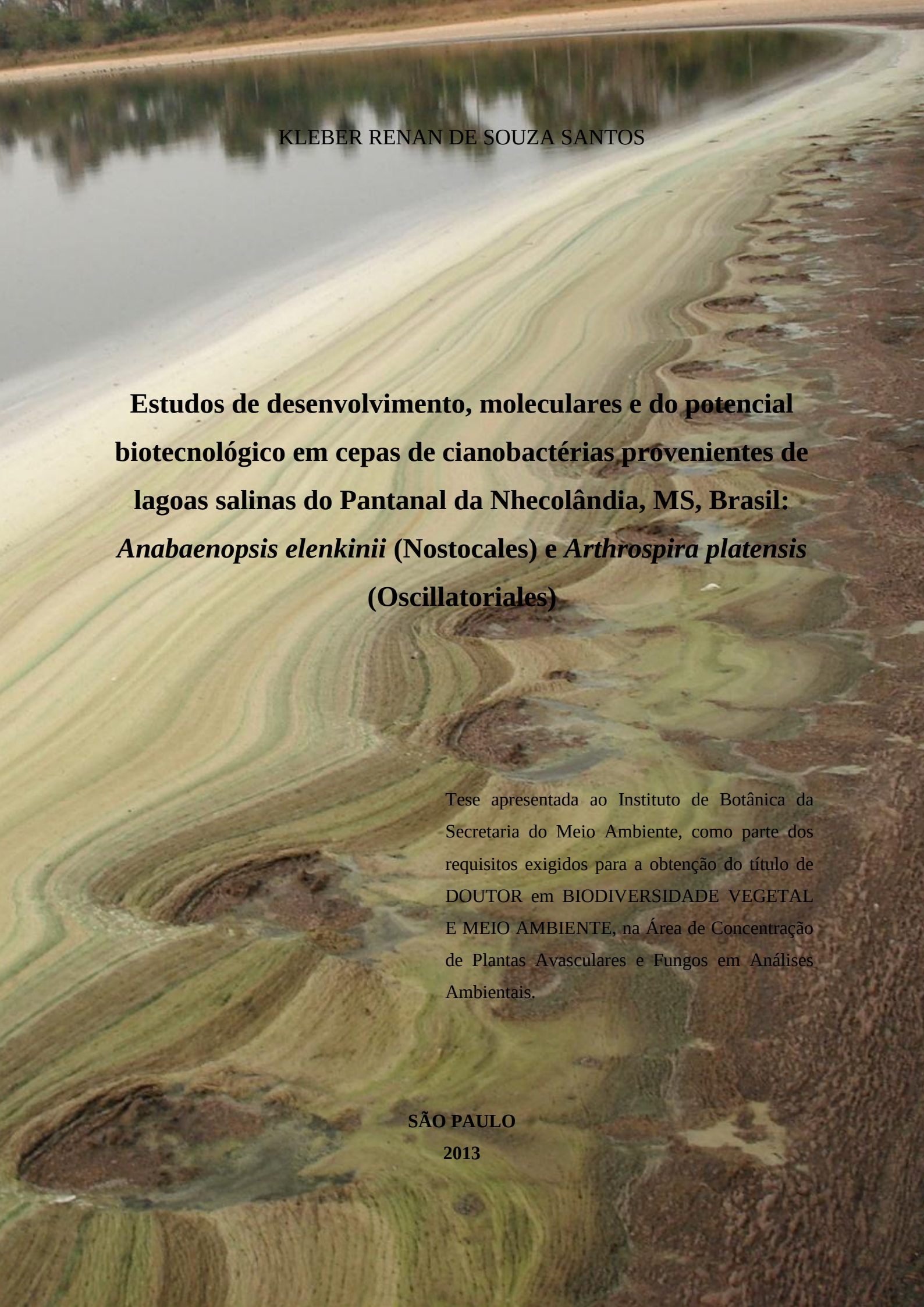




KLEBER RENAN DE SOUZA SANTOS

**Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial
biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de
lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil:
Anabaenopsis elenkinii (Nostocales) e *Arthrospira platensis*
(Oscillatoriales)**

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

SÃO PAULO

2013

KLEBER RENAN DE SOUZA SANTOS

**Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial
biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de
lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil:
Anabaenopsis elenkinii (Nostocales) e *Arthrospira platensis*
(Oscillatoriales)**

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

SÃO PAULO

2013

KLEBER RENAN DE SOUZA SANTOS

Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)

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

ORIENTADORA: DRA. CÉLIA LEITE SANT'ANNA

CO-ORIENTADORA: DRA. LUCIANA RETZ DE CARVALHO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Santos, Kleber Renan de Souza

S231e Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales) / Kleber Renan de Souza Santos -- São Paulo, 2013.
194 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013
Bibliografia.

1. Algas. 2. Taxonomia polifásica. 3. Ecofisiologia. I. Título

CDU: 582.26

“São como veias, serpentes
Os rios que trançam o coração do Brasil
Levando a água da vida
Do fundo da terra ao coração do Brasil
Gente que entende e que fala a língua
das plantas, dos bichos
Gente que sabe o caminho das águas, das
terras, do céu
Velho mistério guardado no seio das
matas sem fim
Tesouro perdido de nós
Distante do bem e do mal
Filho do Pantanal”

Pantanal, Sagrado Coração da Terra

Marcus Viana

**Dedico à minha tia Ana Júlia
Rodrigues de Souza, por sua
alegria e fé, sempre confiante no
propósito de Deus para nossas
vidas. Aos pantaneiros, pelo
conhecimento natural da região.**

Apresentação

O presente trabalho foi organizado em três capítulos. O Capítulo 1 (Introdução Geral e Área de Estudo) inclui a caracterização das cianobactérias e distribuição no Brasil dos gêneros *Anabaenopsis* e *Arthrospira*; breve descrição das principais características do Pantanal e das lagoas salinas da Nhecolândia; e, uma síntese sobre o conceito de salinidade aplicado aos estudos limnológicos no Pantanal. Nos capítulos 2 e 3 são apresentados os aspectos morfológicos, filogenéticos, ecofisiológicos e da produção de bioativos de *Arthrospira platensis* e *Anabaenopsis elenkinii*, respectivamente. Por fim, ao final dos capítulos foi inserido o tópico Considerações Finais, onde são destacados os resultados mais relevantes e recomendações de estudos para as duas espécies.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo fantástico mistério da vida e constante presença e proteção.

Aos meus pais Manoel Inácio e Maria Aparecida, que em todos os momentos são os maiores incentivadores desta trajetória, por todo o amor compartilhado e pelas imensas lições de vida que me orientam a cada dia. Aos meus irmãos Alex e Thaina, por todo o carinho, alegria e “brigas” nos momentos que estivemos juntos. Saibam que mesmo distantes fisicamente, sempre estaremos reunidos pelo amor de família. E como nosso pai ensina: mais longe já esteve!

À Dra. Célia Leite Sant’Anna (“ori”), por sua dedicação e carisma durante a orientação deste trabalho. Pelas imensas contribuições ficológicas que estimularam ainda mais a curiosidade pelas cianobactérias, por sua constante preocupação e disponibilidade em ajudar em qualquer situação, pelo empenho como “mãe científica” e por abrir portas para o mundo científico, qualidades que a revelam como uma pessoa especial de amizade muito valiosa. Ori, nossa parceria é para sempre, mas realmente já sinto saudades.

À Dra. Luciana Retz de Carvalho, co-orientadora, por sua disponibilidade em ajudar em todos os momentos, desde o empréstimo de bibliografias a sanar dúvidas referentes à sua especialidade. Além de seu bom humor e exemplo de determinação que tanto me deu força.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoso Sakamoto da UFMS/Câmpus de Três Lagoas, coordenador do projeto maior “Funcionamento Hidrológico, Físico e Biogeoquímico do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil” (Convênio CAPES/COFECUB – Projeto 412/03: USP-PARIS VII e UFMS), do qual o presente estudo fez parte. Pelo indispensável auxílio durante as expedições ao Pantanal, confiança, aprendizado e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por um mês de bolsa de doutorado concedida (Processo nº 142359/2009-2).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida (Processo nº 2009/51655-1), cujo auxílio foi fundamental para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente e aos professores das disciplinas cursadas no Instituto de Botânica pelos ensinamentos científicos.

Ao Dr. Jiri Komárek pela honra de conhecer seu laboratório na República Tcheca e o prazer de discutir a taxonomia desses gêneros tão interessantes: *Anabaenopsis* e *Arthrospira*. Saiba que seu exemplo de humildade e sabedoria motiva todos os taxonomistas. A Dra. Eliska Zapomelová por sua simpatia e atenção em seu laboratório.

À teacher Emilia Mercaldi, pelo aprendizado, correção do abstract e dedicação ao ensino do idioma inglês.

À Dra. Maria Teresa de Paiva Azevedo e toda equipe da Bioalgas, que principalmente no início do doutorado me deram a maior força para continuar. Obrigado por todo aprendizado, foi uma honra trabalhar com vocês.

Ao Dail Laughinghouse IV por sua ajuda na obtenção dos mais diversos materiais bibliográficos, discussões filogenéticas e amizade.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Dra. Andréa Tucci, Dra. Célia Leite Sant'Anna, Dra. Luciana Retz de Carvalho, Dra. Diclá Pupo Santos, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães, Dra. Mutue Toyota Fujii e Dra. Nair Sumie Yokoya pelo convívio harmonioso e disponibilidade em ajudar, valorizando o trabalho em equipe.

À Dra. Andréa Tucci ("Andréita") pelas discussões ecológicas sobre as cianobactérias, especialmente pelo convívio harmonioso, por sua sincera amizade e franqueza, inclusive pelo sorriso divertido que foi fundamental para dar força em vários momentos desta etapa.

Aos pesquisadores, Dra. Fanly Fungyi Chow Ho, Dra. Carla Ferragut e Dr. João Carlos de Monteiro Carvalho, pela valiosa contribuição de cada um durante o exame de qualificação.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Manuel Gomes da Silva ("Manú"), Neide Pozo Rios de Souza, Neuzete Martins Oliveira ("New"), Elizete Mítico Mitsugui ("Elis"), José Domingos e Valdilene Maria dos Santos, pela prontidão em seus trabalhos, amizade e convívio harmonioso.

Ao pessoal do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Dra. Carla Ferragut, Dra. Denise Bicudo e Dr. Carlos Bicudo, às técnicas de laboratório Amarílis de Souza, Maria Auxiliadora ("Dorinha"), Marli Battaglia e Valdenice Amorim, pela simpatia, disponibilidade em ajudar e recepção sempre animada.

À Márcia Regina Angelo ("Marcinha"), secretária do Programa de Pós-Graduação IBt, por sua constante simpatia, gentileza e agilidade no atendimento, sempre prestativa e dedicada as questões da pós-graduação: Parabéns Marcinha. A nova secretária Shirley, que cumpre com qualidade sua função.

À Dra. Vera Regina Werner, pela amizade e parceria no estudo das cianobactérias show de bola.

À Dra. Marli de Fátima Fiore e Msc Ana Paula Dini Andreote, pelos ensinamentos de técnicas de biologia molecular e discussões durante o estágio no CENA, em Piracicaba. À Elaine Crespim, pelo apoio e amizade durante os momentos finais da escrita da tese.

Ao Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, pelas importantes contribuições durante o estágio em seu laboratório na UFSCar, fornecimento de material bibliográfico e explicações sobre os cálculos de taxas de crescimento, etc.

Ao Dr. Fábio Carlos Magnoli e Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna, por disponibilizarem o uso do liofilizador no Instituto Butantan.

Ao Dr. Andreas Ballot, pela parceria no fornecimento da sequência de rRNA 16S e dados morfológicos de uma cepa de *Anabaenopsis arnoldii* proveniente do México.

Aos funcionários da Diretoria Administrativa IBt, D. Dinoha, D. Edelma de Oliveira e Sr. Mauro Semaco, pela demonstração de confiança e torcida para que tudo dê certo. Aos funcionários da Biblioteca IBt, em nome da D. Maria Helena Galho, agradeço à todos pela prontidão na localização de material bibliográfico e simpatia.

À EMBRAPA Pantanal, por permitir o acesso à Fazenda Nhumirim e aos funcionários da Fazenda Nhumirim, por serem sempre prestativos e atenciosos durante as expedições de coletas.

Aos pantaneiros, que muito nos ensinaram durante as coletas, pela sabedoria natural que possuem da região e auxílio na localização e caracterização das lagoas visitadas.

Aos estudantes e pesquisadores do Projeto Pantanal ("Funcionamento Hidrológico, Físico e Biogeoquímico do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil"), Vitor Mateus Bacani, Mauro Henrique Soares da Silva, Frederico dos Santos Gradella, Camila Francieli da Silva Malone, Sheila Aparecida Correia Furquim, Hermiliano Felipe Decco, Arnaldo Yoso Sakamoto, Ary Tavares Rezende Filho, Laurent Barbiéro, Sônia Furian, pelas discussões científicas e pantaneiras principalmente durante as reuniões de campo.

À minha avó Izaltina e tias Edinalva, Ivani e Márcia, pelo carinho e exemplo de fé e determinação que nos motiva a cada dia. À minha tia Ivonete, pela constante atenção e carisma, sempre disposta a ajudar e recepcionar esse sobrinho pantaneiro e viajante.

Aos amigos de infância e de sempre, pela torcida constante e divertidos momentos de descontração nos raríssimos encontros durante o doutorado: Rita de Cássia, Danillo Barcelos, Maurício de Novais, Camila Kayama, Enedir dos Santos, Herrique Ferreira, Diogo Santos, Maisa Cerdan, Juliana Rensi, Cesar Gustavo, Marcio Batista e Joyce Viana.

À Angela de Souza Cavalcante (“Angelita”), por seu exemplo de humildade, fé e determinação, sempre pronta pra ajudar e me acolher como irmão mais novo. À Denise Almeida que me ensinou que “tudo coopera para o bem daqueles que amam a Deus”, e, Caroline Erba pelo apoio, amizade e significado de DTA.

À Valdilene Maria dos Santos (“Val”), pela parceria no estudo das cianobactérias, por toda ajuda na preparação dos meios de cultura para os experimentos e amizade show de bola.

Ao Levi Pompmayer, Geanne Conserva, Angélica Garcia e Vanessa Simei, pela ajuda no laboratório de química durante as diversas análises realizadas.

Ao Rodrigo Cabral, pela ajuda na análise de atividade antioxidante e a Maura Casari pelo auxílio no ensaio anticolinesterásico.

Aos “irmãos científicos” Daniella da Silva, Rodrigo Carminatti Burbarelli (*in memorian*), Camila Malone, Fernanda Rios, Watson Arantes e Guilherme Scotta Hentschke, pela amizade e toda ajuda principalmente durante os momentos finais da tese. À Edna Ferreira Rosine pela serenidade e exemplo de dedicação, a Raquel Lopes pela ajuda na química e alegria de viver. Ao João Ost, Camila Rosal, Giseli Adame e Ana Lúvia, pela amizade e ajuda sempre que preciso. À Denise Amazonas pelas informações sobre outras espécies de *Arthrospira*.

À Camila Malone pelo companheirismo e sincera amizade que está prestes a completar uma década! Sentirei saudades das intensas discussões que foram sempre ricas de aprendizado. À Fernanda Rios, por estar sempre disposta a ajudar, pela parceria nos estudos ecofisiológicos e intensas discussões do quanto ainda temos que aprender, enfim, uma amizade show de bola. E também ao senhor Jacinavicius, pela paciência e amizade. À Daniella da Silva (“irmanja”), pelo auxílio mesmo à distância e exemplo de pessoa de confiança. Ao Watson, pela amizade e exemplo de garra e determinação, além da agilidade na formatação da tese.

À Angélica Righetti, Fernanda Ferrari, Juçara Bordin e Sandra Vieira Costa-Böddeker, pessoas especiais que sempre me deram grande força durante a realização deste trabalho e sempre se fizeram presentes com pensamentos positivos, orações e amizade.

As Sras. Iva e Divone, duas “mamusas” que conheci em São Paulo e me mostraram que não tem idade para contemplar a vida ao som do bem e da fé, obrigado pelo carinho.

À Maisa Silva (futura bióloga), Gislaine e Celso, tias Anice e Vanda, tios Belô e Mauro, Laís e Luane, pela torcida e pensamento positivo para conclusão deste trabalho.

À Iracema Albuquerque, que nas surpresas da estrada da vida me fez compreender que existe um propósito em tudo que vivemos e nas pessoas que conhecemos.

Ao casal de amigos Anna Carolina e Diego Piazza, pela torcida e encontros sempre animados. À Ana Emília, Mariana Soares, Lara Raquel e Walciane da Silva pelo incentivo, torcida e amizade.

