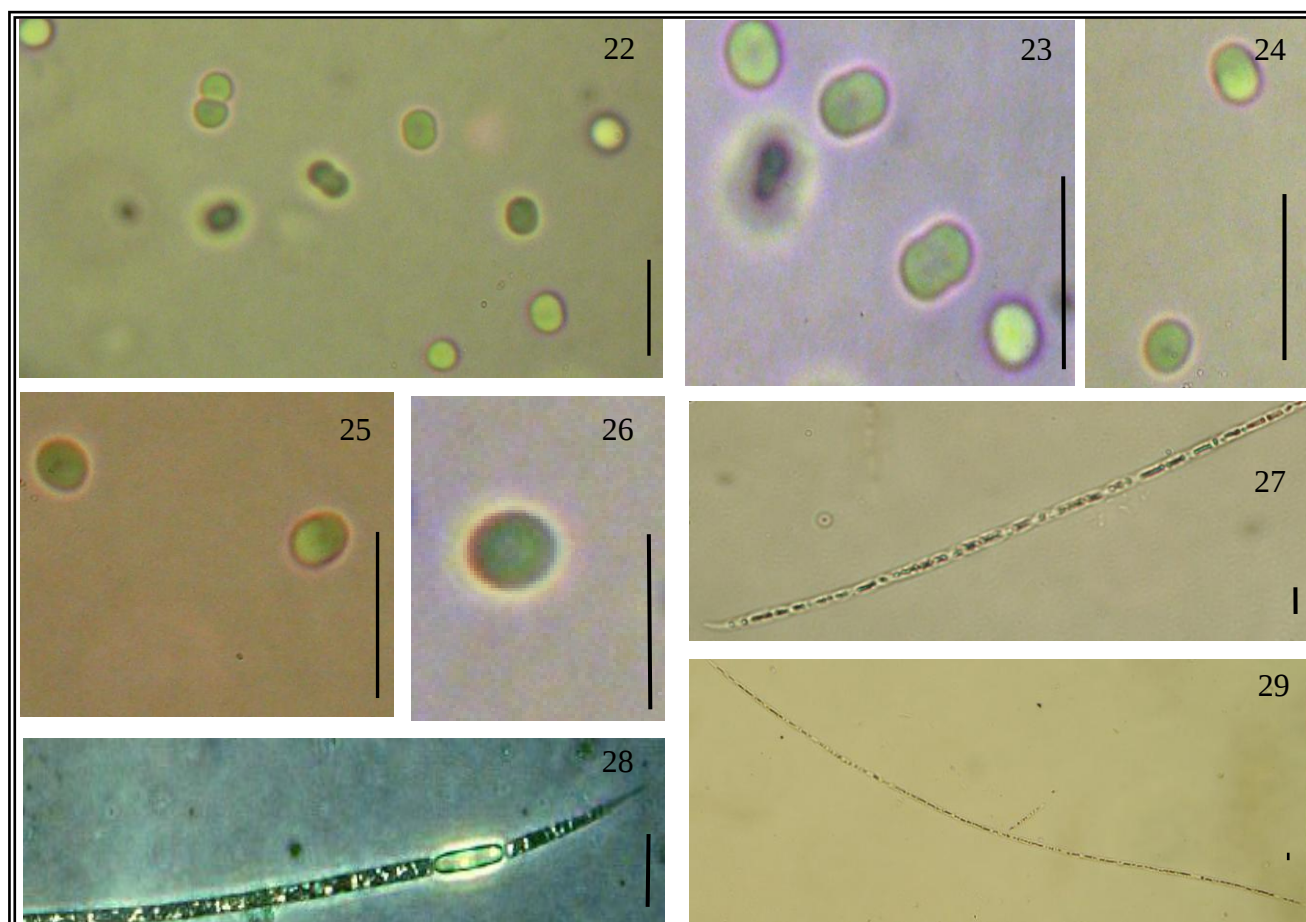
No tratamento 3 (competição), a cepa SPC 338 apresentou tricomas bem mais curtos do que observado no controle (figura 35). Briant *et al.* (2002), ao submeterem *Cylindrospermopsis raciborskii* a diferentes condições de irradiância, verificaram que sob

irradiâncias acima de $80 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ as culturas estariam em condiç\~ao estressante, o que poderia ter ocasionado o rompimento dos tricomas. Carneiro (2005), tamb\~em observou que *C. raciborskii* ao ser submetido \~a irradi\~ancias elevadas (60 e $100 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), apresentou diminuiç\~ao no comprimento dos tricomas a partir do 9º dia de cultivo. Ainda segundo Carneiro (2005), nas culturas mantidas a $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, o comprimento dos tricomas tendeu a crescer at\~e o fim do experimento. Deste modo, a variaç\~ao no comprimento dos tricomas observada para a cepa SPC338 no tratamento 3, pode estar relacionada \~a condiç\~ao estressante devido \~a competiç\~ao com a cepa SPC777.

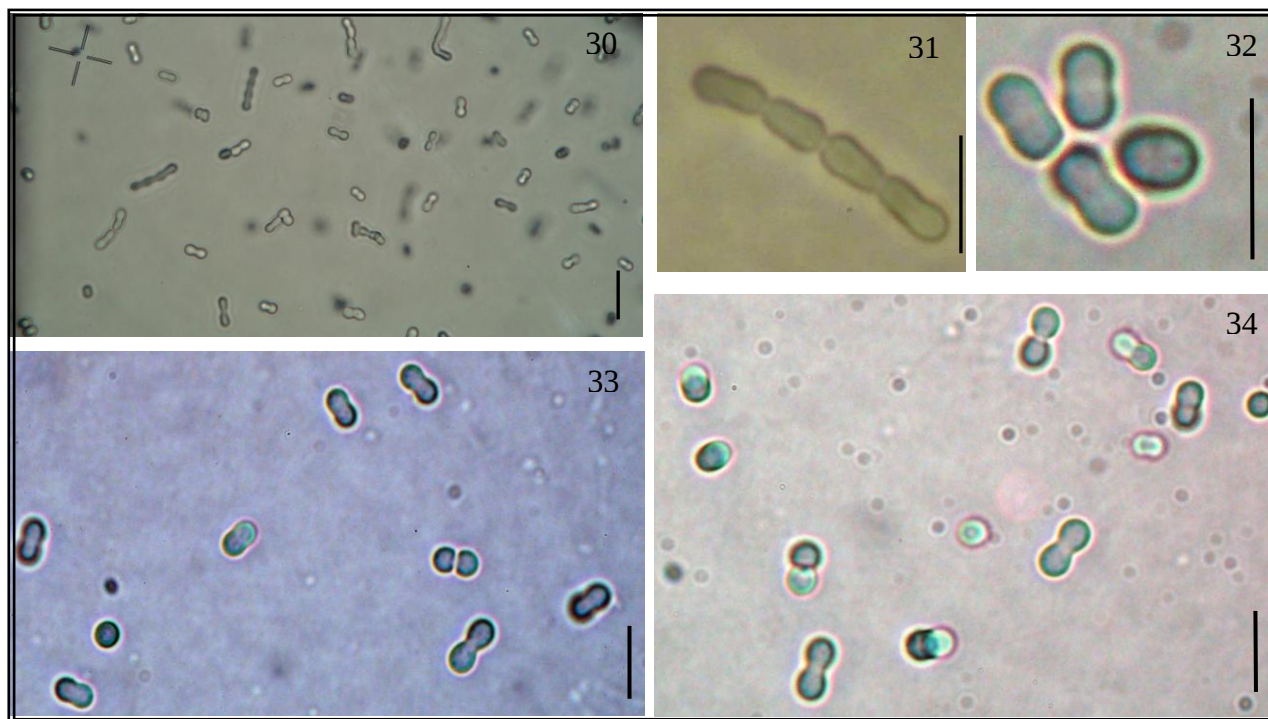
Na tabela 9, observa-se que o maior di\~ametro celular da cepa SPC777 foi observado no tratamento 1, havendo diferenç as significativas em relaç\~ao ao controle e aos tratamentos 2 e 3 ($P>0,05$).

Tabela 9. Comparaç\~ao da m\~edia do di\~ametro celular ($n=60$) da cepa SPC777, no controle e nos tratamentos testados, nas Fases: 1 e 2. M\~edias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de vari\~ancia (ANOVA) fator \~unico ($\alpha=0,05$).

	Fase (1) Di\~ametro celular (μm)	Desvio padr\~ao	Di\~ametro celular m\~inimo e m\~aximo (μm)	Fase (2) Di\~ametro celular (μm)	Desvio padr\~ao	Di\~ametro celular m\~inimo e m\~aximo (μm)
Controle	3,8 ^a	0,15	3,1 - 4,3	3,7 ^a	0,28	3,3 - 4,3
Tratamento1 (temperatura 30°C)	4,9 ^b	0,21	4,1 – 5,4	4,8 ^b	0,32	4,2 – 5,4
Tratamento 2 (100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	3,8 ^a	0,25	3,0 – 4,3	3,8 ^a	0,27	3,2 – 4,4
Tratamento 3 Competiç\~ao	3,9 ^a	0,30	3,5 - 4,5	_____	_____	_____



Figuras 22-29. 22-26. *Microcystis aeruginosa* SPC777: 22-26. Controle: 22-23. Aspecto geral das células em divisão na Fase 1; 24. Aspecto geral das células na Fase 2. 25-26. Tratamento 2: 25. Detalhe da célula sem aerótopos na Fase 1; 26. Detalhe da célula sem aerótopos na Fase 2. 27-29. *Raphidiopsis brookii* SPC338: Controle: Aspecto geral do tricoma na Fase 1. Escala: 10 μ m.



Figuras 30-34. *Microcystis aeruginosa* SPC777: Tratamento 1: 30. Aspecto geral das células na Fase 2; 31. Detalhe da célula formando agrupamentos em fileiras na Fase 2; 32. Detalhe da célula sem aerótopos na Fase 1; 33-34- Aspecto geral das células em divisão na Fase 2. Escala: 10 µm



Figuras 35-38. *Microcystis aeruginosa* SPC777 e *Raphidiopsis brookii* SPC338: Tratamento 3 (competição) - Aspecto geral das células e tricomas. Escala: 10 µm

5. ESTUDO QUÍMICO

Na tabela 10, estão discriminados os pesos das biomassas e dos extratos brutos liofilizados de cada uma das amostras (n=3), coletadas na Fase 1 e Fase 2 de crescimento das cepas, assim como suas respectivas médias.

Tabela 10. Pesos das biomassas e dos extratos brutos liofilizados e suas respectivas médias.