A todos do Instituto de Botânica, tenham a certeza que pra onde quer que eu vá, levo ótimas lembranças das pessoas e deste belo lugar. Sem dúvida nossa parceria há de continuar.

À Cléia Caracho, por ser um presente em minha vida e me fazer feliz.

Registro minhas sinceras desculpas aos nomes que não tenha mencionado e agradeço mesmo aqueles que estão nas entrelinhas de colaboração para a conclusão desta etapa. Afinal, agradecer é A Graça de Retribuir Algo Dividindo Especial Contentamento, Inspiração e Motivação na Expectativa de Nascerem Tantos Outros Sorrisos. Muito obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo	16
1. Introdução geral	2
1.1. Conhecendo as Cianobactérias	2
1.2. Importância das Cianobactérias	5
1.3. Cianobactérias e Mudanças Climáticas Globais.....	6
1.4. Potencial biotecnológico das cianobactérias	7
1.5. Os gêneros <i>Anabaenopsis</i> e <i>Arthrospira</i>	9
2. Área de estudo: O Pantanal, as lagoas salinas e o conceito de salinidade.....	13
2.1. O Pantanal.....	13
2.2. A Nhecolândia e suas lagoas diversificadas	13
2.3. A salinidade	19
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. Referências Bibliográficas	23
 CAPÍTULO 2 - <i>Arthrospira</i>	 33
1. Introdução.....	34
1.1. Histórico e problemas nomenclaturais em <i>Arthrospira</i>	34
1.2. As espécies de <i>Arthrospira</i> produzem toxinas?	42
2. Hipóteses	43
2.1. Morfologia.....	43
2.2. Filogenia	43
2.3. Ecofisiologia	43
3. Objetivos	43
4. Material e Métodos.....	44
4.1. Coleta das amostras e obtenção de parâmetros físico-químicos das lagoas	44
4.2. Estudo morfológico e de crescimento em laboratório	44
4.2.1. Isolamento e cultivo de <i>Arthrospira</i>	44
4.2.2. Manutenção das cepas isoladas e condições experimentais.....	45
4.2.3. Análise do crescimento	48
4.2.4. Análise morfológica	48

4.2.5.	Análises estatísticas.....	49
4.3.	Estudo molecular (filogenético)	49
4.3.1.	Extração de DNA e amplificação por PCR dos genes RNA ribossomal 16S e Espaço Intergênico ITS 16S-23S	49
4.3.2.	Clonagem e transformação dos produtos de PCR.....	50
4.3.3.	Extração de DNA plasmidial.....	51
4.3.4.	Sequenciamento	51
4.3.5.	Processamento e análise filogenética das sequências	52
4.4.	Prospecção de substâncias bioativas.....	52
4.4.1.	Estudos biológicos.....	52
4.4.2.	Estudos químicos.....	54
4.4.3.	Instrumentação utilizada e condições cromatográficas do LC-MS/MS.....	55
4.4.4.	Condições cromatográficas	56
4.4.5.	Detecção por espectrômetro de massas – Modo positivo	57
5.	Resultados e discussão	58
5.1.	Estudo morfológico e ocorrência de <i>Arthrospira platensis</i> nas lagoas da Nhecolândia	58
5.2.	Caracterização morfológica de <i>Arthrospira platensis</i>	59
5.3.	Características de <i>A. platensis</i> CCIBt3335 isolada da lagoa Salina do Meio.....	65
5.4.	Caracterização filogenética de <i>Arthrospira platensis</i>	67
5.5.	Estudos ecofisiológicos com <i>Arthrospira platensis</i> CCIBt3335.....	76
5.6.	Prospecção de substâncias bioativas.....	81
5.6.1.	Estudos biológicos.....	81
5.6.2.	Estudos químicos.....	85
CAPÍTULO 3 - <i>Anabaenopsis</i>		104
1.	Introdução.....	105
1.1.	Histórico e distribuição geográfica de <i>Anabaenopsis</i>	105
1.2.	O conceito de espécie e espécie críptica em cianobactéria.....	109
1.3.	As espécies de <i>Anabaenopsis</i> produzem toxinas?	111
1.4.	Hipóteses	111
1.4.1.	Morfologia.....	111
1.4.2.	Filogenia.....	111
1.4.3.	Ecofisiologia.....	112
2.	Objetivos	112

3. Material e Métodos.....	112
3.1. Estudo morfológico e de crescimento em laboratório	112
3.1.1. Isolamento e cultivo de <i>Anabaenopsis</i>	112
3.2. Manutenção das cepas isoladas e condições experimentais	113
3.3. Análise do crescimento.....	116
3.4. Análise morfológica	116
3.5. Análises estatísticas	117
3.6. Estudo molecular (filogenético)	117
3.6.1. Extração de DNA e amplificação por PCR dos genes RNA ribossomal 16S e <i>cpcBA</i> -IGS (operon da ficocianina).....	117
3.6.2. Clonagem e transformação dos produtos de PCR.....	118
3.6.3. Extração de DNA plasmidial.....	119
3.6.4. Sequenciamento	120
3.6.5. Processamento e análise filogenética das sequências	120
3.7. Prospecção de substâncias bioativas.....	121
3.7.1. Estudos biológicos.....	121
3.7.2. Estudos químicos.....	124
3.7.3. Condições cromatográficas	126
3.7.4. Detecção por espectrômetro de massas – Modo positivo	127
4. Resultados e discussão	128
4.1. Estudo morfológico e ocorrência de <i>Anabaenopsis elenkinii</i> nas lagoas da Nhecolândia.....	128
4.2. Caracterização morfológica de <i>Anabaenopsis elenkinii</i>	130
4.3. Caracterização filogenética de <i>Anabaenopsis elenkinii</i>	136
4.4. Estudos ecofisiológicos com <i>Anabaenopsis elenkinii</i> CCIBt1059.....	143
4.5. Efeitos da disponibilidade de nitrogênio (Nitrato de Sódio- NaNO_3) sobre o desenvolvimento de <i>A. elenkinii</i>	145
4.6. Efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento de <i>A. elenkinii</i>	151
4.7. Prospecção de substâncias bioativas.....	153
4.7.1. Estudos biológicos.....	153
4.7.2. Estudos químicos.....	161
CONSIDERAÇÕES FINAIS	175
ANEXO 1	178

RESUMO - Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)

Cianobactérias consideradas extremófilas são aquelas que ocorrem em ambientes inóspitos para a maioria dos organismos, por exemplo, ambientes altamente alcalinos ($\text{pH} > 9$) como as lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia. Nessas lagoas de características ambientais extremas ($\text{pH} 9-11$), há dominância de cianobactérias e ocorrem florações de *Anabaenopsis elenkinii* Miller, principalmente nos períodos de seca, sendo também comum a presença de *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont. Considerando a ausência de estudos filogenéticos, taxonômicos e de produção de compostos bioativos por essas espécies no Brasil, os objetivos do presente estudo foram: avaliar a variabilidade morfológica e o desenvolvimento em diferentes condições de cultura (concentração de nitrogênio, temperatura e pH), a filogenia, a produção de toxinas e outras substâncias bioativas das cepas *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 e *Arthrospira platensis* CCIBt3335 isoladas de uma lagoa salina do Pantanal da Nhecolândia. Para o estudo taxonômico foi utilizado o conceito de taxonomia polifásica e utilizadas características morfológicas (fenotípicas), ecológicas e filogenéticas para caracterizar as espécies estudadas. Para o estudo filogenético foram sequenciados os genes RNAr 16S, ITS (16S-23S) e *cpcBA*-IGS (ficocianina). Para os estudos ecofisiológicos foram realizados experimentos de cultivo em câmaras incubadoras com irradiância $80-100 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e ciclo 12-12h luz-escuro, em sete tratamentos distintos, onde o meio BG-11 modificado (com 3% de NaNO_3 , 45 mg.L^{-1}), $\text{pH} 9,5$, temperatura 25°C foi considerado como condição controle, por apresentar as características mais próximas do encontrado nas lagoas salinas. Além da condição controle, os seguintes tratamentos foram utilizados variando apenas um parâmetro em cada um deles: T1) BG-11 50% de NaNO_3 (750 mg.L^{-1}); T2) BG-11 0% (sem N); T3) Temperatura 30°C ; T4) Temperatura 35°C ; T5) $\text{pH} 10,5$; e, T6) $\text{pH} 7,0$. Para a detecção das microcistinas LR, RR, YR e LA, do L-BMAA e da saxitoxina foi utilizada a técnica LC-MS/MS; para verificar o potencial das espécies como produtoras de metabólitos bioativos foram feitos ensaios de atividades anticolinesterásica, antifúngica, antioxidante, hemolítica e antibacteriana. Nossos resultados confirmaram as seguintes hipóteses para *Arthrospira platensis*: a) A presença de aerótopos é facultativa e o hábito é planctônico; b) A ausência de caliptra nas células apicais, tanto em material da natureza quanto de cultura, é uma característica morfológica estável desta espécie; c) Tricomas regularmente espiralados e hormogônios retos ou curvos são características inerentes ao seu ciclo de desenvolvimento; d) A variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e ITS (16S-23S) não expressa a variabilidade fenotípica das espécies de *Arthrospira*; e) As populações de *A. platensis* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético; f) Não há produção de cianotoxinas por *A. platensis* CCIBt3335. A hipótese sobre o crescimento de *A. platensis* estar correlacionado positivamente com o aumento do pH , da concentração de nitrogênio e da temperatura, foi confirmada parcialmente, visto que não foi possível determinar a relação do crescimento da espécie com o aumento da temperatura. Para *Anabaenopsis elenkinii* as seguintes hipóteses foram confirmadas: a) A presença de aerótopos é facultativa e o hábito é planctônico; b) A variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e *cpcBA*-IGS corrobora a variabilidade fenotípica das espécies de *Anabaenopsis*; c) As populações de *A. elenkinii* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético na árvore do RNAr 16S; d) O crescimento desta espécie está correlacionado positivamente com o aumento do pH e negativamente com o aumento da temperatura; e) A temperatura influencia a frequência de formação de heterocitos em *A. elenkinii*; f) A formação de acinetos não é influenciada por mudanças na disponibilidade de nitrogênio, na temperatura e no pH ; g) Não há produção de cianotoxinas por *A. elenkinii* CCIBt1059. Não foi possível confirmar a hipótese de existir

espécies crípticas no gênero *Anabaenopsis* relacionadas ao morfotipo de *A. elenkinii*. Portanto, não podem ser diferenciadas quanto ao hábitat, origem geográfica, morfologia e filogenia. No entanto, as árvores filogenéticas do RNAr 16S e ITS (16S-23S) indicam que as cepas de *A. elenkinii* do Pantanal e México estão em processo de evolução recente, intimamente relacionadas com as cepas africanas. Em ambas as espécies estudadas não foram detectadas a produção das microcistinas LR, RR, YR e LA, do L-BMAA e da saxitoxina. A cepa *A. elenkinii* CCIBt1059 apresentou resultado positivo para atividade anticolinesterásica e antifúngica e a cepa *A. platensis* CCIBt3335 apresentou resultado positivo para atividade antioxidante e antifúngica. Os demais ensaios apresentaram resultados negativos. Por fim, consideramos que o isolamento e a caracterização morfológica, filogenética, ecofisiológica e a pesquisa de bioativos nas cepas *A. elenkinii* CCIBt1059 e *A. platensis* CCIBt3335 representam um marco para estudos futuros e abrem caminho para o potencial uso biotecnológico destas linhagens de espécies muito importantes e abundantes nas lagoas salinas do Pantanal.

ABSTRACT - Studies on development, phylogeny and biotechnological potential in strains of cyanobacteria from saline lakes of Pantanal of Nhecolândia, MS, Brazil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) and *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)

The cyanobacteria considered as extremophiles are those that occur in environments inhospitable to most organisms, for example, highly alkaline environments (pH > 9) such as the saline lakes of Pantanal of Nhecolândia. In those lakes with extreme environmental characteristics (pH 9-11), there is dominance of cyanobacteria and occurrence of blooms of *Anabaenopsis elenkinii* Miller particularly during periods of drought, and the presence of *Arthrospira platensis* (Norderstedt) Gomont is also common. Considering the lack of studies on phylogeny, taxonomy and production of bioactive compounds by these species in Brazil, the objectives of this study were to assess the morphological variability and development under different culture conditions (nitrogen concentration, temperature and pH), the phylogeny, the production of toxins and other bioactive substances of *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 and *Arthrospira platensis* CCIBt3335 strains, isolated from a saline lake of Pantanal da Nhecolândia. For the taxonomic study, we used the concept of polyphasic taxonomy and for characterizing the studied species, we considered their morphological (phenotypic), ecological and phylogenetic features. For the phylogenetic study, the sequencing of RNAr 16S, ITS (16S-23S) and *cpcBA*-IGS (phycocyanin) genes was performed. For the ecophysiological studies, cultivation experiments were carried out in incubators chambers with irradiance 80-100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and photoperiod 12-12h light-dark, in seven different treatments, where the BG-11 medium with 3% NaNO_3 (45 mg.L^{-1}), pH 9.5, temperature 25°C was considered as the control condition, since it presents characteristics most similar to that found in the saline lakes. Besides the control condition, the following treatments were used varying only one parameter in each one: T1) BG-11 50% of NaNO_3 (750 mg.L^{-1}); T2) BG-11 0% (no N); T3) Temperature 30°C; T4) Temperature 35°C; T5) pH 10.5, and T6) pH 7.0. For detecting microcystins LR, RR, YR and LA, L-BMAA and saxitoxin, the LC-MS/MS technique was applied; to verify the potential of the species as producers of bioactive metabolites, assays were made to determine the anticholinesterase, antifungal, antioxidant, antibacterial and hemolytic activities. Our results confirmed the following assumptions for *Arthrospira platensis*: a) The presence of aerotopes is optional and the habit is planktonic; b) The absence of calyptra in apical cells, both in nature and culture materials, is a stable morphological characteristic of this species; c) Regularly spiral trichomes and straight or curve hormogonia are inherent characteristics in their development cycle; d) The phylogenetic variability of RNAr 16S and ITS (16S-23S) genes does not

express the phenotypic variability of the *Arthrospira* species; e) The populations of *A. platensis* in the same geographical region share the same phylogenetic clade; f) There is no production of cyanotoxins by *A. platensis*. The hypothesis that the growth of *A. platensis* is positively correlated with increased pH, nitrogen concentration and temperature was partially confirmed, since it was not possible to determine the relationship between the species growth and high temperature. For *Anabaenopsis elenkinii* the following hypotheses were confirmed: a) The presence of aerotopes is optional and the habit is planktonic; b) The phylogenetic variability of RNAr 16S and *cpcBA*-IGS genes corroborates the phenotypic variability of the *Anabaenopsis* species; c) The populations of *A. elenkinii* in the same geographical region share the same phylogenetic clade in the RNAr 16S tree; d) The growth of this species is positively correlated with increased pH and negatively correlated with high temperature; e) Temperature influences the rate of heterocytes formation in *A. elenkinii* ; f) Akinetes formation is not influenced by changes in nitrogen availability, temperature and pH; g) There is no production of cyanotoxins by *A. elenkinii*. It was not possible to confirm the hypothesis on the existence of cryptic species in the genus *Anabaenopsis* related to the morphotype of *A. elenkinii*. Therefore, they can not be distinguished in terms of habitat, geographic origin, morphology and phylogeny. However, RNAr 16S and ITS (16S-23S) phylogenetic trees indicate that the strains of *A. elenkinii* in Pantanal and Mexico are in recent process of evolution, closely related to the African strains. In both studied species production of microcystin LR, RR, YR and LA, L-BMAA and saxitoxin was not detected. The strain *A. elenkinii* CCIBt1059 proved positive for acetylcholinesterase and antifungal activity and the strain *A. platensis* CCIBt3335 showed positive results for antioxidant and antifungal activity. The other assays were negative. Finally, we consider the isolation and morphological, phylogenetic and ecophysiological characterization and the research on bioactive compounds in *A. elenkinii* CCIBt1059 and *A. platensis* CCIBt3335 strains represent a milestone for future studies and pave the way for potential biotechnological use of these strains which are very important and abundant in the saline lakes of Pantanal.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo



CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Conhecendo as Cianobactérias

As cianobactérias são bactérias (Procariontes) do tipo Gram-negativas que realizam fotossíntese oxigênica (oxifototróficas) e utilizam tipicamente a água como doadora de elétrons (Whitton & Potts 2000). Os fotossistemas I e II e clorofila *a*, estão presentes no aparato fotossintético da membrana dos tilacóides de todas as espécies, inclusive ficobiliproteínas arranjadas nos ficobilissomos atados à membrana externa dos tilacóides (Lee 1999). Alguns representantes do grupo apresentam ainda, clorofila *b* (*Prochloron didemni*), clorofila *d* (*Acaryochloris marina*) e recentemente foi descrita uma nova clorofila em estromatólitos, a clorofila *f* (Chen *et al.* 2010).

A presença de diferentes clorofilas em cianobactérias, especialmente as clorofilas *d* e *f*, permite-lhes utilizar a energia da região do espectro luminoso além do visível (infravermelho 700-750 nm), o que confere uma adição de 19% ao fluxo de fótons em relação à radiação fotossinteticamente ativa padrão (400-700 nm). Esta particularidade evidencia a vantagem adaptativa das cianobactérias frente aos fotossintetizantes eucariotos, que são incapazes de absorver energia luminosa além do espectro visível (Chen & Blankenship 2011). Além disso, as cianobactérias são os únicos organismos oxifototróficos que contêm mecanismos e adaptações para fixar nitrogênio atmosférico, e todas estas características adaptativas permitem que as cianobactérias colonizem os mais variados ambientes: terrestre, marinho, de água doce, além de ambientes extremos como fontes termais, geleiras, desertos, rochas nuas, lagoas alcalinas e hipersalinas (Komárek 2006).

A origem das cianobactérias é estimada em 3,5 a 2,7 bilhões de anos (Pré-Cambriano) com base em registros fósseis (Schopf 1993), biomarcadores orgânicos (Brocks *et al.* 1999) e análise de sequências genômicas (Hedges *et al.* 2001). A primeira estimativa de ocorrência de cianobactérias a 3,5 bilhões de anos (Schopf 1993), no entanto, tem sido questionada por Brasier *et al.* (2002) e Riding (2012). Acredita-se que estas primeiras cianobactérias desempenharam papel importante na produção de uma atmosfera rica em oxigênio, principalmente a partir de 2,3 bilhões de anos (Blankenship 1992), embora outras diferentes teorias tenham sido propostas para explicar o aumento de oxigênio atmosférico na Terra (Catling *et al.* 2001, Kasting 2001). Uma dessas teorias sugere que a transição de baixa para alta concentração de oxigênio foi causada pela maior perda de hidrogênio para o espaço após a fotólise do metano (CH₄), gás muito abundante na atmosfera primitiva (3,0-2,3 bilhões de anos) (Catling *et al.* 2001). Além disso, Kasting (2001) sugere que o aumento do oxigênio na

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

atmosfera primitiva pode ser explicado por mudanças geológicas, relacionadas também com o resfriamento da Terra ao invés da biológica (atribuída às cianobactérias).

De qualquer forma, as cianobactérias são organismos evolutivamente importantes, que podem ter sido o ancestral endossimbionte de um eucarioto que deu origem aos plastos (organelas fotossintéticas) que as algas e plantas possuem (Margulis 1970, Bhattacharya *et al.* 2004, Chan *et al.* 2010).

Tradicionalmente, as cianobactérias foram conhecidas como algas verde-azuladas e classificadas pelos botânicos entre as algas, sendo a sistemática do grupo regida pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica, atualmente designado como “Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas” (Código de Melbourne 2011). A classificação botânica das cianobactérias foi revisada por Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis & Komárek 1985, 1988, 1990, Komárek & Anagnostidis 1986, 1989, 1999, 2005), baseando-se, sobretudo, em características morfológicas do talo, modo de divisão celular e produção de células diferenciadas. Os referidos autores dividiram o grupo em quatro ordens: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales, contendo cerca de 2.800 espécies.

Embora a semelhança morfológica e estrutural com as bactérias tenha sido observada ainda no século XIX, apenas em 1962 o termo “Cyanobacteria” foi proposto, e baseando-se em estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares, alguns representantes foram classificados como bactérias e foram do ponto de vista nomenclatural, efetivamente incorporados no reino procariota (Stanier & Van Neil 1962). Esta designação foi aceita e publicada pela primeira vez em 1974 no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Guglielmi *et al.* 1993). Em 1978, a nomenclatura do grupo passou a ser regida também pelo Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (Stanier *et al.* 1978, Oren 2004) e Rippka *et al.* (1979), com base em culturas puras axênicas, elaboraram um sistema de classificação que foi posteriormente adotado e modificado por novas edições do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Staley & Holt 1989, Boone & Castenholz 2001).

Atualmente, em consequência do acúmulo de informações moleculares, os sistemas de classificação tradicionais têm sido modificados, acompanhando a tendência da sistemática bacteriana em reunir as características morfológicas, ecológicas, bioquímicas, fisiológicas, ultraestruturais e genéticas em sistemas de classificação polifásicos (Hoffmann *et al.* 2005, Komárek 2006). Resultado recente dos esforços de conciliação das abordagens botânica e bacteriológica é o sistema elaborado por Hoffmann *et al.* (2005), baseado em semelhança

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

genética (principalmente do RNAr 16S), características morfológicas e arranjo dos tilacóides. O sistema introduz modificações, sobretudo nos níveis hierárquicos mais elevados, reagrupando as ordens e famílias em quatro subclasses (**Tabela 1**).

Tabela 1. Sistema de Classificação Polifásica das Cianobactérias (Hoffmann *et al.* 2005).

Subclasse Gloeobacterophycidae nom. prov. – Cocóides sem tilacóides.
Ordem Gloeobacterales. Apenas uma família (Gloeobacteriaceae). Ex. <i>Gloeobacter</i>

Subclasse Synechococcophycidae nom. prov. Tilacóides paralelos à superfície celular.
Ordem Synechococcales – Organismos unicelulares ou coloniais. 4 famílias. Ex. <i>Synechococcus</i>
Ordem Pseudanabaenales – Organismos filamentosos estreitos (geralmente < 3µm diâmetro). 2 famílias. Ex. <i>Pseudanabaena</i>

Subclasse Oscillatoriohaptophycidae nom. prov. – Tilacóides radiais.
Ordem Chroococcales – Unicelulares ou coloniais, pseudofilamentoso/filamentoso. 11 famílias.
Ex. <i>Chroococcus</i> , <i>Spirulina</i>
Ordem Oscillatoriales – Organismos filamentosos grandes (geralmente > 3µm diâmetro). 5 famílias. Ex. <i>Arthrospira</i>

Subclasse Nostocophycidae nom. prov. – Heterocitadas, arranjo irregular dos tilacóides.
Ordem Nostocales. 10 famílias. Ex. <i>Anabaenopsis</i>

Apesar do enorme avanço das técnicas moleculares, a morfologia ainda fornece informações bastante úteis para a avaliação da variabilidade e diversidade das cianobactérias, único grupo procarionte que permite taxonomia baseada em caracteres morfológicos (Kováčik & Holecková 1984, Gautiner *et al.* 2007). De modo geral, muitos dos agrupamentos resultantes da análise de sequências gênicas, sobretudo do RNAr 16S, revelaram-se congruentes com os gêneros estabelecidos pelos métodos tradicionais (Komárek & Kastóvsky 2003, Komárek 2006). Entretanto, os gêneros clássicos frequentemente apresentam grande heterogeneidade morfológica, o que dificulta a correta classificação das espécies (Bazzichelli & Abdelahad 1994, Rajaniemi *et al.* 2005, Komárek 2006). Além disso, as cianobactérias apresentam ampla plasticidade fenotípica induzida por variabilidade ambiental (Litvaitis 2002), e nem sempre as características diacríticas estão presentes nas populações naturais ou mantidas em cultura (Zapomelová *et al.* 2008, Santos *et al.* 2011). Vale ressaltar que muitas vezes os estudos filogenéticos e toxicológicos são realizados em espécies ou linhagens pobremente descritas e incorretamente identificadas (Desikachary & Jeeji-Bai 1996, Willmotte & Herdman 2001, Li *et al.* 2003, Komárek 2006), o que dificulta a correta comparação entre os estudos. Desta forma, a taxonomia polifásica constitui-se em um

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

importante conceito para correta caracterização e classificação das cianobactérias (Rajaniemi *et al.* 2005), o que evidencia a importância de ampliar o conhecimento morfológico, fisiológico, toxicológico e molecular sobre estes organismos.

1.2. Importância das Cianobactérias

As cianobactérias, por constituírem juntamente com as algas os produtores primários dos ecossistemas aquáticos, têm importância ecológica intrínseca à sua existência. Participam dos grandes ciclos geoquímicos do carbono, nitrogênio e oxigênio na Terra a bilhões de anos (Couradeau *et al.* 2011). Cerca da metade da produção de oxigênio e fotossíntese global é realizada pelo fitoplâncton marinho, o qual é constituído principalmente por cianobactérias picoplantônicas (Fuhrman 2003), e 25% da fotossíntese global pode ser representada pelas cianobactérias marinhas *Synechococcus* e *Prochlorococcus* (Jansson & Northen 2010). Além de sua grande importância ecológica, as cianobactérias têm despertado interesse da comunidade científica internacional devido sua ampla distribuição geográfica, espécies com potencial biotecnológico, formadoras de florações e potencialmente tóxicas (Komárek 2006).

Em consequência da eutrofização da água em todo o mundo, florações de cianobactérias são comuns nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. As espécies planctônicas de cianobactérias são intensivamente favorecidas pelas condições ambientais ocasionadas pelo processo de eutrofização, como a baixa transparência da água, elevados valores de pH e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Padisák 1997, Molica *et al.* 2002, Tundisi *et al.* 2006, Sant'Anna *et al.* 2008). Além disso, as elevadas temperaturas da água e luminosidade das regiões tropicais favorecem o desenvolvimento e formação de florações de cianobactérias (Bouvy *et al.* 2000, Bicudo & Bicudo 2008). Estas florações podem conduzir a graves consequências ecológicas e econômicas e representam um problema de saúde pública e ambiental, por produzirem, por exemplo, cianotoxinas que agem sobre invertebrados, peixes, aves e mamíferos, inclusive o homem (Carmichael *et al.* 2001, Chorus & Bartram 1999, Lagos *et al.* 1999, Komárek *et al.* 2001, Molica *et al.* 2002, Lagos 2003).

De modo geral, todas as espécies de cianobactérias são consideradas potencialmente tóxicas (Cox *et al.* 2005). Muitas espécies são conhecidas como produtoras de toxinas específicas (Carmichael 1997, Metcalf *et al.* 2008) e outras substâncias causadoras de odor e sabor desagradáveis à água (Persson 1996). No Brasil, os principais gêneros conhecidos com produção de toxinas são *Microcystis*, *Radiocystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum* (citado

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

como *Anabaena*), *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis* (Sant'Anna & Azevedo 2000, Sant'Anna *et al.* 2007, 2008).

Atualmente, os estudos toxicológicos de cianobactérias têm se concentrado nas espécies que ocorrem em reservatórios urbanos eutrofizados, tanto no Brasil como em outras partes do mundo, devido à ampla ocorrência de florações tóxicas nesses sistemas (Molica *et al.* 2002, Tundizi *et al.* 2006, Sant'Anna *et al.* 2008). Por outro lado, são extremamente raros estudos sobre a produção de cianotoxinas e/ou compostos bioativos por cianobactérias de ambientes naturais com ausência ou pouco influência antrópica, como as lagoas salinas do Pantanal.

1.3. Cianobactérias e Mudanças Climáticas Globais

De acordo com resultados recentes divulgados pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC 2007), a elevação da temperatura global constitui uma das ameaças mais sérias à biodiversidade. Estes estudos indicam que no período de 200 anos, entre 1900 e 2100, a temperatura média do planeta pode aumentar entre 1,4 e 5,8 °C, o que representa um aquecimento rápido e que, aparentemente, não tem precedente durante os últimos 10.000 anos.

Estudos indicam que as mudanças no ambiente global estão associadas com o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, aumento da temperatura e fluxos elevados de radiação ultravioleta em latitudes altas e médias (Beardall & Stojkovic 2006). Os efeitos de tais alterações ambientais podem ser específicos para cada espécie de microalgas e cianobactérias, e podem causar mudanças na composição das comunidades, na biomassa, bem como promover alterações na composição química e bioquímica destes microorganismos que formam a base da cadeia alimentar aquática, o que pode ter consequências para o fluxo de energia e de matéria aos níveis tróficos superiores (Beardall & Stojkovic 2006).

Os estudos sobre cianobactérias em relação à evolução, ecofisiologia, dinâmica e estrutura da comunidade sugerem que existe relação entre o aquecimento global e a proliferação de cianobactérias (Paerl & Huisman 2008). Alguns resultados recentes têm causado grande preocupação, uma vez que o aquecimento global parece intensificar os efeitos da eutrofização, trazendo, conseqüentemente, alterações nas comunidades de algas e cianobactérias (Bicudo & Bicudo 2008). Este provável aumento da temperatura pode acelerar os processos biológicos e a influência deste efeito sobre a dinâmica das algas e cianobactérias ainda é pouco conhecida.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

A mais recente evidência dos efeitos do aquecimento global sobre as cianobactérias constatou que nos lagos rasos estudados (83 na América do Sul e 60 na Europa) a proporção de cianobactérias em comunidades do fitoplâncton aumentou com a elevação da temperatura (Kosten *et al.* 2012). Os autores indicaram ainda um efeito sinérgico dos nutrientes e do clima. As implicações são de que num futuro clima mais quente e lagos mais concentrados em nutrientes é esperado dominância de cianobactérias e, somente reduzindo substancialmente os valores atuais de nutrientes nos lagos, as populações de cianobactérias poderão ser controladas.

1.4. Potencial biotecnológico das cianobactérias

O conceito de biotecnologia compreende a manipulação de organismos com o objetivo de obter processos e produtos de interesse econômico ou social. Atividades que envolvam a aplicação de conhecimentos de bioquímica, genética e fisiologia são consideradas como técnicas de biotecnologia, um ramo da ciência de caráter amplo e multidisciplinar atualmente em expansão, especialmente a biotecnologia de microalgas (Cobelas & Gallardo 1989, Hongsthong & Bunnag 2009).

As cianobactérias ganharam muita atenção nos últimos anos por causa de seu potencial uso em biotecnologia. Compostos biologicamente ativos antivirais, antibacterianos, antifúngicos e anticancerígenos foram detectados em extratos de cianobactérias e, além disso, várias cepas acumulam polihidroxialcanoatos que podem ser usados como substituto biodegradável para os plásticos de base petroquímica. Estudos recentes mostraram que regiões poluídas com óleo são ricas em cianobactérias associadas com outras bactérias capazes de degradar os componentes do óleo. Dentro dessas associações, as cianobactérias fornecem às bactérias que degradam óleo o oxigênio, compostos orgânicos e o nitrogênio fixado necessário aos processos de degradação (Abed *et al.* 2009).

O hidrogênio pode ser produzido por muitas cepas de cianobactérias pela atividade reversível da enzima hidrogenase e também, quando as cianobactérias crescem em condições limitadas por nitrogênio, onde o hidrogênio é formado como um subproduto da fixação do nitrogênio (N₂) pela nitrogenase (Quintana *et al.* 2011). Esta capacidade das cianobactérias de produzir hidrogênio é considerada como uma fonte promissora de energia alternativa (Abed *et al.* 2009). Mais de 14 gêneros de cianobactérias, incluindo *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Aphanocapsa*, *Cyanothece*, *Chroococcidiopsis*, *Microcoleus*, *Gloeobacter*, *Oscillatoria*, *Synechococcus*, *Microcystis* e *Arthrospira* (“*Spirulina platensis*”), são

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

conhecidos pela sua capacidade de produzir gás hidrogênio sob várias condições de cultura (Abed *et al.* 2009). No entanto, as cianobactérias heterocitadas são mais eficientes na produção de hidrogênio que as espécies não heterocitadas (Pinzon-Gamez *et al.* 2005). Assim, as pesquisas atuais se concentram em encontrar novas cepas com maior potencial para produzir hidrogênio e na engenharia genética para aperfeiçoar esta produção.

Além destas aplicações, as cianobactérias são também utilizadas na aquicultura, no tratamento de águas residuais, como alimentos, como fertilizantes, na produção de metabólitos secundários, incluindo exopolissacarídeos, vitaminas, enzimas, toxinas e produtos farmacêuticos. A literatura indica que pesquisas futuras devem se concentrar em isolar novas linhagens de cianobactérias que produzam substâncias de alto valor e na modificação genética de cepas existentes para garantir a produção máxima dos produtos desejados. Bibliotecas metagenômicas devem ser construídas de modo a descobrir novos genes funcionais que estão envolvidos na biossíntese de compostos biotecnológicos relevantes. Por fim, a produção em escala industrial dos produtos de cianobactérias requer otimização dos processos e condições de incubação a fim de aumentar a viabilidade desta produção (Abed *et al.* 2009).