Amostras		Peso Biomassa liofilizada (mg)	Peso extrato bruto liofilizado (mg)	Médias dos pesos
Fase 1				
Controle SPC777	A	170	139,2	157,2 (biomassa) 132,7(extrato)
	B	159,4	129,3	
	C	142,3	129,5	
Controle SPC338	D	138,9	135	161,7 (biomassa) 129,4 (extrato)
	E	175,6	142,3	
	F	170,6	110,8	
Trat. 1 (temp 30°C)	G	148,4	122,7	159,8 (biomassa) 122,6 (extrato)
	H	167,1	122,7	
	I	164	120,5	
Trat. 2 (Int. 100-120µmol.)	J	159,2	131,5	172,0 (biomassa) 126,3 (extrato)
	K	180,1	118,4	
	L	176,8	129	
Trat. 3 (Competição)	M	204	186,8	208,9 (biomassa) 185,4 (extrato)
	N	209,5	185,6	
	O	213,3	183,9	
Fase 2				
Controle SPC777	A	189	140,2	183,3 (biomassa) 145,0 (extrato)
	B	159,1	136,5	
	C	201,7	158,4	
Trat. 1 (temp 30°C)	G	187,6	159	185,1 (biomassa) 148,4 (extrato)
	H	180,6	140,4	
	I	187	145,7	
Trat. 2 (Int.100-120µmol.)	J	204,5	160	208,3 (biomassa) 156,3 (extrato)
	K	196,7	151,9	
	L	223,8	156,9	

5.1.1. ANÁLISES QUANTITATIVAS DE MICROCISTINAS POR CLAE.

5.1.1.1. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DAS MICROCISTINAS LR

A tabela 11 reúne os valores das massas do padrão de microcistina-LR e as respectivas áreas dos picos gerados por CLAE, nas análises para obtenção de curva analítica. A quantidade de 0,4 µg de microcistina- LR ultrapassa o limite superior de detecção do equipamento.

Tabela 11. Concentrações de microcistina-LR e correspondentes áreas dos picos obtidos por CLAE.

Massa (µg) MCYST-LR	Área do pico (mAU.min ⁻¹)
0,05	135,6490
0,05	125,0318
0,1	276,1370
0,1	336,7792
0,15	552,5476
0,15	578,0495
0,2	588,9457
0,2	599,7202
0,4	-----
0,4	-----

A figura 39 apresenta o perfil cromatográfico do padrão de microcistina-LR, cujo tempo de retenção (Tr), nas condições já descritas no material e métodos, é de 31,89 minutos.

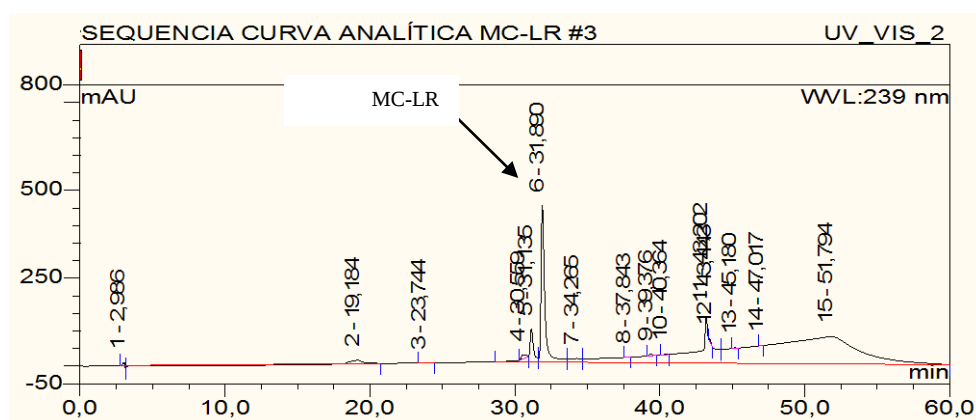


Figura 39. Perfil cromatográfico do padrão contendo microcistina-LR, cujo é Tr=31,89 minutos.

A figura 40 mostra o espectro UV da microcistina-LR (Tr= 31,89 minutos).

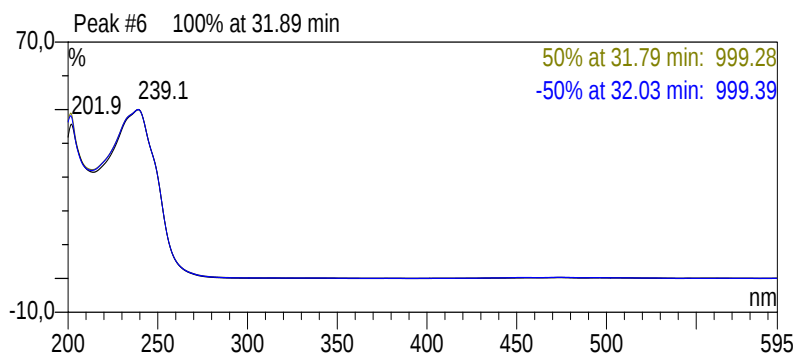


Figura 40. Espectro de UV da microcistina-LR.

A curva analítica obtida a partir dos dados apresentados na tabela 11 apresenta $R^2 = 0,9226$ (figura 41).

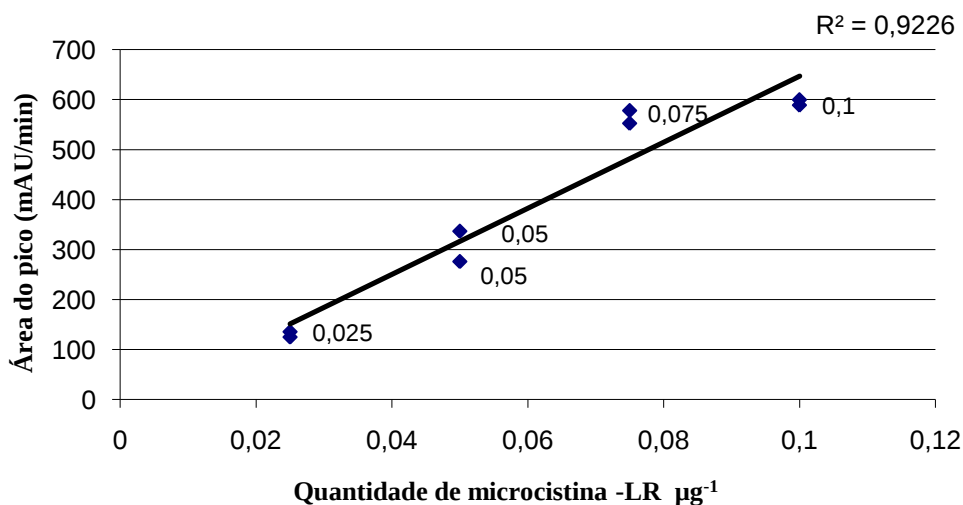


Figura 41. Curva analítica da microcistina-LR.

5.1.1.2.DETERMINAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DAS MICROCISTINAS RR.

A tabela 12 apresenta as massas empregadas e as áreas dos picos resultantes nas análises cromatográficas (CLAE) realizadas para a obtenção da curva analítica do padrão de microcistina-RR.

Tabela 12. Concentrações de microcistina-RR e correspondentes áreas dos picos obtidos por CLAE.

MCYST-RR Massa (μg)	Área do pico ($\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$)
0,025	9,2353
0,025	9,3938
0,05	24,8951
0,05	24,8163
0,075	34,6511
0,075	35,1891
0,1	44,2080
0,1	42,4261
0,2	105,2747
0,2	130,4202

A figura 42 apresenta o perfil cromatográfico de amostra de microcistina-RR, cujo tempo de retenção, nas condições descritas no material e métodos, é de 31,237 minutos

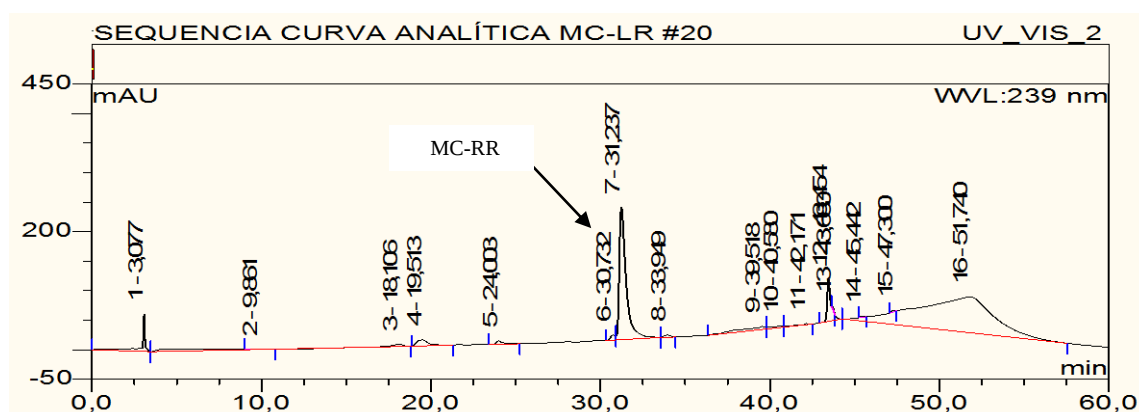


Figura 42. Perfil cromatográfico do padrão de microcistina-RR, com $\text{Tr}=31,237$ minutos.

A figura 43 apresenta o espectro UV da microcistina-RR ($\text{Tr}=31,24$ minutos), obtida a partir de padrão.

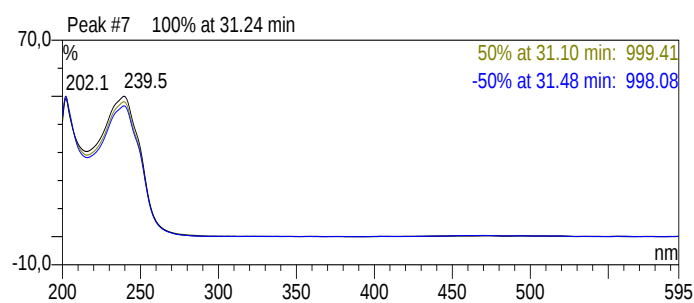


Figura 43. Espectro de UV da microcistina-RR.

Para a microcistina-RR, a curva analítica obtida apresentou $R^2 = 0,9613$ (Figura 44)

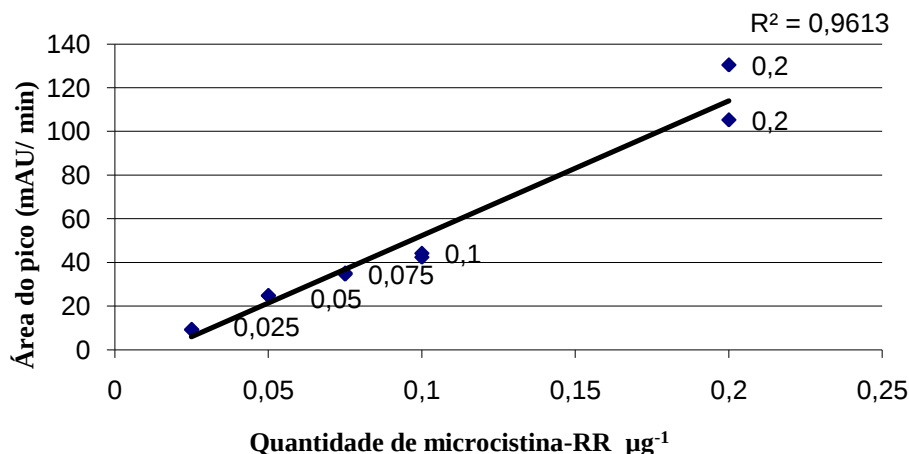


Figura 44. Curva analítica da microcistina-RR.

5.1.1.3.ANALISE DE MICROCISTINAS

PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES 3 DAS AMOSTRAS DA CEPA SPC 777 (CONTROLES) E DE AMOSTRAS DOS TRATAMENTOS 1 E 2.

A análise das amostras da cepa SPC 777 (controle e tratamentos), por CLAE, mostrou a ausência de picos com $T_r = 31,89$ e $31,24$ minutos, relativos às microcistinas LR e RR, respectivamente (figuras 45-50). Também não foram encontrados picos com espectros UV coincidentes ou semelhantes aos espectros das microcistinas LR e RR (tabelas 13 e 14), o que nos permite afirmar que a cepa SPC 777, nas condições estabelecidas para seu cultivo, não sintetiza as microcistinas LR e RR e nos sugere, também, que não produza nenhuma das outras variantes dessas toxinas.

As figuras 45 – 47 mostram o perfil cromatográfico das amostras na fase 1 da curva de crescimento.

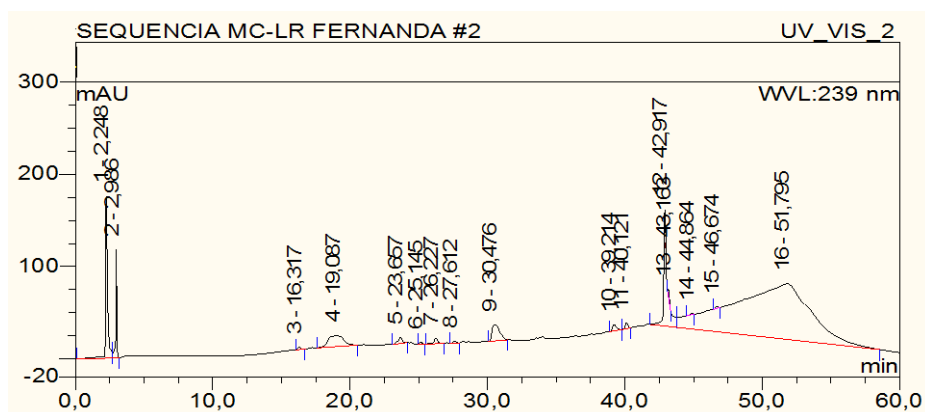


Figura 45. Cromatograma do controle SPC777, na fase 1 da curva de crescimento.

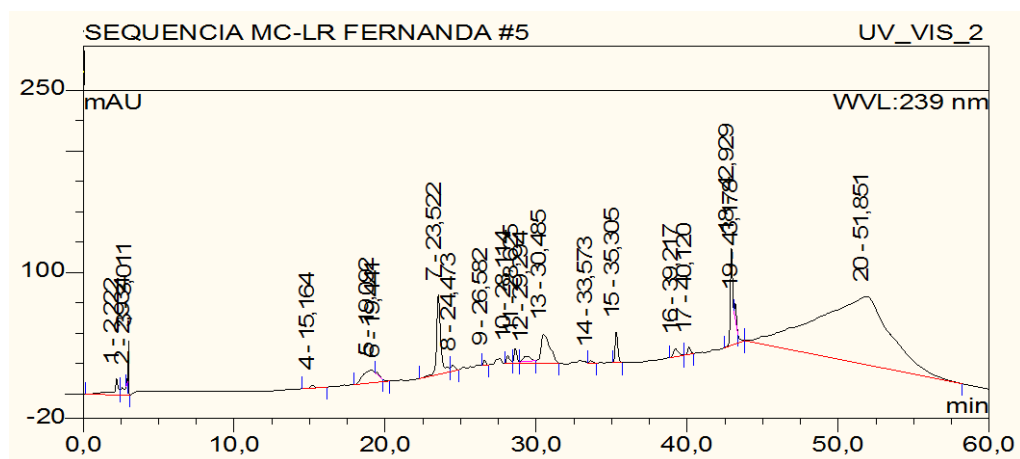


Figura 46. Cromatograma da cepa SPC 777 no tratamento 1, fase 1 da curva de crescimento.

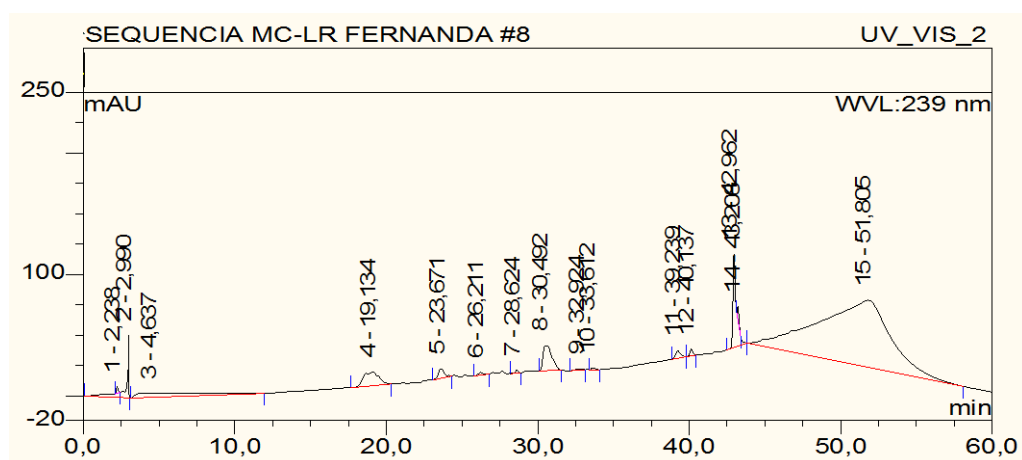


Figura 47. Cromatograma da cepa SPC777 no tratamento 2, fase 1 da curva de crescimento.

As figuras 48 – 50 mostram o perfil cromatográfico das amostras coletada na Fase 2 na curva de crescimento.

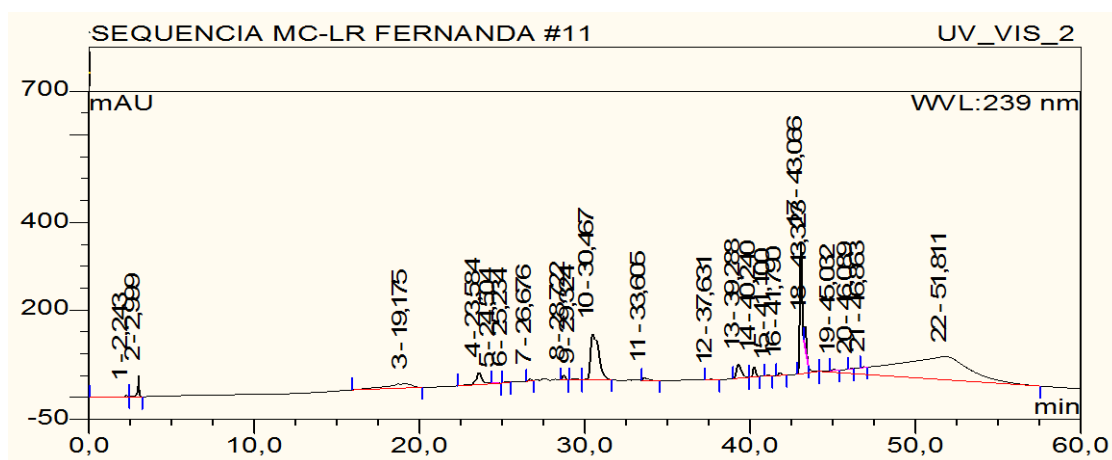


Figura 48. Cromatograma do controle SPC777, na Fase 2 de crescimento.

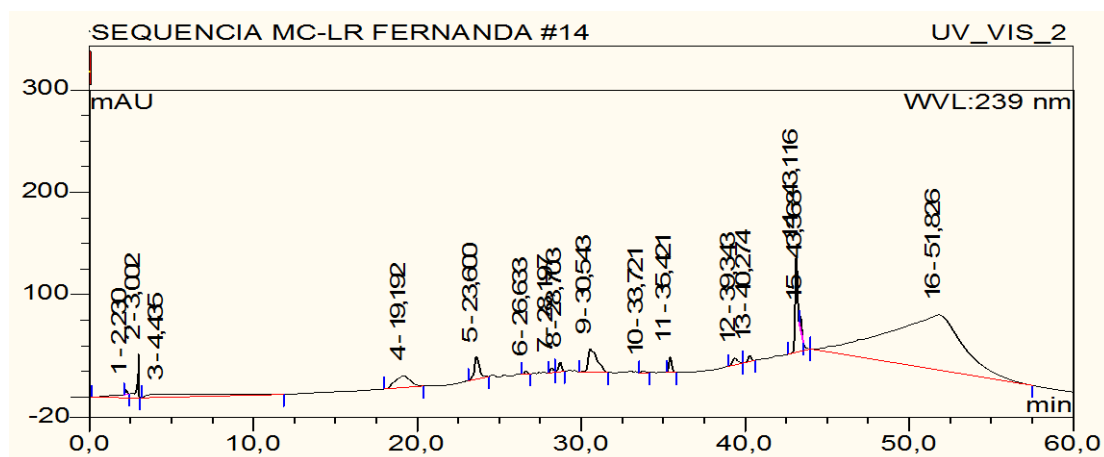


Figura 49. Cromatograma da cepa SPC777 no tratamento 1, na fase 2 de crescimento.

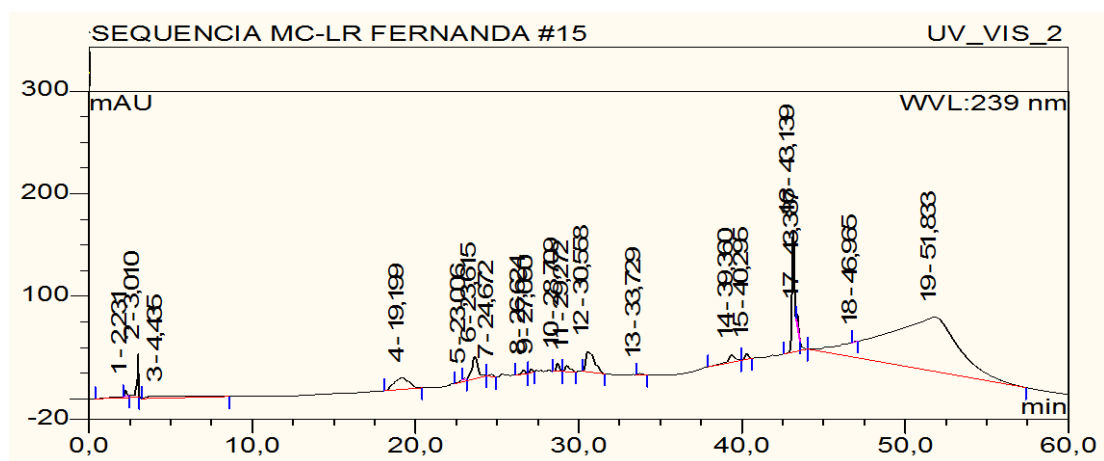


Figura 50. Cromatograma da cepa SPC777 no tratamento 2, na fase 2 de crescimento.

Nas tabelas 13 e 14, estão apresentados os tempos de retenção (Tr), as áreas dos picos e os respectivos espectros UV, de uma das amostras da fração 3 (n=3), do controle SPC777 e dos tratamentos 1 e 2, correspondentes às fases 1 e 2 da curva de crescimento, respectivamente.