Atividades antimicrobianas foram detectadas em extratos das Nostocales *Fischerella ambigua* isolada do solo e *Scytonema hofmanni* isolada de ambiente terrestre (Falch *et al.* 1995); também foi observada a produção de composto lipofílico com atividade antialgal e antifúngica a partir do extrato de *Hapalosiphon fontinalis*, uma espécie de água doce (Moore *et al.* 1987); substâncias bioativas com efeito inibitório para algumas cianobactérias, eubactérias e alguns invertebrados foram detectadas em extrato de *Nodularia harveyana*, um espécie de ambiente estuariano (Pushparaj *et al.* 1999). Além disso, uma espécie marinha tropical, *Hormothamnion enteromorphoides*, apresentou produção do peptídeo cíclico hormotamina A, o qual tem efeito antibiótico e citotóxico (Gerwick *et al.* 1992).

Estudos recentes têm demonstrado a grande diversidade metabólica das cianobactérias para produção de cianopeptídeos sintetizados pela via não ribossômica, que são catalisados por enzimas denominadas Policetídeo Sintase (PKS) e Peptídeo Sintetase Não Ribossômica (NRPS), sendo que muitas possuem sequências gênicas conhecidas (Silvia-Stenico *et al.* 2011). Devido à capacidade de produzir compostos bioativos, tais como toxinas, sideróforos e antibióticos com diversas propriedades farmacológicas (Nagarajan *et al.* 2011), o potencial biotecnológico das cianobactérias é bastante promissor, fato que contribui com o grande interesse em pesquisa de bioativos de cianobactérias nos últimos anos.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

Todo conhecimento disponível sobre a diversidade e fisiologia de cianobactérias serve como excelente base para explorar as suas aplicações em biotecnologia (Abed *et al.* 2009).

1.5. Os gêneros *Anabaenopsis* e *Arthrospira*

Anabaenopsis (Woloszýnska) Miller 1923

O gênero *Anabaenopsis*, que compreende espécies de cianobactérias filamentosas heterocitadas, foi originalmente estabelecido por Woloszýnska em 1912 como uma nova seção do gênero *Anabaena* Bory ex Flahault e, posteriormente, foi proposto como um novo gênero por Miller (1923) que designou *Anabaenopsis ellenkinii* Miller a espécie tipo do gênero. A principal característica distintiva de *Anabaenopsis* é a formação de heterocitos em pares a partir de células intercalares, mas, pela quebra do tricoma, os heterocitos passam a ser terminais, ficando um em cada extremidade (Taylor 1932, Jeeji-Bai *et al.* 1977, Komárek 2005). Esta característica particular do desenvolvimento dos heterocitos difere o gênero *Anabaenopsis* das espécies planctônicas e morfológicamente semelhantes de *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* (Jeeji-Bai *et al.* 1977, Jeeji-Bai 1980, Komárek & Anagnostidis 1989, Komárek 2005). O gênero é bem delimitado por critérios fenotípicos (Komárek & Anagnostidis 1989) e atualmente também foi confirmado por dados moleculares de sequências de RNAr 16S (Iteman *et al.* 2002, Rajaniemi *et al.* 2005, Hoffman *et al.* 2005).

O gênero *Anabaenopsis* compreende ao redor de 20 espécies, sua variabilidade fenotípica foi descrita por Jeeji-Bai *et al.* (1977, 1980) e foi revisada por Komárek (2005). As espécies são caracterizadas principalmente pelos filamentos solitários e planctônicos que crescem formando espiras irregulares ou regulares e, mais raramente apresentam filamentos retos. De acordo com Komárek (2005), todas as espécies de *Anabaenopsis* são planctônicas, a maioria pode formar florações e apresentar facultativamente aerótopos. As espécies são conhecidas principalmente para regiões tropicais e subtropicais e mais raramente citadas para regiões temperadas, geralmente no período mais quente (Jeeji-Bai 1980). A maioria das espécies ocorre em lagos e lagoas com altas concentrações de sais (salobras, alcalinas, salinas, “soda lakes” ou “salty lakes”) e regiões estuarinas (Jeeji-Bai 1980, Komárek 2005, Ballot *et al.* 2008). *Anabaenopsis ellenkinii* ocorre em águas salobras e alcalinas, sendo reconhecido como táxon alcalifílico (Iteman *et al.* 2002). Esta espécie é frequentemente documentada como parte da comunidade fitoplanctônica de lagos alcalino-salinos no leste da África, geralmente em densidades elevadas e associada com *Arthrospira* spp. (Ballot *et al.* 2004a, 2004b, 2005,

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

2008). Em 2007, foi documentada a mortalidade em massa de pássaros, principalmente flamingos (*Phoeniconaias minor* Goeffroy) associada a florações tóxicas de *Anabaenopsis* spp. e *Arthrospira fusiformis* em um lago raso na Grécia (Lago Koronia) (Moustaka-Gouni 2007). Outros autores reconhecem a produção de microcistinas por espécies de *Anabaenopsis* (Lanaras & Cook 1994).

No Brasil foram documentadas quatro espécies de *Anabaenopsis* (Tabela 2) e o primeiro registro de ocorrência do gênero foi documento por Peixoto & Huszar (1983), que mencionaram *Anabaenopsis circularis* (G.S.West) Wollosz. & V.V.Miller para uma lagoa do Rio de Janeiro.

Tabela 2. Distribuição geográfica das espécies de *Anabaenopsis* no Brasil.

Espécie	Localidade de registro (Estado)	Bacia Hidrográfica	Referência
<i>A. circularis</i>	Rio de Janeiro; Rio Grande do Sul	Atlântico Sudeste; Atlântico Sul	Peixoto & Huszar (1983); Werner <i>et al.</i> (2013)
<i>A. cunningtonii</i>	Mato Grosso do Sul	Paraguai (Pantanal)	Santos & Sant'Anna (2010)
<i>A. elenkinii</i>	Mato Grosso do Sul	Paraguai (Pantanal)	Santos & Sant'Anna (2010)
<i>A. tanganyikae</i>	São Paulo	Atlântico Sudeste	Sant'Anna (1991)

Conforme observado, a espécie *Anabaenopsis elenkinii* parece ser restrita as lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia. No entanto, além do presente estudo e do trabalho de Santos *et al.* (2011), que demonstraram o efeito do pH no crescimento e morfologia de *A. elenkinii*, inexistem outros estudos experimentais com qualquer espécie de *Anabaenopsis* no Brasil.

Arthrospira Stizenberger ex Gomont 1892

O gênero *Arthrospira* Stizenberger ex Gomont, criado por Stizenberger em 1852, teve como base a espécie originalmente descrita por Hassall em 1845, como *Spirillum jenneri* Hass., a qual foi nomeada por Kützing (1849) como *Spirulina jenneri* (Hass.) Kütz. e transferida para *Arthrospira* por Stizenberger como *Arthrospira jenneri* (Hass.) Stiz. (Jeeji-Bai 1999). Em 1854, Stizenberger descreveu outra espécie, *A. baryana* Stiz., que é mencionada por Gomont (1892) como sinônimo de *A. jenneri*. No entanto, estes autores e outros seguidores não designaram o tipo. Desikachary (1959) designou *A. jenneri* (Hass.) Stiz. como a espécie tipo do gênero. A diagnose de *Arthrospira* apresentada em Desikachary

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

(1959) inclui todas as características essenciais: “Tricomas multicelulares, cilíndricos, sem bainha, frouxamente e regularmente espiralados, geralmente de diâmetro relativamente grande e espiras de grandes dimensões, com curtas e poucas espiras (quando comparados com *Spirulina*); septos da parede celular distintos, ápices levemente ou não atenuados, célula apical arredondada, caliptra ausente”.

Arthrospira apresenta ao redor de 15 espécies que ocorrem em habitats de água corrente ou parada, lagoas de água doce, alcalina, salobra e em ambientes marinhos. Ao contrário dos membros de *Spirulina*, elas não ocorrem em ambientes termais. Grande parte das espécies conhecidas é bentônica e algumas planctônicas em regiões tropicais. A maioria das espécies de água doce é planctônica com presença de aerótopos (Jeeji-Bai 1999, Komárek *et al.* 2003). Em populações naturais o gênero apresenta tipicamente tricomas espiralados, mas podem apresentar mudanças para formas retas em culturas intensivas. Este fenômeno de transformação da orientação dos tricomas nas formas espiraladas e retas é interessante do ponto de vista taxonômico, mas não foi satisfatoriamente explicado (Lewin 1980, Jeeji Bai 1985, Desikachary & Jeeji-Bai 1996, Komárek & Anagnostidis 2005).

Algumas espécies de *Arthrospira* são muito utilizadas como fonte de alimento rico em proteínas (Komárek *et al.* 2003). *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont é uma espécie amplamente utilizada como produto comercial com alto valor nutricional, servindo como matéria prima para indústria alimentícia, química e farmacêutica (Pelizer 2002, Volkmann *et al.* 2008). Esta espécie tem sido amplamente cultivada (Melack 1979) e estudada devido à suas propriedades nutricionais e terapêuticas no tratamento de doenças como câncer, hipercolesterolemia e aterosclerose (Colla *et al.* 2007a,b). Além disso, esta espécie produz compostos fenólicos, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatório e redutores de colesterol (Milié *et al.* 1998, Estrada *et al.* 2001, Hongsthong & Bunnag 2009). *A. maxima* e *A. fusiformis* também são espécies comumente utilizadas em cultura para vários produtos biotecnológicos (Oliveira *et al.* 1999). Estes táxons são usualmente mencionados com um nome taxonômico incorreto “*Spirulina*” e “*Spirulina platensis*” que representam uma designação comercial (Komárek & Anagnostidis 2005). Sua utilização como suplemento alimentício para o homem e animais é indicada pela FAO (Food and Agriculture Organization) por apresentar composição de aminoácidos de proteínas superior aos valores recomendados pela referida organização, cerca de 65-70% do peso seco é constituído de proteínas (Dillon *et al.* 1995), e vários produtos comercializados de *Arthrospira* são

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

classificados pela FDA (Food and Drug Administration) como alimento “geralmente reconhecido como seguro” – GRAS (generally recognized as safe) para humanos.

No Brasil foram documentadas quatro espécies de *Arthrospira* (**Tabela 3**). O primeiro registro foi publicado por Magrin *et al.* (1997), que mencionaram *A. jenneri* e *A. skujae* para lagos de Minas Gerais e Rondônia, respectivamente.

Tabela 3. Distribuição geográfica das espécies de *Arthrospira* no Brasil.

Espécie	Local de registro (Estado)	Bacia Hidrográfica	Referência
<i>A. jenneri</i>	Goiás; Minas Gerais; São Paulo	Paraná; Atlântico Sudeste Atlântico Sudeste	Nogueira <i>et al.</i> 2008; Magrin <i>et al.</i> 1997; Sant’Anna <i>et al.</i> 2011
<i>A. platensis</i>	Mato Grosso do Sul	Paraguai (Pantanal)	Santos & Sant’Anna 2010
<i>A. santannae</i>	Rio de Janeiro	Atlântico Sudeste	Komárek & Komárková-Legnerová 2007
<i>A. skujae</i>	Goiás; Rio de Janeiro; Rondônia	Paraná; Atlântico Sudeste; Amazônica	Nogueira <i>et al.</i> 2008 (como <i>S. gigantea</i>) Magrin <i>et al.</i> 1997.

Os trabalhos desenvolvidos no país com a espécie *Arthrospira platensis* têm focado a influência da temperatura, pH e nutrientes (principalmente fontes de nitrogênio) na produção de biomassa em fotobiorreatores e testes de propriedades antioxidantes (Carvalho *et al.* 2004, Sánchez-Luna *et al.* 2004, 2007, Bertolin *et al.* 2005, Colla *et al.* 2007a,b, Bezerra *et al.* 2008). Em todos estes trabalhos, as cepas estudadas não são provenientes de ambientes brasileiros, a maioria utilizou cepas de *Arthrospira platensis* obtidas da coleção de cultura da Universidade do Texas (*Arthrospira platensis* UTEX 1926) (Sánchez-Luna *et al.* 2004, 2007, Bezerra *et al.* 2008). Morais *et al.* (2008) afirmaram ter isolado a primeira cepa brasileira de *Arthrospira* que foi proveniente da lagoa Mangueira (Rio Grande do Sul), a qual foi denominada *Arthrospira* sp. LEB 18. No entanto, os próprios autores destacaram que, apesar da lagoa Mangueira apresentar condições favoráveis para o desenvolvimento de *Arthrospira* spp. (pH >8, elevadas concentrações de carbonatos e bicarbonatos), a ocorrência deste organismo jamais foi documentada para esta lagoa (Morais *et al.* 2008).

Conforme observado na **Tabela 3**, a espécie *Arthrospira platensis* parece ser restrita às lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia. A ocorrência desta espécie pode representar uma importante fonte de cepas nativas para estudos de bioprospecção no Brasil.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

2. ÁREA DE ESTUDO: O PANTANAL, AS LAGOAS SALINAS E O CONCEITO DE SALINIDADE

2.1. O Pantanal

O Pantanal está localizado no centro da América do Sul e é reconhecido como a maior área úmida do planeta, com área aproximada de 210.00 Km² distribuídos no Brasil (ca. 80%), Bolívia (ca. 15%) e Paraguai (ca. 5%) (Swarts 2000). Esta dimensão corresponde a cerca de 680 km no sentido norte-sul e 300 km no sentido leste-oeste (Allem & Valls 1987).

Em território brasileiro o Pantanal ocupa cerca de 140.000 km² (**Figura 1**) nos estados de Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%) (Silva & Abdon 1998). Inserido na Bacia do Alto Paraguai (BAP), o Pantanal funciona como um corredor de transição entre as bacias Amazônica e Prata. É uma região única na qual se encontram o Cerrado, o Chaco, a Amazônia, a Mata Atlântica e o Bosque Seco Chiquitano. Esta situação, somada aos pulsos de inundação, permite particular diversidade e variabilidade de espécies e habitats aquáticos no Pantanal, que se configura num mosaico de ecossistemas aquáticos com rica biodiversidade florística, faunística e de microorganismos (Alho & Gonçalves 2005, Junk & Cunha 2005, Junk *et al.* 2006).

2.2. A Nhecolândia e suas lagoas diversificadas

A sub-região do Pantanal da Nhecolândia destaca-se como uma região muito particular e complexa, com densa rede hidrográfica. Está localizada em sua maior parte no município de Corumbá, MS. Limita-se ao norte e ao sul, respectivamente, pelos Rios Taquari e Negro, a leste pela escarpa da Serra de Maracajú e a oeste pelo Rio Paraguai (Allem & Valls 1987, Fernandes *et al.* 1999). Com área estimada em 26.921 km², a Nhecolândia ocupa 19,5% da área total do Pantanal (em território brasileiro), representando uma das maiores sub-regiões deste bioma (Silva & Abdon 1998).

O clima na região da Nhecolândia é do tipo Awa: tropical de altitude, megatérmico (a temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C), com inverno seco e chuvas no verão; ocorrem duas estações bem contrastantes, os meses de novembro a março são caracterizados como época chuvosa, enquanto os de abril a outubro são considerados de seca; temperatura média anual de 25,5°C e precipitação média anual 1.182,7 mm (Soriano 1999).

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

A principal característica do Pantanal da Nhecolândia é a presença de milhares de lagoas rasas (profundidade não excede 2 m) predominantemente circulares, com extensão de 50 m a 2-3 km no sentido mais longo, as quais de acordo com suas características limnológicas diferenciadas são denominadas regionalmente como “baías”, “salitradas” e “salinas” (Allem & Valls 1987, Calheiros & Oliveira 1999). Fernandes (2007) estimou a presença de 9.324 lagoas na Baixa Nhecolândia, 84% destas consideradas baías (7.832) e 16% consideradas salinas (1.492).