Tabela 13. Tempos de retenção (Tr.), áreas dos picos e correspondentes espectros de UV, obtidos por CLAE na Fase 1

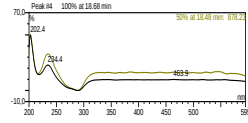
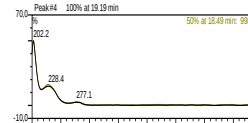
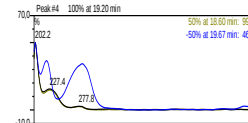
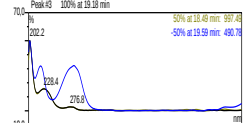
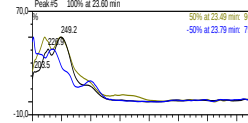
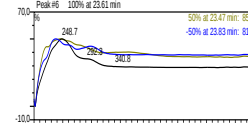
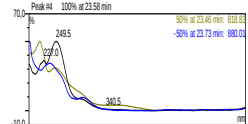
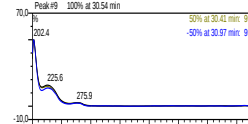
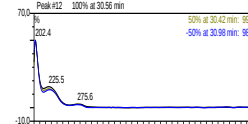
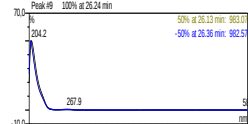
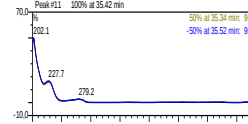
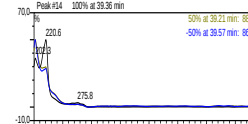
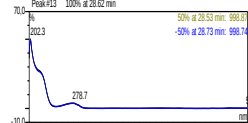
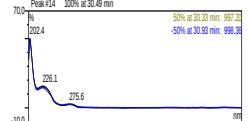
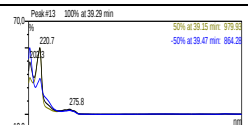
Fase 1				Fase 1				Fase 1			
Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV		Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV		Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV	
18,6	2,511			18,6	2,822			19,1	14,99		
19,1	7,869			19,1	4,294			23,7	4,965		
23,6	3,10			23,5	11,16			30,5	19,86		
26,2	2,67			26,2	3,183			39,3	2,582		
30,5	13,17			30,5	16,11			40,3	1,016		
				35,3	1,731						

Controle SPC777

Tratamento 1 (temp 30°C)

Tratamento 2 (Irrad.100-120 µmol)

Tabela 14. Tempos de retenção (Tr.), áreas dos picos e correspondentes espectros de UV, obtidos por CLAE na Fase 2

			Fase 2								
	Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV		Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV		Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV
Controle SPC777	18,7	1,0662		Tratamento 1 (temp 30°C)	19,2	11,53733		Tratamento 2 (Irrad. 100-120 µmol)	19,2	12,40913	
	19,2	11,17173			23,6	12,18837			23,6	13,03963	
	23,6	13,70007			30,5	14,04917			30,5	12,15513	
	26,2	1,2172			35,4	2,3066			39,4	1,29697	
	28,6	1,367067									
	30,5	30,01043									
	39,3	9,35537									

A tabela 15 reúne os dados relativos aos picos obtidos nas corridas cromatográficas realizadas com a fração 3 dos controles e dos diferentes tratamentos da cepa SPC777. Esses dados permitem constatar que, para os dois controles (C. SPC 777 F.1 e C. SPC 777 F.2) as diferenças entre a Fase 1 e a Fase 2, quanto à produção de metabólitos, foram: aumento da produção das substâncias expressas pelos picos 3, 4, 6 e 9; diminuição da substância expressa pelo pico 2; supressão da substância de pico 5 e surgimento da produção das substâncias de picos 7 e 8.

Na Fase 1 de crescimento da cepa, a comparação entre o controle e a amostra cultivada em temperatura maior (30 °C) mostra o aumento da quantidade dos metabólitos expressos pelos picos 2, 3 e 6; supressão do metabólito de pico 5; manutenção da produção da substância de pico 4 e surgimento da produção da substância expressa pelo pico 1. Na Fase 2, esse mesmo tratamento mostra a supressão da produção das substâncias de picos 2, 7 e 8; sensível diminuição na produção das substâncias expressas pelos picos 6 e 9 e manutenção na produção das substâncias de picos 3 e 4.

Ainda na tabela 15, a comparação entre os dados obtidos dos perfis cromatográficos dos controles e das amostras cultivadas em irradiância $100\text{-}120\text{ }\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{.s}^{-1}$ (Tratamento 2), mostra o seguinte: na Fase 1, houve aumento nas produções das substâncias expressas pelos picos 3, 4, 6 e 9; supressão de 2 e 5 e surgimento de 7 e 8. Na Fase 2, houve manutenção das quantidades de 3 e 4; diminuição nas de 6, 7 e 9 e supressão de 2 e 8.

Esses dados mostram que na Fase 2, para os controles, o número e a quantidade de metabólitos sintetizados é maior do que na Fase 1.

Mostram também que, na Fase 1 do tratamento 1, há o surgimento de um metabólito distinto dos que aparecem nos controles ou em qualquer outra condição e que na Fase 2, há diminuição do número de metabólitos sintetizados.

Para o tratamento 2, na Fase 1, observa-se a supressão de 2 metabólitos produzidos pelo controle, porém observa-se também a síntese de 2 metabólitos que foram sintetizados pelo controle, na Fase 2 de crescimento (substâncias expressas pelos picos 7 e 8), e que teriam então, suas sínteses antecipadas.

Todas essas observações comprovam a influência das mudanças das condições de cultivo, no metabolismo desse organismo.

Tabela 15. Tempo de retenção e as correspondentes áreas dos picos obtidos por CLAE para o controle SPC777 e diferentes tratamentos. C=Controle; T=Tratamento; F= Fase.

Nº do pico	TR (min.)	Área (mAU.min ⁻¹) C. SPC 777 F.1	Área (mAU.min ⁻¹) C. SPC 777 F.2	Área (mAU.min ⁻¹) T. 1 F.1.	Área (mAU.min ⁻¹) T.1 F. 2	Área (mAU.min ⁻¹) T. 2 F.1	Área (mAU.min ⁻¹) T. 2 F. 2
1	18,2	-----	-----	2,8	-----	-----	-----
2	18,6	2,5	1,1	4,3	-----	-----	-----
3	19,1	7,9	11,2	11,2	11,5	15,0	12,4
4	23,6	3,1	13,7	3,2	12,2	5,0	13,0
5	26,2	2,7	-----	-----	-----	-----	-----
6	30,5	13,2	30,0	16,1	14,0	19,9	12,2
7	39,3	-----	9,4	-----	-----	2,6	1,3
8	40,2	-----	3,3	-----	-----	1,0	-----
9	42,9	31,1	36,4	23,6	22,9	37,1	23,8

5.1.1.4. TRATAMENTO 3 (COMPETIÇÃO)

PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES 3 DAS AMOSTRAS DAS CEPAS SPC 338 E 777 (CONTROLES) E DE AMOSTRA DO TRATAMENTO 3.

As figuras 51 – 53 mostram o perfil cromatográfico das amostras na fase 1 da curva de crescimento.

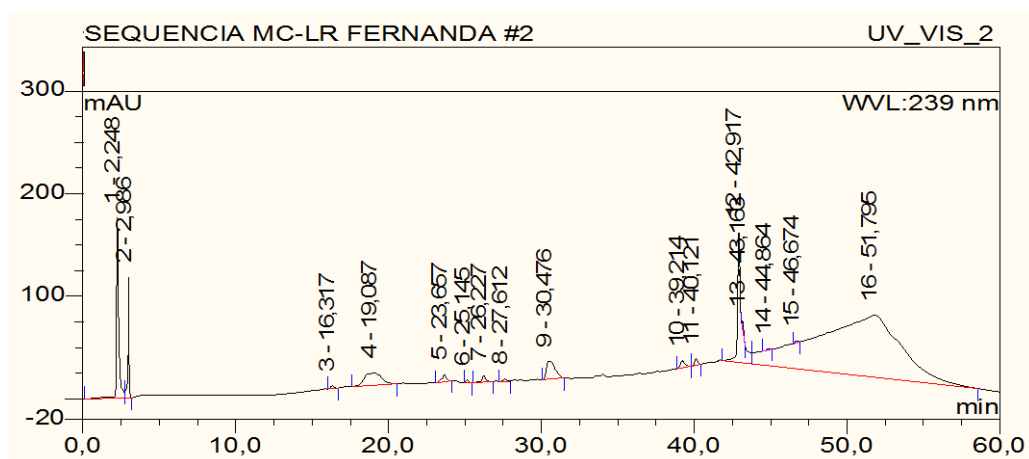


Figura 51. Cromatograma do controle SPC777, fase 1 da curva de crescimento.

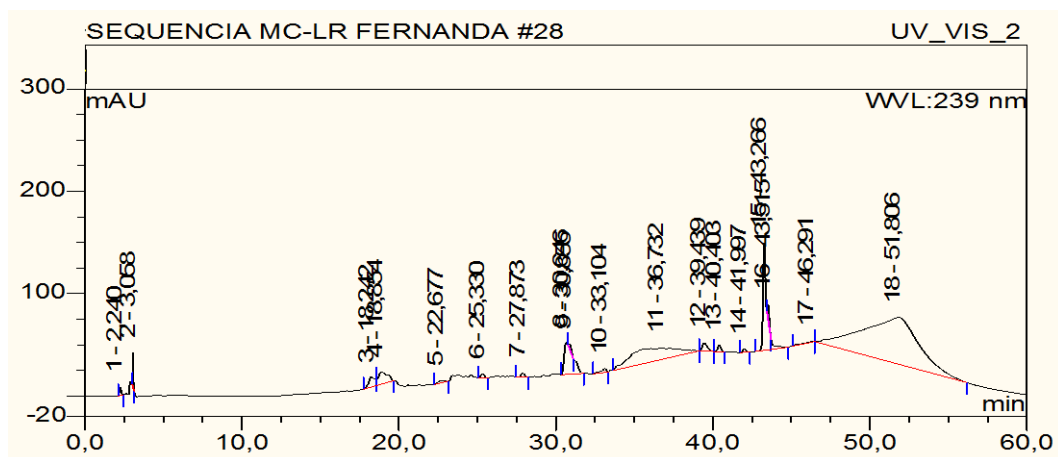


Figura 52. Cromatograma do controle SPC338, fase 1 da curva de crescimento.

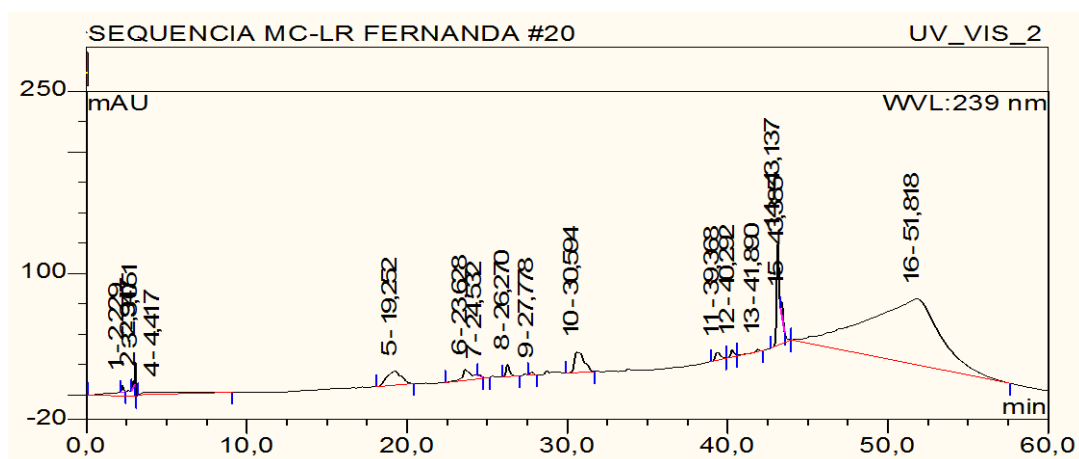


Figura 53. Cromatograma do tratamento 3 (competição), fase 1 da curva de crescimento.

Na tabela 16, temos o tempo de retenção (T_r), as áreas dos picos e os respectivos espectros de UV, da fração 3 para o estudo de competição, as amostras correspondem à fase 1 da curva de crescimento. Os valores correspondem à média ($n=3$).

Tabela 16. Tempo de retenção (Tr.), áreas dos picos e correspondentes espectros de UV, obtidos por CLAE.

			Fase 1								
	Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV		Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV		Tr (min.)	Área (mAU.min ⁻¹)	Espectros de UV
Controle SPC777	18,6	2,511		Controle SPC338	18,2	4,388		Tratamento 3 (Competição)	19,3	9,0126	
	19,1	7,869			18,8	7,889			23,6	4,7254	
	23,6	3,10			30,6	19,845			30,6	11,61347	
	26,2	2,67			36,7	44,321			39,5	1,11133	
	30,5	13,17									

A tabela 17 apresenta as áreas dos picos obtidos nas corridas cromatográficas realizadas para a fração 3 no tratamento 3.

No tratamento 3 observou-se que houve supressão dos picos 1, 3 e 10, produzidos pela cepa SPC 338 e supressão dos picos 2, 4, 7, 8 e 12, metabolizados pela cepa SPC 777 e foi observado o surgimento dos picos 5 e 11 (tabela 17).

Assim, foram comuns à cepa SPC 338 e ao material em competição, as substâncias expressas pelos picos 9 e 13, esta última produzida em maior quantidade; das substâncias sintetizadas pela cepa SPC 777, apenas a expressa pelo pico 6 foi sintetizada no tratamento 3 (tabela 17).

Observou-se, também, que nessa condição (competição), não houve produção de microcistinas (Trs e espectros UV da tabela 16). Segundo Santos (2009), microcistinas, seriam substâncias alelopáticas, ou seja, interfeririam na competição entre espécies, como o autor observou na competição entre *M. aeruginosa* e *C. raciborskii*, onde foi observado o aumento de até 53% na síntese de microcistina.

Tabela 17. Tempo de retenção e as correspondentes áreas dos picos obtidos por CLAE para os controles e tratamento 3. C=Controle; T=Tratamento

Nº do pico	TR (min.)	Área (mAU.min ⁻¹) C. SPC 338	TR (min.)	Área (mAU.min ⁻¹) C. SPC 777	TR (min.)	Área (mAU.min ⁻¹) T. 3
1	18,2	4,3				
2			18,6	2,5		
3	18,8	7,8				
4			19,1	7,8		
5					19,3	9,0
6			23,6	3,1	23,6	4,7
7			26,2	2,6		
8			30,5	13,1		
9	30,6	19,8			30,6	11,6
10	36,7	44,3				
11					39,5	1,1
12			42,9	31,1		
13	43,3	28,9			43,1	36,4

5.1.2. ANÁLISES QUANTITATIVAS DE SAXITOXINAS POR CLAE.

5.1.2.1.DETERMINAÇÃO DA ÁREA INTEGRAL DE FLUORESCÊNCIA DA SAXITOXINA E DE GONIAUTOXINA III

A tabela 18 reúne as massas empregadas, o tempo de retenção (Tr) e as áreas dos picos gerados por amostras dos padrões de saxitoxina (STX) e de goniauxina III (GTX-III), nas análises cromatográficas realizadas para determinação da área do pico dessas duas cianotoxinas.

Tabela 18. Massas, tempos de retenção e correspondentes áreas dos picos de GTX-III e STX, obtidos por CLAE.

	Massa (μg)	Tr	Área do pico (mAU.min ⁻¹)
GTX-III	$4,9 \times 10^{-3}$	12,083	0,5362
STX	10	13,467	142,757

A figura 54 apresenta o perfil cromatográfico de amostra de STX (padrão), cujo tempo de retenção, nas condições descritas no material e método, é de 13,47 minutos.

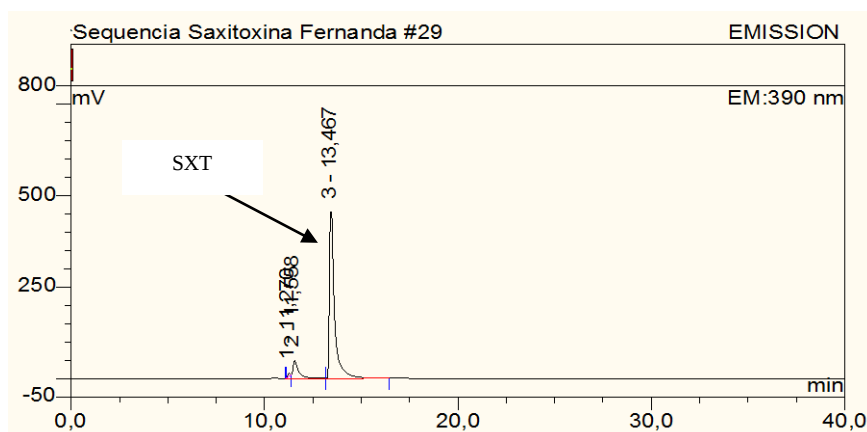


Figura 54. Perfil cromatográfico de amostra do padrão de STX, com Tr=13,47 minutos.

A figura 55 apresenta o perfil cromatográfico de amostra do padrão de GTX-III, cujo tempo de retenção, nas condições descritas no material e métodos, é de 12,08 minutos.

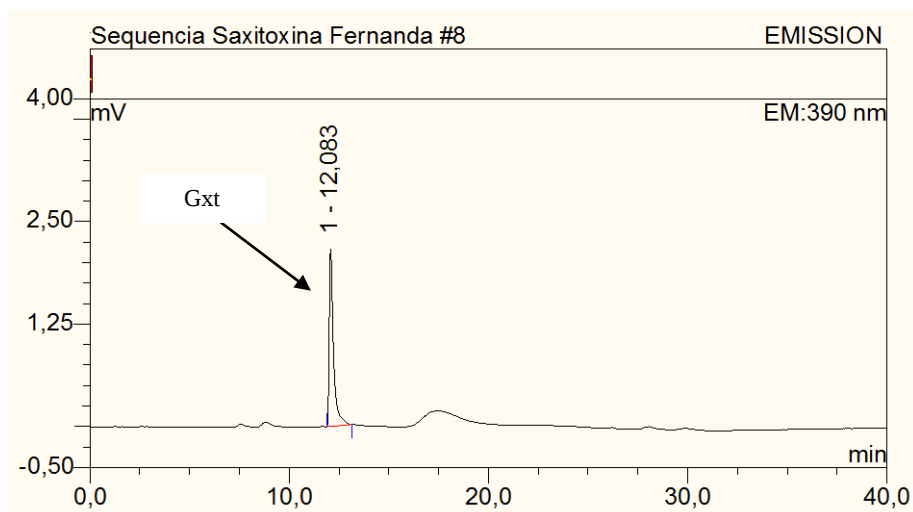


Figura 55. Perfil cromatográfico de amostra do padrão de GTX-III, com Tr=12,08 minutos.

5.1.2.2. ANÁLISE DE SAXITOXINAS

As figuras 56–58 mostram o perfil cromatográfico de amostras derivatizadas da fração 1 dos controles SPC338 e SPC 777 e do tratamento 3. Na amostra controle SPC 338, os picos em Tr=12,06 e Tr= 13,57 minutos indicam a presença de GTX-III e de STX, respectivamente (figura 56). No tratamento 3, o pico em Tr=12,06 indica a produção de GTX-III (figura 57), porém não foi detectado o pico relativo à STX. A figura 58 apresenta o perfil cromatográfico da cepa SPC777, comprovando a ausência de toxinas do grupo das saxitoxinas. Foram analisados 24 cromatogramas de amostras da cepa SPC777, sendo que todos comprovaram a ausência de saxitoxinas; por esse motivo, apresentamos apenas o cromatograma resultante da análise de amostra do controle.

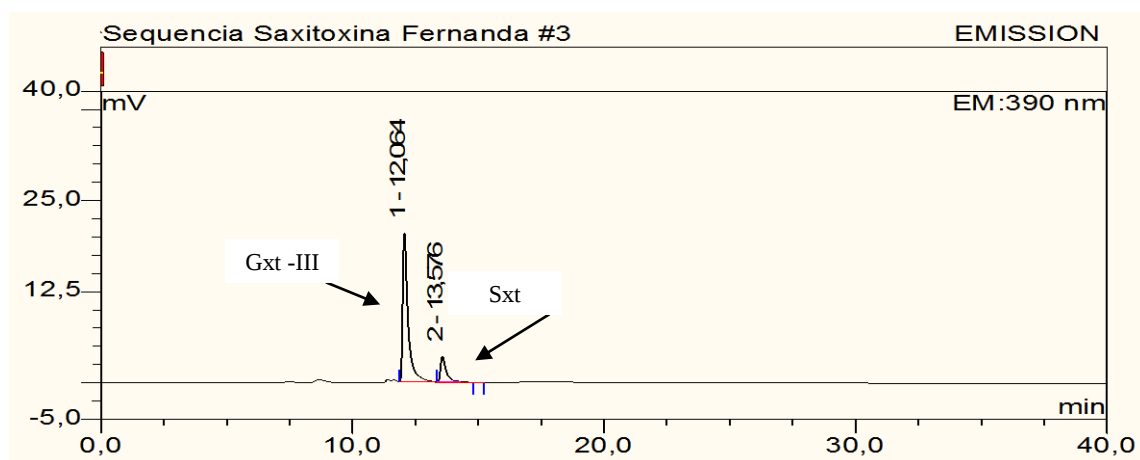


Figura 56. Cromatograma da amostra controle SPC338, fase 1 de crescimento.

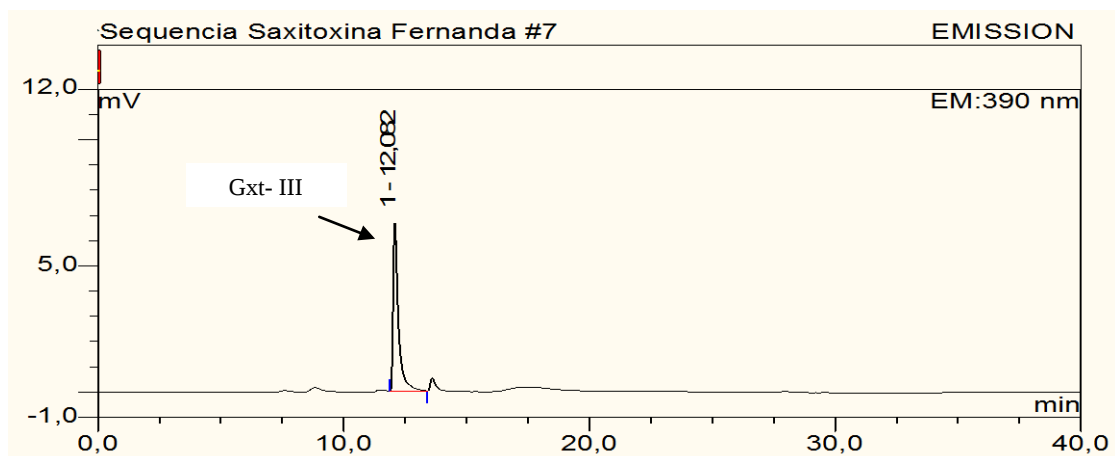


Figura 57. Cromatograma da amostra no tratamento 3, fase 1 de crescimento.