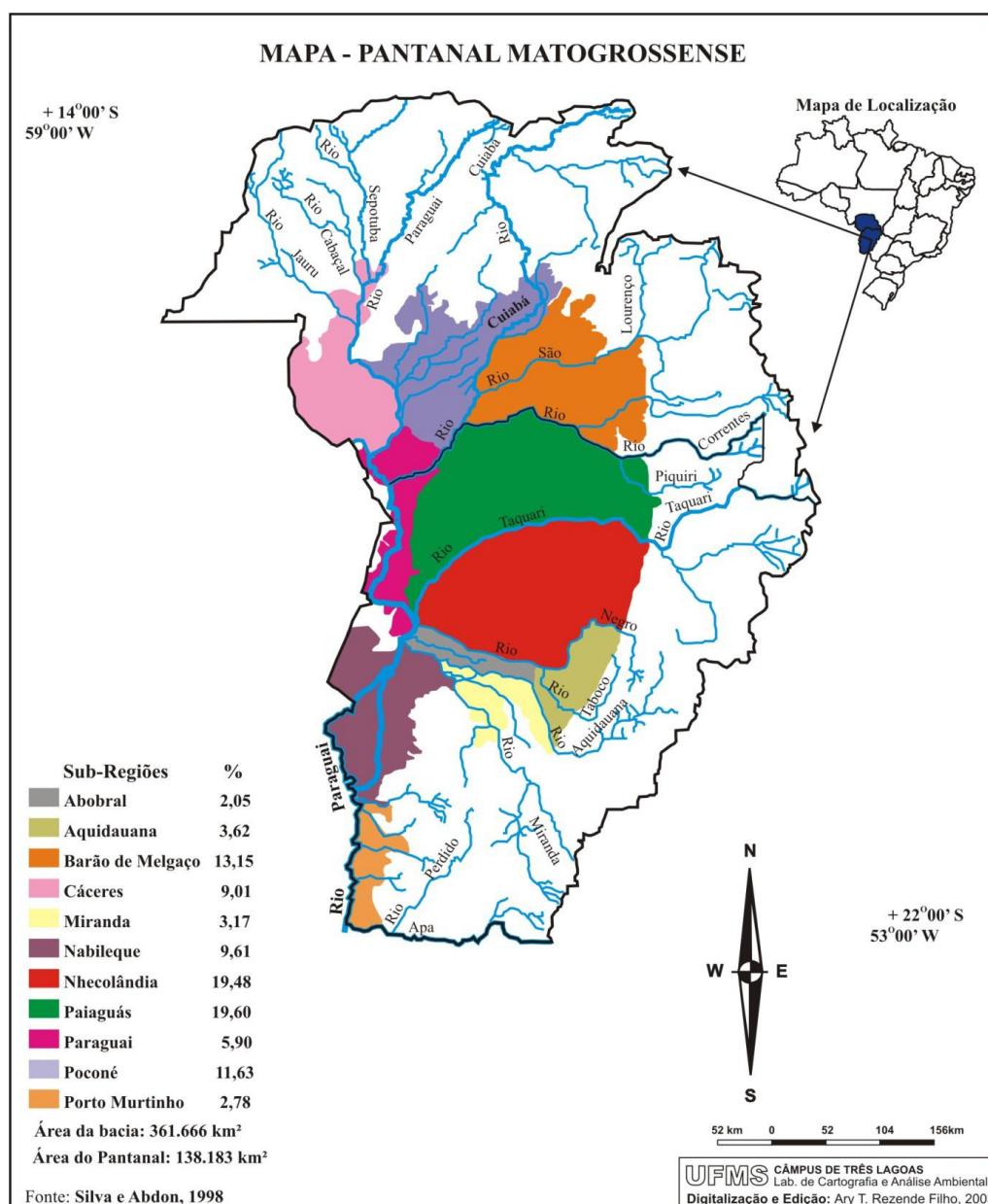


Figura 1. O Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões, conforme Silva & Abdon (1998) e adaptado por Rezende-Filho (2003).

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

As salinas da Nhecolândia são lagoas alcalinas de água salobra, de coloração diversificada, esverdeada, azulada ou marrom acastanhada, dominadas por cianobactérias (*Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis*) e pela diatomácea *Craticula* cf. *buderi* Lange-Bertalot, ricas em íons sódio e potássio, caracterizadas por superfícies sempre abertas, livres de macrófitas e peixes, circundadas por praias de areia branca (sem vegetação). Essas lagoas permanecem isoladas de outras lagoas por serem protegidas por regiões mais elevadas e recobertas com floresta denominadas “cordilheiras”. As condições limnológicas das salinas são consideradas extremas devido ao pH altamente alcalino (9-11) e elevada condutividade ($>2.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), características típicas de ambientes com alta produtividade fitoplanctônica e restritos em termos de fauna e flora (Brum & Sousa 1985, Mourão *et al.* 1988, Por 1995, Santos & Sant’Anna 2010).

As baías apresentam águas ligeiramente ácidas (pH 5-7,4), pobres em eletrólitos (condutividade $<1.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), densas concentrações de macrófitas, presença de peixes e apresentam ligação com outras lagoas durante o período de cheia através de corixos e vazantes (Mourão *et al.* 1988, Sakamoto *et al.* 1999). Nessas lagoas a riqueza de espécies de microalgas é elevada quando comparada às salinas (Santos 2008). As lagoas salitradas apresentam características intermediárias entre as baías e salinas. Estas lagoas, assim como as baías, conectam-se com outras lagoas nos períodos de cheia. Além disso, o pH é geralmente baixo (5-7), apresentam macrófitas no seu interior e maior riqueza de microalgas quando comparada às salinas. Nos períodos de seca, as lagoas salitradas apresentam pH elevado (até 9), o que as aproximam das características das salinas, inclusive com a presença das cianobactérias *Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis* (Santos & Sant’Anna 2010) e, nos períodos de cheia predominam espécies de desmídias (Santos 2008).

A vista aérea desta sub-região (**Figura 2**) mostra fisionomia bastante típica, caracterizada pelas inúmeras lagoas, campos limpos, bosques, cerrados, cerradão (“cordilheiras”) e savanas (Alem & Valls 1987, Embrapa 1997).

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo



Figura 2. A- Vista aérea do Pantanal da Nhecolândia com seus diferentes tipos de lagoas: salinas, salitradas e baías (Foto A.Y. Sakamoto, 2001). B- Vista aérea da lagoa Salina do Meio (Foto A. Pott, *In*: Pott & Pott 2000).

Os moradores da região reconhecem os três diferentes tipos de lagoas presentes na Nhecolândia e essa denominação regional (salinas, salitradas e baías) é amplamente adotada pelos pesquisadores que investigam a região (Cunha 1943, Sakamoto *et al.* 1999, Barbiéro *et al.* 2002, Santos *et al.* 2004, Alho & Gonçalves 2005, Junk & Cunha 2005, Junk *et al.* 2006, Malone *et al.* 2007, Santos 2005, 2008, Santos & Sant'Anna 2010).

A pecuária extensiva é a principal atividade econômica na Nhecolândia (Calheiros & Oliveira 1999) e as lagoas salinas são as mais procuradas pelo gado, pois contribuem com o suprimento de sais minerais (Brum & Souza 1985). Nessas lagoas é comum a presença de aves migratórias oriundas principalmente da América do Norte (Alho & Gonçalves 2005). Apesar da introdução do gado na região a mais de 200 anos, o Pantanal é ainda, considerado bem preservado e apresenta relativamente pouca influência antrópica (Abdon *et al.* 2007).

A importância das algas e cianobactérias nas lagoas desta região foi ressaltada por Cunha (1943). Naquela ocasião, o autor destacara a importância de realizar estudos limnológicos nas lagoas salinas e indicou a provável participação da comunidade fitoplanctônica nas características físicas e químicas dessas lagoas, inclusive conferindo diferente coloração as suas águas. No entanto, apenas recentemente foi demonstrado que *Anabaenopsis elenkinii* é a espécie de cianobactéria dominante nas lagoas salinas da Nhecolândia (Santos & Sant'Anna 2010), e que contribui com a coloração diversa dessas lagoas, juntamente com *Arthrospira platensis* (**Figura 3**).

Almeida *et al.* (2003) realizaram estudo em 77 lagoas na região da Baixa Nhecolândia e constataram que após as cheias, as lagoas mais rasas secam, enquanto as mais profundas, em

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

geral alcalinas e salinas, mantêm-se com praias de areia alva. Com a continuidade da estiagem, as lagoas alcalinas evaporam, aumentando a salinidade criando ambiente propício para floração de algas diversas. Estes autores sugerem, de acordo com dados de pH e condutividade elétrica (CE), classificar as lagoas da Nhecolândia em pelo menos dois grandes grupos, as que exibem salinidade (eventualmente salobras) e as que não exibem (lagoas de água doce). Nas primeiras distinguiram ainda lagoas hiperalcalinas (pH >8,0 e CE >5.000 $\mu\text{S cm}^{-1}$) e lagoas alcalinas (pH 7-8 e CE médio superior a 1.000 $\mu\text{S cm}^{-1}$). As lagoas não alcalinas teriam CE muito variada (média de 516 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e pH <7,0) representando a maioria (59) das 77 lagoas estudadas.

Mourão *et al.* (1988) ao realizarem experimento de bioensaio com peixes de lagoas da Nhecolândia, constataram que os peixes que ocorrem nas baías quando submetidos à água das salinas em seu pH natural (9,67) morreram num intervalo de 1 a 52 horas, enquanto os que foram submetidos às águas das salinas com pH corrigido para 7 (adicionando HCl 0,1 N), assim como os do controle, sobreviveram por todo o período do experimento (72 horas). De acordo com os resultados destes autores, o pH atuou como fator limitante aos peixes nas salinas, podendo ou não agir em sinergismo com outros fatores “não identificados”. Mourão (1989) comenta que devido a densidade extremamente elevada de cianobactérias na lagoa Salina do Meio, é provável a existência de concentrações elevadas de metabólitos potencialmente tóxicos produzidos por esses organismos. Além disso, o autor documentou grandes concentrações de hidróxido de amônio tóxico, o qual pode atuar juntamente com o pH como fatores limitantes ao desenvolvimento de peixes e de algas nesta lagoa.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo



Figura 3. Aspecto das florações de *Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis* nas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia. **A-B:** Salina do Meio – floração predominante de *A. elenkinii*. **C-D:** Salina Pedra do Sol – **C.** floração predominante de *A. platensis*; **D.** floração predominante de *A. elenkinii*.

A produtividade primária fitoplanctônica é extremamente elevada na lagoa Salina do Meio (2.225 mg.L^{-1} clorofila *a*), comparável ao lago Aranguadi (Etiópia), considerado o lago mais produtivo do mundo (Mourão 1989). Em decorrência das condições limnológicas extremas da lagoa Salina do Meio, a comunidade zooplanctônica é basicamente representada pelo copépodo *Metacyclops mendocinus* Wierzejski, que apresenta elevadas densidades (Medina-Júnior & Rietzler 2005).

Os elevados valores de pH (>9), condutividade elétrica ($>2.000 \text{ } \mu\text{S/cm}$), concentração de sais, nutrientes, densas concentrações de cianobactérias e ausência de peixes nas salinas da Nhecolândia são comparáveis aos mesmos parâmetros conhecidos para lagos rasos alcalinos (“Soda Lakes”) de regiões áridas da Austrália (Hart *et al.* 1991), da Nigéria (Egborge 1994), da Etiópia (Tudorancea & Harrinson 1988) e do Quênia (Ballot *et al.* 2008). Outra

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

característica interessante nas lagoas salinas da Nhecolândia, é que o nitrogênio provavelmente seja o fator limitante, visto que os valores obtidos na Salina do Meio de razão nitrogênio/fósforo (N/P) foi de 1,22 na superfície e 1,12 no fundo (Mourão 1989). Além da baixa razão N/P, a razão nitrogênio inorgânico dissolvido/nitrogênio total (NID/N-Kjedahl) foi extremamente baixa, sugerindo que apenas uma fração mínima de 1% do nitrogênio presente se encontra na forma disponível para a atividade fotossintética. Em virtude da baixa razão N/P, é provável que as cianobactérias tenham maior vantagem competitiva neste ambiente, visto que é o único grupo fitoplanctônico capaz de fixar nitrogênio atmosférico, o que corrobora com a ocorrência de floração da cianobactéria heterocitada *Anabaenopsis elenkinii* nas salinas da Nhecolândia (Santos & Sant'Anna 2010, Santos *et al.* 2011). Tal observação é extremamente interessante, pois difere da grande maioria dos sistemas aquáticos continentais onde o fósforo é considerado o fator limitante para as algas e cianobactérias (Rebolças *et al.* 2006, Tundisi *et al.* 2006).

Diante do exposto, Mourão (1989) levantou a hipótese que a elevada densidade de cianobactérias (*Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis*) na Salina do Meio possa contribuir com substâncias tóxicas que inibem a ocorrência de peixes e outros organismos. Portanto, a realização de estudo experimental com estas espécies, testadas em diferentes condições de cultura, é extremamente interessante, e pode contribuir com o entendimento dos aspectos fisiológicos e de produção ou não de toxinas por estas cianobactérias e sua influência nesse ambiente tão particular.

2.3. A salinidade

Salinidade é o termo químico correto para designar a composição iônica da água, ou seja, o valor da concentração em sais dissolvidos na água. Expressa em mg.L^{-1} ou meq.L^{-1} , que são equivalentes à massa ou ao volume nas soluções diluídas. A salinidade das águas marinhas é expressa em gramas de sal dissolvido (NaCl) por quilograma de água do mar (*ppt* - "*parts per thousand*" ou ‰) ou, por uma unidade adimensional, chamada de *psu*, que significa "*practical sality unit*" (unidade prática de salinidade - ups) e que corresponde a 1 ppt (Wetzel 1993).

Até 1950, usavam-se métodos químicos para se estabelecer a salinidade, embora já se soubesse da viabilidade do emprego de metodologia física. Atualmente, a salinidade também vem sendo determinada a partir da condutividade elétrica da água. Sabendo-se que a condutividade elétrica é diretamente proporcional à salinidade, empregam-se conversões

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

algorítmicas para se determinar a salinidade. Além da condutividade, outros métodos indiretos têm sido testados para se estabelecer valores de salinidade, como a refração da luz provocada pelos cristais de sal, bem como a densidade da água (Emery & Thonson 1998, Santangelo 2005).

Mianping (2001) propôs o termo *Salinologia*, definida como o estudo dos lagos salinos interiores. Distinguiu os lagos salinos em dois grandes grupos: lagos salinos *stricto sensu* e *sensu lato*, o primeiro se refere aos lagos em que o emprego do limite de salinidade é comumente usado no sentido da origem geológica e este limite de salinidade é mais elevado que a média de salinidade mundial da água do oceano (>35 ups); o segundo termo se refere aos lagos no qual alguns grupos orgânicos apresentam significativas mudanças no limite de salinidade, e este limite é menor que a média de salinidade mundial da água do oceano (<35 ups), mas ainda assim, afeta as comunidades biológicas.

A composição dos sais dissolvidos na água é variável entre os diferentes ambientes, dependendo principalmente do tipo de rocha constituinte da bacia de drenagem, nos casos de bacias fechadas (onde a água não tem saída superficial por rios até o mar). No entanto, de maneira geral, oito íons contribuem de forma mais significativa para a salinidade dos sistemas aquáticos continentais, sendo representados entre os cátions o Cálcio (Ca^{++}), Magnésio (Mg^{++}), Sódio (Na^{++}) e Potássio (K^{+}), e entre os ânions o Bicarbonato (HCO_3^{-}), Carbonato (CO_3^{--}), Sulfato (SO_4^{--}) e Cloreto (Cl^{-}) (Wetzel 2001a,b). Os fatores que governam a salinidade são basicamente a lixiviação do solo, escorrência (fluxo de água em solo saturado de umidade) da bacia de drenagem, precipitação e evaporação (Wetzel 1993, Esteves 1998, Almeida *et al.* 2011).

O processo de formação natural de lagoas salobras e salinas, a partir de bacias fechadas nas regiões áridas e semi-áridas do planeta, é denominado *salinização primária*. O aumento da salinidade em lagoas de bacias fechadas e alagados, em função de atividades humanas, recebe o nome de *salinização secundária* ou *antrópica* (Williams 1999). No Brasil, as salinas da Nhecolândia e os açudes do Nordeste são exemplos típicos de lagoas formadas por salinização primária em regiões com déficit hídrico, ou seja, a média da evaporação anual é maior que a precipitação (Esteves 1998).

Nos sistemas aquáticos continentais, a salinidade pode ser aferida com base na condutividade elétrica. Diversos autores utilizam diferentes limites de salinidade-condutividade para classificar as águas, dois exemplos são apresentados na **Tabela 4**.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

Vale destacar que água dos oceanos tem salinidade média aproximada de 35 ups, enquanto a salinidade média da água das lagoas salinas do Pantanal é de 4,6 ups (variando de 1,4-11,8), e considera-se água salobra aquela que tem salinidades entre 0,5 e 30 ups. Desta maneira, a água das lagoas salinas do Pantanal é salobra e não salina propriamente dita. As águas consideradas doces, podem apresentar salinidade entre 0 e 0,5 ups. Entretanto, esta “salinidade” pode ser devida a compostos químicos muito diferentes da água do mar, que é constituída principalmente por NaCl (Wetzel 1993).