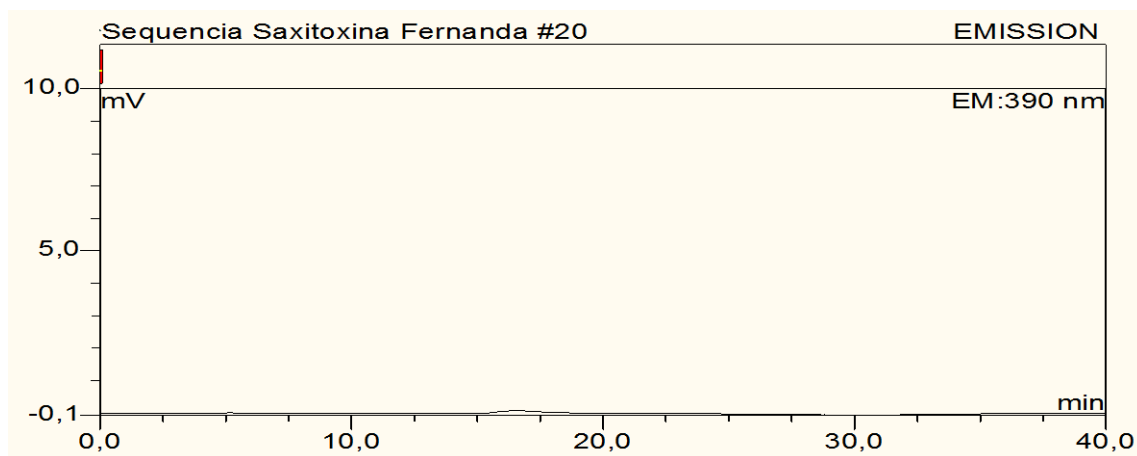


Figura 58. Cromatograma da amostra SPC777 do controle, fase 1 de crescimento.

A tabela 19 apresenta o tempo de retenção, as áreas dos picos e suas correspondentes massas obtidas por comparação com os padrões, além das concentrações de GTX e de STX, nas amostras da cepa controle SPC338 e do tratamento 3.

Tabela 19. Tempos de retenção, áreas dos picos, massas e concentrações de GTX III e STX da cepa controle SPC338 e do tratamento 3.

Replicas	TR (min.)	Área do pico (mAU min ⁻¹)	Massa (µg)	Concentração (µg mL ⁻¹)
SPC338				
GTX III				
D	12,08	2,593	0,024	4,74. 10 ⁻⁴
E	12,06	5,111	0,047	9,34. 10 ⁻⁴
F	12,08	3,342	0,031	6,11. 10 ⁻⁴

SXT				
D	13,59	0,559	0,039	$7,80. 10^{-4}$
E	13,58	0,931	0,065	$13,10. 10^{-4}$
F	13,61	0,672	0,047	$9,40. 10^{-4}$
Tratamento 3				
GTX III				
M	12,082	1,669	0,015	$3,05. 10^{-4}$
N	12,103	2,035	0,019	$3,72. 10^{-4}$
O	12,123	1,564	0,014	$2,86. 10^{-4}$
STX				
M	_____	_____	_____	_____
N	_____	_____	_____	_____
O	_____	_____	_____	_____

A figura 59 compara a média das massas de GTX e STX do controle de *Raphidiopsis brokii* (SPC338) e do tratamento 3 (competição).

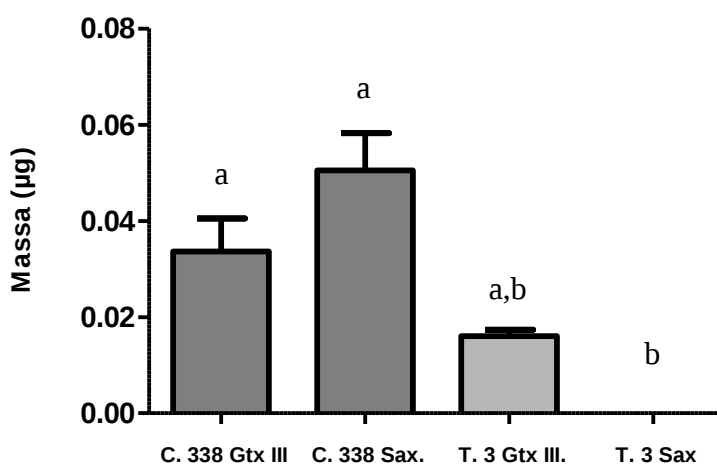


Figura 59. Valores das médias das massas de GTX e de STX do controle de *Raphidiopsis brokii* (SPC338) e do tratamento 3 (competição). Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único ($\alpha = 0,05$). C=Controle; T=Tratamento; Gtx=Goniautoxina III; Sax=Saxitoxina.

Na tabela 20 estão os dados calculados da produção de GTX-III, por célula, tanto para o controle, quanto para o tratamento, os quais mostram a diminuição da produção de GTX-III por célula, no tratamento 3 (competição).

Tabela 20. Valores do número de células por mL⁻¹, das concentrações de GTX nas amostras, quantidades de GTX por célula e as respectivas médias.

	Número de células. mL ⁻¹	Concentração de GTX (µg .mL ⁻¹)	Quantidade de GTX por célula (µg.células ⁻¹).	Média da quantidade de GTX (µg.células ⁻¹)
Controle	3.236	4,8.10 ⁻⁴	1,5.10 ⁻⁷	2,1.10 ⁻⁷
SPC338		9,4.10 ⁻⁴	2,9. 10 ⁻⁷	
		6,2.10 ⁻⁴	1,9.10 ⁻⁷	
Tratamento 3	2.017	3,05. 10 ⁻⁴	1,5.10 ⁻⁷	1.6.10 ⁻⁷
SPC338		3,72. 10 ⁻⁴	1,8.10 ⁻⁷	
		2,86. 10 ⁻⁴	1,4.10 ⁻⁷	

A SPC777, em pesquisa anterior (Sant' Anna *et al.* 2010), mostrou-se produtora de variantes de saxitoxinas, as quais não foram detectadas pelas análises químicas realizadas no presente trabalho.

Um estudo molecular da cepa, realizado para embasamento de sua identificação taxonômica, evidenciou a presença do gene *mcyA* (Lorenzi 2004), um dos envolvidos na síntese de microcistinas, motivo pelo qual foi feita também a pesquisa química dessas cianotoxinas, que também não foram detectadas em nossas análises. Entretanto, cada um dos tratamentos a que a cepa SPC777 foi submetida, causou modificação em seu metabolismo quer suprimindo a síntese de algumas substâncias, passando a produzir outras ou antecipando a produção de um determinado metabólito (tabelas 15 e 17).

Também houve variações na quantidade de metabólitos produzidos nos diferentes tratamentos, ficando evidente a variação na produção de saxitoxina na cepa SPC 388 (controle) sem mudança nas condições adotadas para o experimento, mas apenas por interação com a cepa SPC777, observação comparável às compiladas por Leflaive & Ten-Hage 2007

O fato de não ter havido retorno da produção de saxitoxinas, pela cepa SPC777, leva à suposição de ocorrência de mutação genética com perda da capacidade de produzir saxitoxinas. A perda total da capacidade de produzir determinada toxina, no caso saxitoxina, por um organismo foi relatada por Martins *et al.* (2004), para um clone do dinoflagelado *Alexandrium lusitanicum*. Essa perda foi atribuída à manutenção da cultura. Possíveis explicações para essa mudança incluem mutações genéticas ou efeitos do tratamento prolongado com antibióticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temperatura de 30°C (tratamento 1) demonstrou ser mais desfavorável ao crescimento da cepa SPC777 *Microcystis aeruginosa*. No entanto, nesta condição de cultivo a cepa apresentou maior biomassa (biovolume) devido ao aumento das dimensões celulares. Quanto à produção de clorofila *a* não houve diferenças significativas entre este tratamento e o controle.

O aumento da irradiância para 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (tratamento 2) não apresentou influência sobre o rendimento celular, a biomassa e as dimensões celulares nas fases analisadas. A irradiância influenciou na concentração de clorofila *a* apenas na fase inicial de crescimento.

A cepa SPC777 não sintetizou as microcistinas LR e RR e nenhuma variante de saxitoxinas no controle e nem nos tratamentos analisados. No entanto, com o aumento da temperatura para 30 °C houve produção de um metabólito distinto dos que apareceram nos controles e nos demais tratamentos (irradiância e competição).

Com o aumento da irradiância (tratamento 2) houve antecipação da síntese de dois metabólitos (tabela 15).

O estudo de competição mostrou que a cepa SPC777 sofreu muito mais com a competição por recursos do que a cepa SPC 338, considerando que o seu rendimento celular diminuiu em 40%. Um dos fatores que pode ter interferido nestes resultados é a presença de toxinas produzida pela cepa SPC 338.

O estudo de competição mostrou que a cepa SPC338 diminuiu a produção de goniatoxina III e inibiu sua produção de saxitoxina, o que poderia estar relacionado à competição pelo nitrogênio e fósforo que são essenciais aos vários processos metabólicos.

Com relação à morfometria, a cepa SPC777 apresentou mudanças na morfologia e nas dimensões celulares apenas com o aumento de temperatura, portanto, a irradiância e a competição não tiveram influência sobre estes parâmetros.

A cepa SPC777 mostrou-se sensível ao longo período em cultura, apresentando perda de aerótopos e ausência de produção de toxinas. Aparentemente pode ter ocorrido alguma alteração genética, pois, diferentemente do que ocorreu com a cepa SPC338, não foi possível alterar estes processos nos diferentes tratamentos.

Resumo: Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777 - *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (Cyanobacteria).

O gênero *Microcystis* é um dos que mais causam problemas em águas continentais de todo mundo devido a sua alta capacidade de formar florações e produzir toxinas. A literatura mostra que a espécie mais conhecida e estudada do gênero é *M. aeruginosa* que é amplamente distribuída em todo o mundo, frequentemente forma florações e é produtora de microcistinas. De acordo com a literatura, fatores como temperatura, luz e nutrientes afetam diretamente o desenvolvimento e a concentração de toxinas nas células. Tais fatores determinam a taxa de crescimento bem como a síntese das toxinas. Assim, nosso objetivo é o estudo dos efeitos da temperatura, irradiância e competição sobre o desenvolvimento, morfometria e produção de toxinas da Cepa SPC777 *Microcystis aeruginosa*. A escolha da cepa SPC777 baseou-se no fato que durante a triagem toxicológica do banco de culturas de cianobactérias do Instituto de Botânica esta cepa mostrou-se capaz de produzir variantes de saxitoxinas. Porém, após sete anos em cultivo, a cepa deixou de produzir esta toxina. A cepa estudada foi coletada em 2000 e é procedente do reservatório Billings, Estado de São Paulo, que é destinado ao abastecimento público e lazer. A cepa utilizada para o estudo de competição foi SPC338 (*Raphidiopsis brookii*) coletada em 1997 no mesmo reservatório. Estas cepas são mantidas no Banco de Cultura de Algas e Cianobactérias da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica, em sala com condições controladas: irradiância de 40-50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura 23 $\pm$ 2 °C, meio ASM-1 (pH 7,4) e fotoperíodo de 14h luz: 10h escuro. As cepas mantidas nestas condições foram designadas como material controle. Os diferentes tratamentos analisados são os seguintes: Tratamento 1 – cepa SPC777 mantida nas mesmas condições do controle com exceção da temperatura que foi alterada para 30 °C; Tratamento 2: cepa SPC777 mantida nas mesmas condições do controle com exceção da irradiância que foi alterada para 100-120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Tratamento 3: Estudo de competição com *R. brookii*. Para o tratamento 3, os experimentos foram realizados sob as mesmas condições do controle. Foram estabelecidas curvas de crescimento para os controles e para os tratamentos, em três repetições (n=3). Foram realizadas contagens do número de células mL^{-1} a cada dois dias para a densidade e cálculo do biovolume. Com base nas curvas de crescimento, foram retiradas três sub-amostras de 400 mL na Fase 1 de crescimento (15º dia) e outras três na Fase 2, para o controle da SPC 777 (31º dia) e para os tratamentos 1 e 2 (27º dia) Para o controle da SPC 338 e tratamento 3 foram retiradas amostras de 400 mL apenas na Fase 1. As sub-amostras foram estudadas morfometricamente ao microscópio óptico, com ocular de medição. Foram feitas 30 medidas de cada característica métrica de interesse taxonômico. Todas as diferentes