Tabela 4. Classificação das águas continentais segundo a concentração de sais (ups) (Remane & Schlieper 1971) e segundo a condutividade (Almeida *et al.* 2011).

Característica	Salinidade (ups)	Característica	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)
Água doce	< 0,5	Água doce	< 100
Oligohalina	0,5 – 5,0	Com baixa ou média salinidade	100 – 750
Mesohalina	5,0 – 18,0	Com alta salinidade	750 – 2250
Polialina	18,0 – 30,0	Com salinidade muito alta	2250 – 5000
Eurihalina	30,0 – 40,0	Água hipersalina	> 5000
Hiperhalina	> 40	-	-

A salinidade nos ambientes aquáticos continentais tem grande influência na determinação dos organismos aptos a colonizá-los (Williams *et al.* 1990), além de afetar diretamente a capacidade de osmorregulação dos organismos (Remane & Schlieper 1971) e, portanto, cada espécie tem seu nível máximo de tolerância à salinidade e sua faixa ótima para o crescimento. A salinidade também pode afetar indiretamente as comunidades, alterando as características físicas e químicas da água, bem como as interações entre as espécies (Williams *et al.* 1990). Por exemplo, a salinidade altera a capacidade de dissolução do oxigênio na água, o pH e a composição iônica (Wetzel 2001 a,b), podendo estes fatores refletir-se na estrutura da comunidade (Williams 1998) e alterar também as relações entre as espécies, como a predação e a competição (Williams *et al.* 1990).

Em geral, os organismos mais bem adaptados às baixas salinidades são mais sensíveis ao seu aumento quando comparados à redução da salinidade para organismos adaptados a altas salinidades, e, portanto, a diversidade específica tem relação direta com a salinidade (Wetzel 1993). Assim, existe alto número de espécies nas águas doces, baixos valores em águas salobras, especialmente entre 5,0 e 7,0 ups, e aumento do número novamente conforme se aproxima da água marinha (Remane & Schlieper 1971). Esta relação de mudança na

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

riqueza de espécies e salinidade também foi demonstrada para as algas e cianobactérias de lagoas salinas, salitradas e baías da Nhecolândia, onde a menor riqueza de espécies foi encontrada na lagoa salina (água salobra) e as maiores riquezas nas lagoas de água doce (baía) e água doce a eventualmente salobra (salitrada) (Santos 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a variabilidade morfológica em diferentes condições de cultura, bem como realizar análises moleculares e de produção de substâncias bioativas das cianobactérias *Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis* provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia.

3.2. Objetivos específicos

- Estudar a variabilidade dos caracteres morfológicos diacríticos das duas espécies;
- Estudar o desenvolvimento das cepas em diferentes condições de cultura;
- Caracterizar filogeneticamente as cepas estudadas;
- Pesquisar a produção de toxinas e de outras substâncias bioativas nas cepas analisadas.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdon, M.M., Silva, J.S.V., Souza, I.M., Ramon, V.T., Rampazzo, J. & Ferrari, D.L. 2007.** Desmatamento no Bioma Pantanal até o ano de 2002: relações com a fitofisionomia e limites municipais. *Revista Brasileira de Cartografia* 59(1): 17-24.
- Abed, R.M.M., Dobretsov, S. and Sudesh, K. 2009.** Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1–12.
- Alho, C.J.R & Gonçalves, H.C. 2005.** Biodiversidade do Pantanal: ecologia & conservação. Ed. UNIDERP, Campo Grande.
- Allem, A.C. & Valls, J.F.M. 1987.** Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense. Documentos 8. Empresa Brasileira Agropecuária/Centro Nacional de Recursos Genéticos, Brasília.
- Almeida, T.I.R., Calijuri, M.C., Falco, P.B., Casali, S.P., Kupriyanova, E., Paranhos Filho, A.C.; Sigolo, J.B. & Bertolo, R.A. 2011.** Biogeochemical processes and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83: 391-407.
- Almeida, T.I.R., Sígolo, J.B., Fernandes, E., Queiroz Neto, J.P., Barbiero, L. & Sakamoto, A.Y. 2003.** Proposta de classificação e gênese das lagoas da Baixa Nhecolândia, MS com base em sensoriamento remoto e dados de campo. *Revista Brasileira de Geociências* 33 (2-Suplemento): 83-90.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. 1985.** Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1 – Introduction. *Arch. Hydrobiol./Algological Studies* 38-39: 291-302.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. 1988.** Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 3 – Oscillatoriales. *Algological Studies* 50-53: 327-472.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. 1990.** Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5 – Stigonematales. *Arch. Hydrobiol./Algological Studies* 59: 1-73.
- Ballot, A., Dadheech, P.K., Haande, S. & Krienitz, L. 2008.** Morphological and Phylogenetic Analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Tropical Inland Water Bodies. *Microbial Ecology* 55(4): 608-618.
- Ballot, A., Dadheech, P.K. & Krienitz, L. 2004b.** Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies. *Arch Hydrobiol Suppl/Algological Studies* 113: 37-56.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S. Codd, G.A. & Pflugmacher, S. 2004a.** Cyanobacteria and Cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya – Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research* 26: 925-935.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2005.** Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4: 139-150.
- Barbiéro, L., Queiroz-Neto, J.P., Ciornei, G., Sakamoto, A.Y., Capellari, B., Fernandes, E. & Valles, V. 2002.** Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia,

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. *Wetland* 22: 528-540.
- Bazzichelli, G., Abdelahad, N. 1994.** Caractérisation morphométrique et statistique de deux populations d'*Aphanizomenon* du groupe *Aphanizomenon ovalisporum* Forti des lacs de Nemi et Albano (Italie). *Algological Studies* 73: 1-21.
- Bertolin, T.B.P., Costa, J.A.V., Bertolin, T.E., Colla, L.M & Hemkemeier, M. 2005.** Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 29(1):118-125.
- Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Converti, A., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2008.** Influence of Ammonium Chloride Feedin Time and Light Intensity on the Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 100(2): 297-305.
- Bhattacharya D, Yoon HS, Hackett JD. 2004.** Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *BioEssays* 26: 50–60.
- Bicudo, C.E.M. & Bicudo, D.C. 2008.** Mudanças climáticas globais: Efeitos sobre as águas continentais superficiais. *In: Buckeridge, M.S. (org.) Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil*. Ed. Rima, São Carlos. p.151-165.
- Blankenship, R. E. 1992.** Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* 33: 91-111.
- Boone, D.R. & Castenholz, R.W. 2001** (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.), Volume 1, Springer-Verlag, New York, 721p.
- Bouvy, M., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M. & Moura, A. 2000.** Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 23:13-27.
- Brasier, M. D., Green, O. R., Jephcoat, A. P., Kleppe, A. K., Van Kranendonk, M. J., Lindsay, J. F., Steele, A., & Grassineau, N. V. 2002.** Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* 416: 76-81.
- Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R., & Summons, R. E. 1999.** Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285: 1033-1036.
- Brum, P.A.R. & Sousa, J.C. 1985.** Níveis de nutrientes para gado, em lagoas (“baías” e “salinas”) no Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 20(12): 1451-1454.
- Calheiros, D.F. & Oliveira, M.D. 1999.** Pesquisa limnológica no Pantanal: uma revisão. *In Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. EMBRAPA Pantanal, Corumbá. p.115-125.
- Carmichael, W.W. 1997.** The Cyanotoxins. *In: Advances in Botanical Research*, Vol. 27. Edited by J. Callow. London. Academic Press.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R. & Eaglesham, G.K. 2001.** Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109: 663-668.
- Carvalho, J.C.M., Francisco, F.R., Almeida, K.A., Sato, S. & Converti, A. 2004.** Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rates. *Journal of Phycology* 40: 589-597.
- Catling, D.C., Zahnle, K.J., and McKay, C.P. 2001.** Biogenic methane, hydrogen escape, and the irreversible oxidation of early Earth. *Science* 293: 839–843.
- Chan, C. X. & Bhattacharya, D. 2010.** The Origin of Plastids. *Nature Education* 3(9):84.
- Chen M & Blankenship RE. 2011.** Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends in Plant Sciences* 16: 427-431.
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z. -L., Neilan, B. A. & Scheer, H. 2010.** "A Red-Shifted Chlorophyll". *Science* 329 (5997): 1318–1319.
- Chorus, I. & Bartram, J. 1999.** Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London and New York.
- Cobelas, M. Á. & Gallardo, T. 1989.** Uma revisão sobre la biotecnologia de las algas. Edi. Universidad Complutense. *Botánica complutensis* 15: 9-60.
- Colla, L.M., Furlong, E.B. & Costa, J.A.V. 2007b.** Antioxidant Properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50(1): 161-167.
- Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C. & Costa, J.A.V. 2007a.** Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology* 98(7): 1489-1493.
- Couradeau E, Benzerara K, Moreira D, Gérard E, Kaźmierczak J, Tavera R, López-García P. 2011.** Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One*, 6(12): e28767.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murc, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A. & Bergman, B. 2005.** Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 102: 5074-5078.
- Cunha, J. 1943.** Cobre do Jaurú e lagoas alcalinas do Pantanal, Mato Grosso. Ministério da Agricultura, Boletim 6.
- Desikachary, T.V. & Jeeji-Bai, N. 1996.** Taxonomic studies in *Spirulina* II. The identification of *Arthrospira* ("Spirulina") strains and natural samples of different geographical origins. *Algological Studies* 83: 163-178.
- Egborge, A.B.M. 1994.** Salinity and the distribution of rotifers in the Lagos Harbour – Badagry Creek system, Nigeria. *Hydrobiologia* 272: 95-104.
- Embrapa - Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. 1997.** Plano de utilização da fazenda Nhumirim. B.M.A. Soriano, D.H. Oliveira, J.B. Catto, J.A. Comastri Filho, S. Galdino & S.M. Salis (orgs.). EMBRAPA Pantanal, Documentos 21: 1-72.
- Emery, W. J. & R. E. Thomson. 1998.** Data Analysis Methods in Physical Oceanography. Pergamon, New York.
- Esteves, F.A. 1998.** Fundamentos de Limnologia. 2 ed. Interciência, Rio de Janeiro. 602 p.
- Falch B, König G, Wright A, Sticher O, Angerhofer C, Pezzuto J, Bachmann H. 1995.** Biological activities in cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica* 61: 321–328.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Fernandes, E. 2007.** Organização espacial dos componentes da baixa Nhecolândia – Pantanal do Mato Grosso do Sul. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, USP, São Paulo.
- Fernandes, F., Lucati, H.M., Capellari, B. & Queiroz Neto, J.P. 1999.** Modelo Digital para Tratamento de Cartas Topográficas do Pantanal da Nhecolândia. In: Anais Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, 2, 1996, Corumbá, MS. Manejo e Conservação. Embrapa Pantanal, Corumbá.
- Fuhrman J. 2003.** Genome sequences from the sea. *Nature* 424: 1001–1002.
- Gautiner, Q., Bezerara, K., Moreira, D., Kazmierczak, J., Guyot, F., Kempe, S., & López-Garcia, P. 2007.** Molecular diversity of cyanobacteria and other members of the microbial community associated to microbialites from satonda crater lake, indonesia. abstracts of the 17th symposium of the international association for cyanophyte research. Mérida, México 55: 25-29.
- Gerwick, W. H., Jiang, Z. D., Agarwal, S. K. & Farmer, B. T. 1992.** Total structure of hormothamnin A, a toxic cyclic undecapeptide from the tropical marine cyanobacterium *Hormothamnion enteromorphoides*. *Tetrahedron* 48: 2313–24.
- Guglielmi, G., Rippka, R. & Tandeau de Marsac, N. 1993.** Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp. and *Arthrospira* spp. Among cyanobacteria. *Bulletin de l'Institut océanographique de Monaco* 12: 13-23.
- Hart, B.T., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McMahon, A., Meredith, C. & Swadling, K. 1991.** A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hidrobiologia* 210: 105-144.
- Hedges, S. B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D. Y., Thompson, A. S., & Watanabe, H. 2001.** A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* 1: 4.
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kastovsky, J. 2005.** System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Algological Studies* 117: 95-115.
- Hongsthong & Bunnag 2009.** Overview of *Spirulina*: Biotechnological, Biochemical and Molecular Biological Aspects. In: *Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications*. Eds. P.M. Gault & H.J. Marler. Nova Science Publishers Inc. pp. 51-103.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007.** Climate Change 2007: The Physical Science Basis – Summary for Policymakers. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/SPM2feb07.pdf>.2007.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau, M.N. & Herdman, M. 2002.** rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members to the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology* 148: 481-496.
- Jansson, C.& Northen, T. 2010.** Calcifying cyanobacteria - the potential of biomineralization for carbon capture and storage, *Current Opinion in Biotechnology* 21: 365-371.
- Jeeji-Bai N., Hegewald E., Soeder C.J. 1977.** Revision and taxonomic analysis of the genus *Anabaenopsis*. *Arch Hydrobiol Suppl/Algological Studies* 18: 3–24.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Jeeji-Bai N., Hegewald E., Soeder C.J. 1980.** Taxonomic studies on the genus *Anabaenopsis* (Wolosz.) Miller. In: Desikachary TV, Rajarao VN (Eds) Taxonomy of Algae. Univ. Madras 115–145.
- Junk, W.J. & Cunha, C.N. 2005.** Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. *Ecological Engineering* 24: 391-401.
- Junk, W.J., Brown, M., Campbell, I.C., Finlayson, M., Gopal, B., Ramberg, L. & Warner, B.G. 2006.** The comparative biodiversity of seven globally important wetlands: a synthesis. *Aquatic Sciences* 68: 400-414.
- Kasting, J. F. 2001.** The Rise of Atmospheric Oxygen. *Science* 293: 819-820.
- Komárek, J. 2006.** Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae* 21(4): 349-375.
- Komárek J. 2005.** Phenotypic diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*. *Czech Phycology Olomouc* 5:1–35.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1986.** Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 – Chroococcales. *Arch. Hydrobiol./Algological Studies* 43: 157-226.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1989.** Modern approach to the classification system of cyanophytes. *Nostocales* 4. *Algological Studies* 56: 247-345.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1999.** Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gärtner, H. Heying & D. Möllenhauer (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 1-548.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005.** Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, pp. 1-759.
- Komárek, J., Azevedo, S.M.F.O., Domingos, P., Komárková, J. & Tichy, M. 2001.** Background of the Caruaru tragedy; a case taxonomic study of toxic cyanobacteria. *Algological Studies* 103: 9-29
- Komárek J. & Kaštovský, J. 2003.** Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Archiv fur Hydrobiologie / Algological Studies* 109: 305-326.
- Komárek, J. & Komárková-Legnerová, J. 2007.** Taxonomic evaluation of the cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 1. phenotypic diversity of coccoid morphotypes. *Nova Hedwigia* 84: 65-111.
- Kosten S., Huszar V. L. M., Bécares E., Costa L. S., Van Donk E., Hansson L.-A., Jeppesen E., Kruk C., Lacerot G., Mazzeo N., De Meester L., Moss B., Lüring M., Nöges T., Romo S., Scheffer M. 2012.** Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology* 18: 118–126.
- Kováčik, L. & Holeckova, H. 1984.** Biometric evaluation of populations of *Aphanizomenon flos-aquae* from Trebon pond basin (Czechoslovakia). *Archiv fur Hydrobiologie / Algological Studies*. 67: 283-298.
- Lagos, N. 2003.** Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: Occurrence in South America. *Comments on Toxicology* 9: 1-19.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Lagos, N., Onodera, H., Zagato, P.A. Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.O. & Oshima, Y. 1999.** The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.
- Lanaras, T. & Cook, C.M. 1994.** Toxin extraction from an *Anabaenopsis milleri* - dominated bloom. *Science of the Total Environment*, 142(3):163-9.
- Lee, R.E. 1999.** Phycology. University Press, Cambridge, 3a ed. p. 624
- Li, R.H., Carmichael, W.W. & Pereira, P. 2003.** Morphological and 16S rRNA gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* LMECYA 31 and *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology* 39: 814-818.
- Litvaitis, M. K. 2002.** A molecular test of cyanobacterial phylogeny: Inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* 468: 135-145.
- Magrin, A.G.E., Senna, P.A.C. & Komárek, J. 1997.** *Arthrospira skujae*, a new planktic tropical cyanoprokaryote. *Archiv für Protistenkunde* 148(4): 479-489.
- Malone, C.F.S, Santos, K.R.S, Neto, M.J. & Sakamoto, A.Y. 2007.** Gêneros de algas no plâncton de lagoas salinas situadas na fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, MS. *Revista Brasileira de Biociências* 5 (2): 588-590.
- Margulis, L. 1970.** Origin of Eukaryotic Cells. New Haven, CT: Yale University Press.
- Medina-Júnior, P.B. & Rietzler, A. C. 2005.** Limnological study of a Pantanal saline lake. *Brazilian Journal of Biology* 65(4): 651-659.
- Metcalf, J.S., BAnack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A. & Codd, G. 2008.** Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environmental Microbiology* 10(3): 702-708.
- Mianping, Z., 2001.** On salinology. *Hydrobiologia* 466: 339–347.
- Molica, R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meduro, H., Oshima, Y., Azevedo, S. & Lagos, N. 2002.** Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41(6): 606-611.
- Moore, R.E., Cheuk, C., Yang, X.G. and Patterson, G.M.L. 1987.** Hapalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte *Hapalosiphon fontinalis*. *The Journal of Organic Chemistry* 52: 1036 - 1043.
- Morais, M.G., Reichert, C.C., Dalcanton, F., Durante, A.J., Marins, L.F.F. & Costa, J.A.V. 2008.** Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 63: 144-150.
- Mourão, G.M. 1989.** Limnologia comparativa de três lagoas (duas “Baías” e uma “Salina”) do Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
- Mourão, G.M., Ishii I.H. & Campos, Z.M.S. 1988.** Alguns fatores limnológicos relacionados com a ictiofauna de baías e salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Acta Limnológica Brasiliensia* 2: 181-198.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Moustaka-Gouni, M. 2007.** The coincidence of an *Arthrospira* – *Anabaenopsis* bloom and the mass mortality of birds in Lake Koronia. The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. n° 35, p.6-7. Disponível em <http://ioc.unesco.org/hab/news.htm>
- Nagarajan, M., Maruthanayagam, V. & Sundararaman, M. 2011.** A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *Journal of Applied Toxicology* 32: 153–185.
- Nogueira, I.S., Nabout, J.C., Oliveira, J.E. & Silva, K.D. 2008.** Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. *Hoehnea* 35(2): 219-233.
- Oren, A. 2004.** A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1895-1902.
- Padisák, J. 1997.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographic studies* 107: 563-93
- Paerl, H.W., Huisman, J. 2008.** Blooms like it hot. *Science* 320: 57–58.
- Peixoto, J. A. & Huszar, V. L. M., 1983.** Algumas espécies de algas da Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro. Nova sér., *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Botânica - UFRJ*, 67: 1-8.
- Persson, P.E. 1996.** Cyanobacteria and off-flavours. *Phycologia*, Suppl. 6: 168-171.
- Pinzon-Gamez, N.M., Sundaram, S. and Ju, L.K. 2005.** Heterocyst differentiation and H₂ production in N₂-fixing cyanobacteria. In *AICHE Annual Meeting, Conference Proceedings*. Cincinnati, OH. pp. 8949–8951.
- Por, F.D. 1995.** The Pantanal of Mato Grosso (Brazil). *World's Largest Wetlands. Biological Monographs* 73: 122 p.
- Pott, V.J.; Pott, A. 2000.** Plantas aquáticas do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA. 353p.
- Pushparaj, B., Pelosi, E. & Juttner, F. 1999.** Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology* 10: 527–530.
- Quintana, N., Kooy, F., Rhee, M.D., Voshol, G.P. & Verpoorte, R. 2011.** Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91:471–490.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. & Sivonen, K. 2005.** Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 11-26.
- Rebolças, A.C., Braga, B., Tundisi, J.G. (org.) 2006.** Águas Doces no Brasil: Capital Ecológico, Uso e Conservação, 3ª ed., Editora Escrituras, São Paulo.
- Remane, A & Schlieper, C. 1971.** *Biology of Brackish water*. John Wiley & Sons. New York. 372pp.
- Riding, R. 2012.** A Hard Life for Cyanobacteria. *Science* 336: 427-428.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Rippka, Rosmarie, Josette Deruelles, John B. Waterbury, Michael Herdman & Roger Y. Stanier. 1979.** Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111:1-61
- Sakamoto, A.Y., Queiroz-Neto, J.P., Fernandes, E., Lucati, H.M. & Capellari, B. 1999.** Topografia de lagoas salinas e seus entornos no Pantanal da Nhecolândia. In: Anais do II simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Manejo e conservação. Corumbá, Embrapa Pantanal 2: 127-135.
- Sánchez-Luna, L.D., Bezerra, R.P, Matsudo, M.C, Sato, S., Converti, A. & Carvalho, J.C.M. 2007.** Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: A kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (4): 702-711.
- Sánchez-Luna, L.D., Converti, A., Tonini, G.C., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2004.** Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. *Aquacultural Engineering*. 31: 237-245.
- Sant'anna, C. L, Branco, L. H. Z., Gama Júnior, W. A. & Werner, V. R. 2011.** Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. *Biota Neotropica* [online]., vol.11.
- 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. 2007.** Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30(1): 1-17.
- Santangelo, JM. 2005.** Influência da salinidade sobre a comunidade zooplancônica de uma lagoa costeira. Rio de Janeiro: PPGE/UFRJ. 85 p.
- Santos, K.R.S. & Sant'Anna, C.L. 2010.** Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 61-83.
- Santos, K.R.S. 2005.** Gêneros de algas de seis lagoas (quatro salinas, uma salitrada e uma baía) do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Monografia de Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas.
- Santos, K.R.S. 2008.** Biodiversidade de algas e cianobactérias de três lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Santos, K.R.S., Sakamoto, A.Y., Neto, M.J., Barbiero, L. & Queiroz Neto, J.P. 2004.** Ficoflora do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: um levantamento preliminar em três lagoas salinas e uma salitrada. In: Anais do IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. EMBRAPA Pantanal, Corumbá.
- Santos, K.R.S.; Jacinavicius, F.R. & Sant'anna, C.L. 2011.** Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal. *Fottea* 11: 119-126
- Schopf, J. W. 1993.** *Science* 260: 640-646.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Silva, J.S.V. & Abdon, M.M. 1998.** Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. Pesquisa Agropecuária Brasileira 33 (número especial): 1703-1711.
- Silva-Stenico M.E, Silva, C.S.P., Lorenzi, A.S., Shishido, T.K., Etchegaray, A., Lira, S.P., Moraes, L.A.B. & Fiore, M.F. 2011.** Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. Microbiological Research 166: 161-175.
- Soriano, B.M.A. 1999.** Caracterização climática da sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS. In Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. EMBRAPA Pantanal, Corumbá, p.151-158.
- Staley, J.T. & Holt, J.G. (eds.) 1989.** Bergey's of Manual of Bacteriology. Volume 3: Archaeobacteria, Cyanobacteria, and the remaining gram-negatives. Baltimore, Williams & Wikins, C.
- Stanier, R. Y., and Van Niel, C. B. 1962.** The concept of a bacterium. Arch. Mikrobiol. 42: 17-35
- Stanier, R.Y., Sistrom, W.R., Hansen, T.A., Whitton, B.A., Castenholz, R.W., Pfennig, N., Gorlenko, V.N., Kondratieva, E.N., Eimhjellen, K.E., Whittenbury, R., Gherna, R.L. & Trüper, H.G. 1978.** Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. International journal of systematic bacteriology 28: 335-336.
- Swarts, F.A. 2000.** The Pantanal in the 21st Century: for the Planet's largest wetland, an uncertain future. Pp. 1-24. In: F.A. Swarts (ed.). The Pantanal: understanding and preserving the world's largest wetland. Second edition. Paragon House Publishers. St. Paul, MN, United States. 301p.
- Taylor, W.R. 1932.** Notes on the genus *Anabaenopsis*. American Journal of Botany 19: 454-462.
- Tudorancea, C. & Harrinson, A.D. 1988.** The benthic communities of the saline lakes Abijata and Shala (Ethiopia). Hydrobiologia 197: 91-97.
- Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T. & Galli, C.S. 2006.** Eutrofização na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias para gerenciamento e controle - EUTROSUL - Rede Sul Americana de Eutrofização. 1. ed. São Carlos - SP: DMD Propaganda (1): 532 p.
- Tundisi, J.G. & Matsumura-Tundisi, T. 2008.** Limnologia. Oficina de Texto. São Paulo. 632 p.
- Werner, V.R., Cabezudo, M.M., Neuhaus, E.B., Azevedo, M.T.P., Galina, L., Sant'Anna, C.L. 2013.** Cyanophyceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB107919>)
- Wetzel, R.G. 1993.** Limnologia. Fundação Calouste Goulbekian. Lisboa. 1016 p.
- Wetzel, R.G. 2001a.** Limnology of Lake and River Ecosystems. Third Edition. Academic Press, San Diego, CA. 1006 p.
- Wetzel, R.G. 2001b.** Limnology. Philadelphia, W.B. Sandres, 3° ed. 743 p.
- Whitton, B. A. & Potts, M. 2000.** The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space [Eds.], Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 669 pp.