fases de crescimento foram descritas e ilustradas. As cepas em estudo já foram identificadas em termos moleculares. A análise estatística utilizada para comparação de médias foi a de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Quanto ao desenvolvimento, a maior taxa de crescimento ocorreu no tratamento 2. Na Fase 1, o controle SPC777 apresentou maior rendimento celular, porém, este não se diferenciou estatisticamente do tratamento 2. Para a Fase 2, o tratamento 1 diferenciou-se do controle e do tratamento 2 quanto ao rendimento celular. Porém, apesar do tratamento 1 apresentar menor rendimento celular em relação ao controle e tratamento 2, não apresentou diferença estatística em relação à biomassa. A maior concentração de clorofila *a* ocorreu no tratamento 1, porém este não se diferenciou do controle. A menor produção de clorofila *a* ocorreu no tratamento 2. Em relação à morfometria houve diferença estatística apenas no tratamento 1, onde ocorreu maior diâmetro celular tanto na fase 1 quanto na fase 2. O tratamento 3 (competição) mostrou que a cepa SPC338 teve grande influência sobre o desenvolvimento da cepa SPC777, diminuindo o seu rendimento celular em 40%. Em relação à cepa SPC338, a interação aumentou sua taxa de crescimento e o rendimento celular aumentou 90%. No entanto, mesmo com a influência da cepa SPC338, a cepa SPC777 apresentou maior rendimento celular ($6,04 \cdot 10^6$) do que a cepa SCP338 cujo rendimento foi de $1,73 \cdot 10^6$. Quanto à produção de toxinas no controle da cepa SPC338, houve produção de saxitoxina e goniautoxina, sendo a produção de saxitoxina maior do que a de goniautoxina. Porém, na interação (tratamento 3) não houve produção de saxitoxina e a produção de goniautoxina foi menor do que a encontrada no controle. Já a linhagem SPC777 não apresentou toxicidade (microcistinas e saxitoxinas) no controle e em nenhum dos tratamentos analisados. A cepa SPC 777 mostrou-se sensível ao longo período em cultura, apresentando perda de aerótopos e ausência de produção de toxinas. Aparentemente pode ter ocorrido alguma alteração genética, pois, diferentemente do que ocorreu com a cepa SPC 338, não foi possível alterar estes processos nos diferentes tratamentos.

Palavras- chave: *Microcystis aeruginosa*, desenvolvimento, microcistinas, saxitoxinas.

Abstract: Effects of temperature, irradiance, and competition on the cell development and toxins production of the strain SPC777 - *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanobacteria).

Microcystis is one of the most important genera in relation to bloom formation and toxins production in freshwaters all over the world. According to the literature, *M. aeruginosa* is the commonest species of the genus, is widely distributed worldwide and frequently forms blooms and produces microcystins. Temperature, light and nutrients directly affect the cell development and the toxins concentration. Thus, our aim is the knowledge of the effects of temperature, irradiance, and competition on cell development and toxins production by strain SPC777-*Microcystis aeruginosa*. The choice of strain SPC777 was made based on its capacity of producing saxitoxins. However, after a seven-year culture this strain stopped producing these toxins. The studied strain was collected in the year 2000 from the Billings Reservoir, São Paulo State. Strain SPC338 (*Raphidiopsis brookii*), used for the competition study, was collected in 1997, in the same reservoir. Both strains are kept in the Cyanobacteria Culture Collection of the Institute of Botany - SP, under controlled conditions: irradiance 40-50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperature $23\pm 2^\circ\text{C}$, culture medium ASM-1 (pH 7.4) and photoperiod 14h light: 10h dark. The strains kept in these conditions were called control. The analyzed treatments are the following: Treatment 1 – SPC777 kept in the same conditions as the control, except for the temperature that was changed to 30°C ; Treatment 2: SPC777 kept in the same conditions as the control, except for the irradiance that was changed to 100-120 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Treatment 3: study of competition with *R. brookii* (carried out in the same control conditions). Both control and treatments data were placed in growth curves, always in triplicate ($n=3$). Every two days, cell counting (cells/mL) was performed to determine density and biovolume. Based on the growth curves, three subsamples (400mL) were taken in the phase 1 (15° day) and three others in the phase 2 (for SPC777 control it was in the 31° day; to treatments 1 and 2 was in the 27° day). For SPC 338 control and treatment 3, subsamples of 400/mL were taken only in phase 1. The subsamples were studied under the optical microscope and 30 measures of each metric characteristic were taken for the taxonomic study. All the different growth phases were described and illustrated. The statistical analysis used for the media comparison was a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey Test. In relation to cell development, the highest growth rate was found in the treatment 2. In phase 1, the control SPC777 presented higher cell yield, but it was not statistically different from the treatment 2. To phase 2, the treatment 1 was different, in relation to cell yield, from the control and treatment 2. However, in spite of the treatment 1 to present lower cell yield than the control and treatment 2, there are no statistical

differences in relation to biomass. In relation to morphometry, there were statistical differences only in treatment 1, which presented greater cell diameter both in phase 1 and phase 2. Treatment 3 (competition) showed that strain SPC338 had great influence on SPC777 development, reducing 40% of its cell yield. Concerning strain SPC338, competition increased its growth rate and cell yield increased 90%. Even considering the influence of strain SPC338, strain SPC777 had higher cell yield ($6,04.10^6$) than strain SCP338 ($1,73.10^6$). Related to toxins production, there was saxitoxin and goniatotoxin production in the control of strain SPC338, and the production of saxitoxin was greater than that of goniatotoxin. In the competition study there was no production of saxitoxin and the goniatotoxin production was lower than that of the control. Strain SPC777 produced toxins (microcistins and saxitoxins) neither in the control condition nor in the different treatments. The strain SPC777 was affected by the long culture period, presenting loss of its capacity to form aerotopes and to produce toxins. Some genetic alterations must have occurred, since it was not possible to modify these processes in the different treatments, as it occurred with the strain SPC338.

Key words: *Microcystis aeruginosa*, development, microcistins, saxitoxins.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apeldoorn, M.E., Egmond, H. P., Speijers, G.J. A & Bakker, G.J.I.** 2007. Review: Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 7 – 60.
- Azevedo, M.T.P. & Sant’Anna, C. L.** 2003. *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* 109: 79-92.
- Bates, H. A. & Rapoport, H.** 1975. A chemical assay for saxitoxin, the Paralytic Shellfish Poison. *J. Agr. Food Chem.* 23(2); 237-239.
- Bishop, C.T., Anet, E.F.L.J. & Gorham, P.R.** 1959. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 453-471.
- Bittar, T.B, Colombo, V. & Vieira, A.A.H.** 2005. Release of organic carbon by cells of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in culture under different irradiances. *Acta Limnol. Bras.* 17 (1):15-26.
- Bittencourt-Oliveira, M.C. & Molica, R.** 2003. Cianobctéria invasora: Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil. *Revista biotecnologica ciência e desenvolvimento* 30:82-90.
- Bittencourt-Oliveira, M.C.; Oliveira, M.C. & Bolch, C.J.S.** Genetic variability of brazilian satrains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). 2001. *Journal of Phycology*, 5 (37): 810-818.
- Briant, J.F., Robillt, C., Quiblier-LloBérasw, C, Humbert, J.F., Couté, A. & Bernard, C.** 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research.* 36: 3183-3192
- Brookes, J. D & Ganf, G. G.** 2001. Variations in the buoyancy response of *Microcystis aeruginosa* to nitrogen, phosphorus and light. *J. Plankton Res.* 23:1399-1411.
- Carmichael, W.W.** 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- The cyanotoxins. A Review *Journal of applied bacteriology* 72: 445-459.
- Carmichael, W.W.** 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270: 78-86.
- Carneiro, R. L.** 2005. Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin (Cyanobacteria) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cyanobacteria) para produção de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina. Dissertação. Universidade Federal do Rio de janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biotecnologia Vegetal, Rio de janeiro, 113p.

- Carneiro, R. L., Santos, M. E.V., Pacheco, A. B. F., & Azevedo, S. M. F. O. 2009.** Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton research* 31(5):481-488.
- Carvalho, M.C. 2003.** Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Carvalho, L. R., Pipole, F., Werner, V. R., Laughinghouse, H.D., Camargo, A.C.M., Rangel, K.K. & Sant'Anna, C. L. 2008.** A toxic Cyanobacterial mixed bloom in an urban coastal lake in Torres, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* (39):761-769.
- Castro, D., Vera D., Lagos, N., Garcia, C. & Vasquez, M. 2004.** The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon*, 44 (5):483-489
- Chorus, I. & Bartram, J. 1999.** Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, London. 416p.
- Chu, Z.S., Jin, X.C., Yan F., Zheng S.F., Pang Y., Zeng Q.R. 2007.** Effects of EDTA and iron on growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *China Environmental Science/ Huan Jing Ke Xue*.(11):2457-2461.
- Codd, G.A., Morrison, L.F. & Metcalf, J.S. 2005.** Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203: 264-272.
- Coles, J. F. & Jones, R. C. 2000.** Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *Journal of Phycology* 36: 7–16.
- Costa, S.M. & Azevedo, S.M.F.O. 1994.** Implantação de um Banco de Culturas Cianofíceas Tóxicas. *Iheringia – Série Botânica* 45:69-74.
- Falconer, I.R. 2005.** Cyanobacterial toxins of drinking water supplies. CRC Press, Boca Raton, USA, 279p.
- Ferrão-Filho, A.S.; Costa, S.M.; Ribeiro; M.G.L. & Azevedo S.M.F.O. 2008.** Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*, 23: 161-168.
- Figueredo, C. C., Giani, A. & Bird D. F. 2007.** Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion?. *Journal Phycol.* 43: 256–265

- Fogg, G. E. & Thake, 1987.** *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The Univessity of Wisconsins Press, Ltd., London, 269p.
- Gorham, P.R; McLachlan, J. S.; Hammer, U.T. & Kim, W.K.** 1964. Isolation and culture of toxic strain of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb) de Bréb. Verhandlungen des Internationalen Vereins für theoretische und Angewandte Limnologie 15:796-804.
- Granéli, E.& Hansen, P.J.** 2006. Ecology of harmful algae. *In: Ecological studies* 189: 189-201.
- Grossman, A. R.** 2003. A molecular understanding of completary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research*. n. 1-3. 76: 207-215.
- Harada, K., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R. & Carmichael, W.W.** 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-perforance liquid chromatography. *J. Chrom.* 448: 275-283.
- Harris, G.P.** 1986. *Phytoplankton ecology –Struture, function and fluctuation*. Chapman and Hall, London, 384p.
- Hesse, K., Dittman, E. & Börner, T.** 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology Ecology* 37: 39-43
- Hoger, S. J.** 2003. Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health. Dissertation of Doctorate, Universität Konstanz.
- Honda, R.Y.** 2005. Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp (Cyanobacteria) isoladas de corpos d'água do estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado Instituto de Botânica, São Paulo.
- Honda, R.Y. Mercante, C.T.J.; Santos, J.M.V.; Esteves, K.E.; Cabianca, M.A.A.; Azevedo, M.T.P.** **Cianotoxinas em Pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo.** *In: Esteves, K.E., Sant'Anna, C.L.. Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. Um estudo da Região Metropolitana de São Paulo.* São Carlos: Editora Rima, 2006. P. 105-120.
- Huisman, J., Jonker, R.R., Zonneveld, C. and Weissing, F.J.** 1999.Competition for light between phytoplankton species: experimental tests of mechanistic theory, *Ecology* 80, 211-222.

- Imai, H., Chang, K. & Nakano, S.** 2009b. Growth Responses of Harmful Algal Species *Microcystis* (Cyanophyceae) under Various Environmental Conditions. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia*. 269–275.
- Imai, H., Chang, K., Kusaba, M. & Nakano, S.** 2009a. Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii* *Journal of Plankton Research* 2009 31(2):171-178.
- Jang, M; Ha K. & Takamura, N.** 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon* 49: 727–733.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S, Cardo, D.M, Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.C., Melo-Filho, D. A, Lyra, T.M., Barreto, V.S.T, Azevedo, S.M.F.O & Jarvis, W.R.** 1998. Liver failure and death following exposure to microcystins toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.* 338: 873-888.
- Kaebernick, 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: 3387-3392.
- Kappers, F.I.** 1984. On population dynamics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Tese Doutorado.
- Kellmann R. & Neilan B. A.** 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. *Journal Phycol.* 43:497–508
- Kellmann, R., Michali, T.K. & Neilan, B.A.** 2008. Identification of a saxitoxin Biosynthesis gene with a history of frequente horizontal gene transfers. *J. Mol. Evol.* 67: 526-538.
- Komárek, J.** 2003. Coccoid and colonial Cyanobacteria. *In: J.D. Wehr & R.G. Sheath (eds.). Freshwater algae of North America: Ecology and Classification.* Academic Press, Asterdam.
- Krüger, G.H.F. Eloff, J.N. & Pretorius, J.A.** 1981. Morphological changes in toxic and non-toxic *Microcystis* isolates at different irradiance levels. *Journal of Phycology.* 17: 52-56.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. e Fitzgerald, Jim.** (1999). “Human health aspects.” *In: Chorus, I. e Bartram, J (eds.) Toxic cyanobacteria in water- A guide to their Public Health consequences, monitoring and management.* E&FN spon, Londres, 113-153.
- Lawrence, J. F. & Niedzwiadek, B.** 2001. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid

- chromatography with florescence detection. Journal of AOAC International. 84(4): 1099-1108.
- Lawton, L. & Edwards, C.** 2001. Review – Purification of microcystins. Journal of Chromatography A 912: 191-209.
- Lee, R. E.** 1999. Phycology. Cyanobacteria. 3 ed. 67-110.
- Leflaive, J. & Ten-Hage, L.** 2007. Algal and Cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. Freshwater Biology 52: 199-214.
- 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.
- Lorenzi, A. S.** 2004. Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado. USP- Universidade de São Paulo.
- Marinho, M. M & Azevedo, S.M.F.O.** 2007. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. Aquatic Ecology. 4 (41) 525-533.
- Marker, A.F.H., Nusch, H., Rai, H. & Riemann, B.** 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusion and recommendations. Archiv für Hydrobiologie 14:91-106.
- Martins, C., Kulis, D., Franca, S. & Anderson, D. M.** 2004. The loss of PSP toxin production in a formerly toxic *Alexandrium lusitanicum* clone. Molecular Biology of the Cell 15:195-205.
- Melgaço, M. J.** 2007. Efeitos da disponibilidade de luz e limitação de nutrientes sobre a competição entre cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Dissertação de mestrado. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora. 64p
- Melcher, S. S.** 2007. Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* (Nostocales). Tese Doutorado Instituto de Botânica, São Paulo.
- Minillo, A., Ferreira, A.H.F., Yogui, G.T. & Yunes, J.S.** 2000. Concentração de microcistinas e toxicidade nas formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da Lagoa dos Patos, RS. In: Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI, pp. 521-535.

- Mlouka, A., Comte, K., Castets A.M., Bouchier, C. & Marsac, N.T.** 2004. The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy. *Journal of Bacteriology* 186(8): 2355–2365.
- Molica, R.J.R.** 1996. Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin (Cyanophyceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Molica, R. & Azevedo, S.** 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecol. Bras.*, 13(2): 229-246.
- Mur, L.R.; Skulberg, O.M. & Utkilen, H.** Cyanobacteria in the environment.1999. In: Chorus, I.; Batram, J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in Water: Guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, cap. 2, p. 14- 40.
- Nalewajko, C. & Murphy, T. P.** 2001. Effects of temperature, and availability of nitrogen and phosphorus on the abundance of *Anabaena* and *Microcystis* in Lake Biwa, Japan: an experimental approach. *Limnology*, 1 (2): 45-48.
- Oliver, R.L. & Ganf, G.G.** 2000. Freshwater blooms. In: B. A. Whitton & M. Potts (eds.). *The ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, pp.149-194
- 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.
- Pyo, D. & Shin, H.** 2002. Extraction and analysis of microcystins RR and LR in cyanobacteria using a cyano cartridge. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51: 103-109.
- Pinho, G.L.L.; Moura da Rosa, C.; Yunes, J.S.; Luquet, C. M.; Biachini, A.; Monserrat, J.M.** 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 135: 459-468.
- Raps, S., Wiman, K., Siegelman, H. W. & Falkowski, P.G.** 1983. Adaptation of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Light Intensity. *Plant Physiol.* 72:829-832.
- Reynolds, C.S., Jaworski, G.H.M., Cmiech, H.A. & Leedale, G.F.** 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend Elenkin. *Philosophical transactions of the royal society of London* 293: 419-477.

- Reynolds, C. S., Oliver, R.L. et al.** 1987. Cyanobacterial dominance: The role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 379-390.
- Reynolds, C. S., R.L. and Rogers, D. A.** 1976. Seasonal variations in the vertical distribution and buoyancy of *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin in Rothserne Mere, England. *Hydrobiologia* 48(1): 17-23.
- Reynolds, C.S.** 1975. Interrelations of photosynthetic behaviour and buoyancy regulation in a natural population of a blue-green alga. *Freshwater Biology* 5: 323-338.
- Reynolds, C.S.** 1984. Phytoplankton periodicity: The interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biology* 14: 111-142.
- Reynolds, C.S.** 1991. Ecology and control of cyanobacteria (blue-green algae). *PHLS Microbiology Digest* 8: 87-90.
- Reynolds, C.S.** 1992. Eutrophication and the management of planktonic algae: what Volenweider couldn't tell us. *Eutrophication: Research and Application to Water Supply*. J. G. Jones and D. W. Sutcliffe, eds. Ambleside, U.K., Freshwater Biological Association.
- Reynolds, C.S.** 1997. *Vegetation Processes in the Pelagic: A Model for Ecosystem Theory*. Ohlendorf-Luhe, Germany, Excellence in Ecology, Ecology Institute.
- Roset, J., Aguayo, S. & Muñoz, M.J.** 2001. DetECCIÓN de cianobacterias y toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología* 18:65-71.
- Sant'Anna, C.L. & Azevedo, M.T.P.** 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71:359-385.
- Sant'anna, C.L., Azevedo, M. T. P., Werner, V. R., Dogo, C. R., Rios, F. R. ; Carvalho, L. R.** 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126: 249-263.
- Sant'Anna, C.L., Melcher, S.S., Carvalho, M.C., Gemelgo, M.P & Azevedo, M.T.P.** 2007. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30(1):1-17.
- Sant'Anna, C.L., Carvalho, L. R., Fiore, M., Jacinavicius, F.R., Konno, K., Stenico, M.E.S, Garcia, C. & Lagos, N.** 2010. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain, isolated from São Paulo-Brazil, produce Hepatotoxins and Paralytic Shellfish Toxins. *Biological Research*.
- Santos, R.M., Vieira, A.A.H, Oliveira, M.J.D. e Salomoni, S. E.** 2007. Perda de materia organica dissolvida por células de *Microcystis aeruginosa* expostas a altas intensidades de luz. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5 (2): 42-44.

- Santos, P.V.** 2009. Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implantação no crescimento de culturas e na reprodução de microcistinas. Tese de mestrado. São Carlos.
- Sartory, D.P. & Grobbelaar, J.U.** 1984. Extraction of chlorophyll *a* from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hidrobiologia* 114: 117-187
- Silva, D.** 2005. Dinâmica de populações de *Microcystis* (Cyanobacteria) em pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. Dissertação de mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Sivonen, K.** 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2658-2666.
- Sivonen, K.** 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35: 12-24.
- Sivonen, K. & Jones, G.** 1999. Cyanobacterial toxins. In: I. Chorus & J. Bartram (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E & FN Spon, New York, pp. 41-111.
- Soares M. C. S., Rocha M. I. A., Marinho M. M., Azevedo S. M. F. O, Branco C.W.C, Huszar V. L. M** 2009. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquat Microb Ecol* 57:137-149.
- Stranghetti, B. G.** 2007. Monitoração toxicológica do pescado comercializado nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Sun, J. & Liu, D.** 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25(11): 1331-1346.
- Tao, Y., Zhang, X., Au, D., W.T., M., Xianzhong, Yuan, K.** 2010. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere* 78: 541–547.
- Tsujimura, S.** 2003. Application of the frequency of dividing cells technique to estimate the in situ growth rate of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Freshwater Biology*. 48: 2009–2024.
- Tundisi, J.G.** 2003. Água no século XXI: enfrentando a escassez. Rima, São Carlos. 247p.
- Utkilen, H. & Gjølme, N.** 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1321-1325.

- Van der Westhuizen, A.J., Eloff, J.N. & Krüger, G.H.J.** 1985. Effect of temperature and light intensity (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Arch. für Hydrobiol.* 108(2): 145-154.
- Visser, P.M., Ibelings, B.W., Mur, L.R. & Walsby, A. E.** 2005. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *In: J. Huisman, H.C.P. Matthijs and P.M. Visser* (eds.), *Harmful Cyanobacteria*, 109-142.
- Walsby, A.E.** 1994. Gas vesicles. *Microbiological Reviews* 144 (58): 94-144.
- Walsby, A.E.** 1972. Structure and function of gas vacuoles. *Bacteriological Reviews*, n.1, v.36, p.1-32.
- Walsh, K. Jones, G.J. & Hugh, R. D.** 1997. Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry*,. 44(5): 817-824.
- Watanabe, M.** 1996. Production of microcystins. *In: Watanabe et al. (eds.). Toxic Microcystis*. CRC Press, New York.
- Whitton, B. A., & Potts, M.** 2000. Introduction to the Cyanobacteria. *In: The ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. 1-11.
- Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Mtcalf, J.S., Codd, G.A. & Mur, L.C.** 2003. Effect of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1475-1481.
- Zagatto, P.A. & Aragão, M.A.** 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico. 23p. mais anexo.