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral e Área de Estudo

- Williams, W.D. 1998.** 'Biodiversity in salt lakes'. In McComb, A.J. and Davis, J.A. (Eds), *Wetlands for the Future*, Gleneagles Publishing, Adelaide, 161–166.
- Williams, E. 1999.** Global circuit response to temperature on distinct time scales: a status report, in *Atmos. Ionos. Electromag. Phenomena associated with Earthquakes*, Ed. M. Hayakawa, TERRAPUB, Tokyo, pp. 939-949.
- Williams, W.D., Boulton, A.J., and Taaffe, R.G., 1990.** Salinity as a determinant of salt lake fauna: A question of scale. *Hydrobiologia* 197: 257-266.
- Willmotte, A. y Herdman, M. 2001.** Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: Boone, D., Castenholz, R., Garrity, G (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, pp 487-514. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Zapomělová, E., HroUZeK, P., ŘeháKová, K., ŠabacKá, M., StíBal, M., Caisová, I., Komárková, J. & Lukešová, A. 2008.** Morphological variability in selected heterocytous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. – *Folia Microbiologica* 53: 333–341.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*



CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e problemas nomenclaturais em *Arthrospira*

Arthrospira platensis (Nordstedt) Gomont, *Arthrospira fusiformis* (Voronichin) Komárek et Lund e *Arthrospira maxima* Setchell et Gardner são as únicas cianobactérias cultivadas em escala industrial para produção de biomassa rica em proteínas (65-70% da massa seca) (Sili *et al.* 2012). Comercialmente conhecidas como “*Spirulina*”, representam um dos microorganismos fotossintetizantes mais estudados no mundo devido a essa importância comercial (Hongsthong & Bunnag 2009).

Arthrospira (“*Spirulina*”) tem uma longa história de consumo por humanos na região do Lago Chade na África e Lago Texcoco no México (Cifferi 1983). No México, por volta dos anos 1300, os Astecas colhiam massas flutuantes de *Arthrospira* no Lago Texcoco e a utilizavam para fazer um tipo de bolo seco chamado “Tecuitlatl”, o qual era comercializado em mercados na vizinhança do Lago Texcoco, atualmente região metropolitana da Cidade do México. Muito provavelmente, o uso de *Arthrospira* como alimento no Chade data do mesmo período, ou até antes, onde era consumida pelos nativos Kanembou com o nome de “Dihé ou Dié” e também comercializada nas vizinhanças do Lago Chade. Interessante notar que as propriedades alimentares das duas populações de *Arthrospira* foram descobertas quase que simultaneamente, apesar da distância geográfica entre essas comunidades (Farrar 1966, Cifferi 1983).

O primeiro registro sobre o uso de *Arthrospira* na África foi relatado por Jenkin (1929). Em uma carta ao editor da Nature, ele notificou a presença de *Arthrospira* (“*Spirulina*”) spp. nos lagos alcalinos Crater, Elmenteita e Nakuru, do Vale Rift, no Quênia, e também a abundância destas cianobactérias no interior do estômago de flamingos (*Phoeniconaias minor*), aves que habitam as margens destes lagos alcalinos africanos. Este relato indicou a dependência alimentar dos flamingos com as florações de *Arthrospira* nos lagos do Vale Rift e a coloração rosa dessas aves é devido aos pigmentos carotenoides originários das cianobactérias (Vonshak & Tomaselli 2000). Além de espécies de *Arthrospira*, também são comuns nos lagos alcalinos africanos *Anabaenopsis* spp. (*A. arnoldhii*, *A. abijatae* e *A. elenkinii*) e *Spirulina* spp. (*S. laxissima*, *S. major* e *S. subsalsa*) (Cifferi 1983).

A partir deste registro histórico de Jenkin (1929), diversos autores documentaram espécies de *Arthrospira* em outros lagos (“soda lakes”) da África, como o lago Chade,

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Aranguadi, Victoria, Bogoria, Abjatta, entre outros (Dangeard 1940, Melack 1979, Krienitz *et al.* 2003, Ballot *et al.* 2004, entre outros).

Dangeard (1940) através de uma comunicação à Sociedade Linnean de Bordeaux informou detalhes sobre a amostra chamada de “Dihé”, que foi recebida do Senhor Créach (farmacêutico da tropa colonial francesa fixada na República do Chade) e obtida no mercado de Massakory, um pequeno vilarejo próximo ao Lago Chade. O Dihé era comido pelas populações nativas e obtido a partir de massas de algas microscópicas, flutuantes na superfície de pequenos lagos ou poças ao redor do Lago Chade, onde eram coletadas e secas ao sol nas margens arenosas desses empoçados. Ao estudar a amostra de Dihé, Dangeard concluiu que era constituída puramente de filamentos espiralados de *Arthrospira* (= *Spirulina*) *platensis*, a mesma espécie identificada por Rich (1931) e comentada por Jenkin (1929) como o principal constituinte do fitoplâncton e fonte de alimento para populações de flamingos de numerosos lagos no Vale Rift (Ciferri 1983). No entanto, o material identificado por Rich como *Arthrospira platensis* (Nordsted) Gomont sensu Rich (1931) foi sinonimizado com *Arthrospira fusiformis* (Voronich.) Komárek & Lund (Komárek & Lund 1990). De fato, sabe-se atualmente que as populações de *Arthrospira* dos lagos do Vale Rift são representadas principalmente pela espécie *A. fusiformis* (**Tabela 5**). Devido o trabalho de Rich (1931) ter sido amplamente utilizado, muitos autores continuaram utilizando o nome *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* para descrever as populações dos lagos alcalinos da África, o que causa grande confusão na literatura científica ao avaliar a verdadeira distribuição geográfica mundial de *Arthrospira platensis*.

Taxonomicamente, *Arthrospira* Sitzenberger ex Gomont e *Spirulina* Turpin são gêneros bastante distintos. Apesar de *Spirulina* também possuir tricomas espiralados, difere por não apresentar aerótopos e não possuir septos visíveis ao microscópio óptico, enquanto *Arthrospira* pode apresentar aerótopos e possui tricomas com septos visíveis (Gomont 1892, Anagnostidis & Komárek 1988). Além destas diferenças morfológicas, há também diferenças na filogenia dos genes RNAr 16S, *cpcB-cpcA* (locus da ficocinina) e ITS (16S-23S), onde cada gênero apresenta-se em um clado monofilético distinto (Nelissen *et al.* 1994, Manen & Falquet 2002, Ballot *et al.* 2004, Hoffmann *et al.* 2005). Assim, de acordo com o sistema de classificação polifásica das cianobactérias, o gênero *Spirulina* está mais relacionado à ordem Chroococcales, enquanto *Arthrospira* manteve-se classificado na ordem Oscillatoriales (Hoffmann *et al.* 2005). Portanto, os nomes “*Spirulina platensis*”, “*Spirulina fusiformis*” e

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

“*Spirulina maxima*” são incorretos do ponto de vista taxonômico e nomenclatural (Komárek & Anagnostidis 2005).

Apesar das diferenças entre os gêneros *Arthrospira* e *Spirulina* serem bem estabelecidas e aceitas pela comunidade científica, tanto em termos moleculares como na taxonomia clássica, esses “nomes incorretos” citados anteriormente ainda são muito utilizados, principalmente devido às revisões de Geitler (1925, 1932). Este autor invalidou o gênero *Arthrospira* ao incluir todas as espécies com tricomas regularmente espiralados sem bainha firme no gênero *Spirulina* previamente estabelecido por Turpin em 1834, desconsiderando a separação entre os dois gêneros aceita por Gomont (1892), que é a referência nomenclatural válida (“starting point”) para as cianobactérias filamentosas não heterocitadas. Como os trabalhos de Geitler (1925, 1932) foram historicamente muito utilizados, os registros na maioria dos estudos (limnológicos, fisiológicos e biotecnológicos) acabaram perpetuando esse erro nomenclatural: *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler (1925) e *Spirulina maxima* (Setchell & N.L.Gardner) Geitler (1932).

Falquet & Hurni (2007) realizaram levantamento da bibliografia científica de *Arthrospira platensis* (“*Spirulina platensis*”) em comemoração aos 40 anos (1966-2006) da redescoberta deste importante microorganismo, e listaram 937 artigos relacionados sobre o tema. Na tentativa de atualizar essa informação foi feita uma busca na base de dados “Springer Link” (<http://link.springer.com/>) em 24/11/2012 com o nome “*Arthrospira platensis*”, e foram encontrados 292 artigos relacionados, enquanto a busca por “*Spirulina platensis*” encontrou 1.286 resultados. O que indica a contínua expansão dos estudos com esta cianobactéria e, infelizmente, a tendência de ainda utilizar o nome incorreto “*Spirulina platensis*” em muitos estudos, dificultando a correta comparação de resultados entre as mesmas espécies.

Uma importante revisão da taxonomia e nomenclatura de “*Spirulina platensis*”, “*S. maxima*” e “*S. fusiformis*” foi apresentada por Komarek & Lund (1990). Estes autores incluíram os táxons “*S. maxima*” e “*S. fusiformis*” dentro das formas planctônicas (isto é, com aerótopos) e sugeriram que estes dois táxons podem representar duas espécies bem delimitadas: *Arthrospira fusiformis* (Voronichin) Komárek et Lund e *A. maxima* Setchell et Gardner, que têm diferentes distribuições geográficas: *A. maxima* foi considerada pantropical, enquanto *A. fusiformis* é limitada à África e Ásia Tropical e Central. Além disso, Komárek & Lund (1990) consideram pela primeira vez *A. platensis* (Nordstedt) Gomont como sendo limitada à América do Sul e, de acordo com as observações feitas no material tipo (“*Spirulina*

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

jenneri f. *platensis* Nordstedt”) depositado em exsicata no herbário do Museu Britânico de História Natural, consideraram que esta espécie seria de hábito perifítico e bentônico sem aerótopos.

Diversos autores questionam as afirmações feitas por Komárek & Lund (1990) que *A. platensis* seria bentônica e sem aerótopos considerando apenas a observação de material de herbário, argumentando que a perda de aerótopos é comum em exsicatas (Tomazellii 1997, Jeej-Bai 1999), e tanto a ilustração típica – iconotipo (Gomont 1892, pl. 7, fig. 27) – como o material em exsicata podem não representar toda a variabilidade morfológica desta espécie, que foi originalmente coletada e descrita para as proximidades de Montevidéu, Uruguai (Gomont 1892).

A **Tabela 1** fornece um resumo dos sinônimos de diferentes espécies de *Arthrospira* reconhecidas por Komárek & Lund (1990) e Komarek & Anagnostidis (2005). No entanto, vale ressaltar que essa classificação foi baseada em aspectos fenotípicos, necessitando de suporte de análise molecular.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela1. Sinônimos das espécies mais comuns de *Arthrospira* de acordo com Komárek & Lund (1990) e Komárek & Anagnostids (2005), adaptado de Sili *et al.* (2012).

Nome válido	Sinônimos na literatura
Espécies de corpos de água salina alcalina, planctônicas com aerótopos (formam floração)	
<i>A. fusiformis</i> (Voronichin) Komárek et Lund 1990	<i>Spirulina fusiformis</i> Voronichin 1934; <i>Arthrospira platensis</i> (Nordstedt) Gomont sensu Rich (1931, 1932), Thomasson (1960), Léonard & Compère (1967); <i>Arthrospira platensis</i> (Nordstedt) Gomont f. <i>minor</i> Rich (1931); <i>Spirulina geitleri</i> f. <i>minor</i> (Rich) Fott et Karim (1973); <i>Spirulina platensis</i> (Gomont) Geitler sensu Thomasson (1960), Jeeji Bai & Seshadri (1980); <i>Oscillatoria platensis</i> (Nordstedt) Bourrelly (1970); <i>Oscillatoria platensis</i> (Nordstedt) Bourrelly var. <i>minor</i> Rich in Iltis (1970); <i>Oscillatoria</i> sp. sensu Iltis (1970); <i>Spirulina maxima</i> (Setchell et Gardner) Geitler sensu Fott & Karim (1973)
<i>A. maxima</i> Setchell et Gardner in Gardner 1917	<i>Spirulina maxima</i> (Setchell et Gardner) Geitler (1932); <i>Spirulina geitleri</i> De Toni (1935) e sensu Fott & Karim (1973); <i>Spirulina platensis</i> (Gomont) Geitler sensu Welsh (1965); <i>Oscillatoria pseudoplatensis</i> Bourrelly (1970); non <i>Spirulina maxima</i> Bernard (1909).
Espécies de corpos de água doce, perifíticas, bentônicas sem aerótopos (formam massas)	
<i>A. jenneri</i> Stizenberger ex Gomont 1892 (espécie tipo)	<i>Spirulina jenneri</i> (Stizenberger) Geitler (1935); <i>Oscillatoria jenneri</i> (Gomont) Compère (1974).
<i>A. platensis</i> (Nordstedt) Gomont 1892*	<i>Spirulina jenneri</i> var. <i>platensis</i> Nordstedt in Wittrock and Nordstedt (1884); <i>Spirulina platensis</i> (Nordstedt) Geitler (1925); <i>Oscillatoria platensis</i> (Nordstedt) Bourrelly (1970); <i>Arthrospira platensis</i> var. <i>tenuis</i> (Rao) Desikachary (1959).

**A. platensis* sensu Tseng & Chang (1990), Tomaselli (1997), Viti *et al.* (1997), Jeej-Bai (1999), Kim *et al.* (2007), Santos & Sant'Anna (2010), entre outros é planctônica e apresenta aerótopos.

Na **Tabela 2** é apresentada a distribuição geográfica mundial das espécies de *Arthrospira* mais comumente citadas em literatura. Conforme observado nesta tabela, boa parte dos táxons identificados como *Arthrospira platensis* citados para África, na realidade é sinônimo de *Arthrospira fusiformis* (conforme observado na **Tabela 1**), o que torna um tanto quanto confusa a compreensão da verdadeira distribuição geográfica desta espécie e realça a

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

necessidade de enfrentar o problema de definição de espécie em *Arthrospira* usando abordagem polifásica.

Tabela 2. Distribuição geográfica das espécies mais comuns de *Arthrospira* (adaptado e ampliado de Sili *et al.* 2012).

País	Localização	Táxon	Referência
ÁFRICA			
Chade	Lagos natron (Bodou, Mombolo, Rombou, Yoan) e lagoas (Latir, Iseirom, Latir, Liva) na região do Kanem	<i>A. platensis</i> , <i>A. platensis</i> f. <i>minor</i> (= <i>A. fusiformis</i>)? <i>A. fusiformis</i>	Léonard & Compère (1967), Iltis (1968, 1969, 1970, 1971, 1972); Rich (1931)
	Lago Kailala, Lago Kossorom	<i>A. fusiformis</i>	Sili <i>et al.</i> (1999)
Quênia	Lagos natron (Bogoria, Crater, Elmenteita, Nakuru)	<i>A. platensis</i> (= <i>A. fusiformis</i>)?	Rich (1931), Vareschi (1982)
	Vale Rift (Bogoria, Nakuru, Elmenteita)	<i>A. fusiformis</i>	Ballot <i>et al.</i> (2004)
	Lago Bogoria	<i>A. platensis</i> , <i>A. platensis</i> f. <i>minor</i>	Tuite (1981)
	Lago Bogoria	<i>A. fusiformis</i>	Hindák (1985)
	Lago Simbi	<i>A. platensis</i>	Melack (1979)
	Lago Simbi	<i>A. platensis</i> = <i>A. fusiformis</i>	Kebede & Ahlgren (1996)
	Lago Simbbi	<i>A. fusiformis</i>	Ballot <i>et al.</i> (2005)
	Lago Sonhachi	<i>A. fusiformis</i>	Ballot <i>et al.</i> (2005)
Etiópia	Lago Aranguadi	<i>A. platensis</i> (= <i>A. fusiformis</i>)?	Melack (1979)
	Lago Chiltu, Lago Green (lago verde)	<i>A. platensis</i> = <i>A. fusiformis</i>	Kebede & Ahlgren (1996)
Egito	Lago Maryut	<i>A. platensis</i> (= <i>A. fusiformis</i>)?	El-Bestawy <i>et al.</i> (1996)
Algéria	Lago Tamanrasset	<i>A. platensis</i> (= <i>A. fusiformis</i>)	Fox (1996)
Congo	Lago Mougounga	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
	Lago Kivu	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
Zâmbia	Lago Bangweolou	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
Tunísia	Lago Korba	<i>Arthrospira</i> sp.	Fathi <i>et al.</i> (2001)
Moçambique	Lagoas de águas residuais	<i>A. fusiformis</i>	Mussagy <i>et al.</i> (2006)
África do Sul	Lago Tswaing	<i>A. fusiformis</i>	Oberholster <i>et al.</i> (2009)
ÁSIA			
Índia	Lagoas	<i>A. maxima</i>	Desikachary & Jeeji-Bai (1996)
	Lago Lonar, lagoas e tanques (Madurai, isolado MCRC)	<i>A. indica</i>	Desikachary & Jeeji-Bai (1996)
Birmânia (Myanmar)	Lago Crater	<i>Arthrospira</i> sp.	Min Thein (1993)
Paquistão	Lago de pesca, Lahore	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
Sri Lanka	Lago Beria	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
China	Lagos de pesca, Nanking	<i>A. platensis</i>	Tsen & Chang (1990)
	Lago Bayannur	<i>A. platensis</i>	Zheng <i>et al.</i> (1992)
Tailândia	Lagos de efluentes da fábrica Tapioca, Bangkok	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
Rússia	Lago Tunatan, estepes da	<i>A. fusiformis</i>	Voronichin (1934)

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

País	Localização	Táxon	Referência
	Sibéria		
Azerbaijão	Bacia hidrográfica, Khumbasha	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
AMÉRICA			
México	Lago Texcoco	<i>A. maxima</i>	Busson (1971)
Brasil	Lagoa Mangueira (RS)	<i>Arthrospira</i> sp. (LEB 18)	Morais <i>et al.</i> (2008)
	Lagoa Salina do Meio e Salitrada Campo Dora (Pantanal, MS)	<i>A. platensis</i>	Santos & Sant'Anna (2010)
	Minas Gerais, Goiás, São Paulo	<i>A. jenneri</i>	Magrin <i>et al.</i> (1997), Nogueira <i>et al.</i> (2008), Sant'Anna <i>et al.</i> (2011), Werner <i>et al.</i> (2013)
	Rondônia	<i>A. skujae</i>	Magrin <i>et al.</i> (1997)
	Rio de Janeiro	<i>A. santannae</i>	Komárek & Komarková-Legnerová (2007)
Estados Unidos (Califórnia)	Lagoa, Oakland	<i>A. maxima</i>	Gardner (1917)
	Lagoa costeira, Del Mar	<i>A. platensis</i> *	Lewin (1980)
Peru	Lago Huachachina	<i>A. platensis</i>	Busson (1971)
		<i>A. maxima</i>	Desikachary & Jeeji-Bai (1992, 1996)
Uruguai	Montevideo	<i>A. platensis</i> ⁺	Gomont (1892)
EUROPA			
Espanha	Lago Santa Olalla	<i>Arthrospira</i> sp.	Rippka & Herdman (1992)
França	Lago Tiny, Camargue	<i>Arthrospira</i> sp.	Fox (1996)
Hungria	Adasztevel-Oroshaz	<i>Arthrospira</i> sp.	Busson (1971)
Romênia	Lago alcalino próxima Cluj-Napoca	<i>A. fusiformis</i>	Aldea <i>et al.</i> (2002)
Sérvia	Poças salgadas próximo do rio Tamis	<i>A. fusiformis</i>	Fuzinato <i>et al.</i> (2010)

*Cepa referência PCC 7345; ⁺Holótipo

Em relação aos estudos experimentais, o tipo de cultura mais frequentemente utilizado nos experimentos com algas e cianobactérias é o cultivo em volume limitado, contendo os nutrientes orgânicos e inorgânicos necessários para um inóculo com relativamente pouco número de células e expostas a condições controladas de luz, temperatura e aeração (Fogg & Thake 1987).

A tese de doutorado de Zarouk (1966) foi o primeiro estudo experimental detalhado com resultados de requerimentos nutricionais e de temperatura para o cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima*. O meio de cultivo Zarouk, também conhecido como meio *Spirulina* foi amplamente utilizado para o estudo desta espécie (Vonshak *et al.* 1982, 1983).

No Brasil, diversos grupos de pesquisa estão se consolidando com os estudos de linhagens de *Arthrospira* (**Tabela 3**).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 3. Grupos brasileiros de pesquisa que trabalham com espécies de *Arthrospira*. Fonte: Plataforma Lattes-CNPq.

Identificação e origem das cepas estudadas	Líder do Grupo de Pesquisa / Instituição	Linhas de pesquisa	Principais resultados publicados
<i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> UTEX 1926 - San Diego, Califórnia, EUA; <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> – “Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del Consiglio Nazionale di Ricerca (CNR)”, Universidade de Firenze, Itália.	João Carlos de Monteiro Carvalho / Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF)	Cultivo em fotobiorreator sob diferentes fontes de nitrogênio; análise da influência do pH, temperatura, irradiação no cultivo e produção de proteínas e lipídeos.	Ferreira <i>et al.</i> (2012); Bezerra <i>et al.</i> (2012); Navacchi <i>et al.</i> (2012); Morocho-Jacome <i>et al.</i> (2012); Avila-Leon <i>et al.</i> (2012); Vieira <i>et al.</i> (2012); Rodrigues <i>et al.</i> (2012); Matsudo <i>et al.</i> (2011); Bezerra <i>et al.</i> (2008); Sassano <i>et al.</i> (2010); Carvalho <i>et al.</i> (2004); Sanchez-Luna <i>et al.</i> (2007); Pelizer <i>et al.</i> (2003).
<i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> Instituto Oceanográfico – USP, origem África?	Jorge Alberto Vieira Costa / Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB)	Utilização da biomassa para consumo humano e para produção de biocombustíveis.	Costa <i>et al.</i> (2007, 2008, 2009, 2010, 2011); Antelo <i>et al.</i> (2010); Morais <i>et al.</i> (2010);
<i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i>	Ernani Sebastião Sant’Anna / Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos	Utilização de rejeito de dessalinizador como meio de cultura alternativo.	Torres <i>et al.</i> (1998); Volkmann <i>et al.</i> (2007, 2008); Pinho <i>et al.</i> (2010); Guarienti <i>et al.</i> (2010).
<i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> (origem??) e <i>Arthrospira fusiformis</i> (Lago Chade, África)	Rogério Lacaz-Ruiz / Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	Cultivo de <i>Arthrospira</i> em meio alternativo e uso da biomassa para alimentação humana e animal.	Lacaz-Ruiz <i>et al.</i> (1990, 1993, 1996, 1999), Lacaz-Ruiz (2003).
<i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> (origem?)	João Andrade da Silva / Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional. Departamento de Tecnologia de Alimentos	Utilização e produção de biomassa como suplemento alimentar para cultivo de camarão e alimentação humana.	Barros (2010), Donato <i>et al.</i> (2010).
<i>Arthrospira platensis</i> CCIBt3335 Pantanal da Nhecolândia, Salina do Meio, Brasil	Célia Leite Sant’Anna / Instituto de Botânica (IBt), Núcleo de Pesquisa em Ficologia	Taxonomia, ecofisiologia e biologia molecular.	Santos & Sant’Anna (2010), Malone <i>et al.</i> (2012), presente trabalho.

Vale destacar que a maioria desses trabalhos é realizada com cepas exóticas, provenientes de outros países e de diferentes bancos de cultura. Apenas Morais *et al.* (2008) afirmaram ter isolado a primeira cepa brasileira de *Arthrospira*, que foi proveniente da lagoa Mangueira (Rio Grande do Sul), a qual foi denominada *Arthrospira* sp. LEB 18. No entanto, os próprios autores destacaram que, apesar da lagoa Mangueira apresentar condições favoráveis para o desenvolvimento de espécies *Arthrospira* (pH >8, elevadas concentrações

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

de carbonatos e bicarbonatos), a ocorrência deste organismo jamais foi documentada para esta lagoa (Morais *et al.* 2008). Este fato torna questionável se o isolado é realmente proveniente da lagoa Mangueira e deixa em aberto duas questões: 1) se os tricomas de *Arthrospira* poderiam estar presentes em densidades extremamente baixas (na forma de hormogônios, como flora potencial) e por isso não foram registrados em outros estudos; e/ou 2) se os tricomas de *Arthrospira* poderiam ter sido transportados por aves migratórias até a lagoa Mangueira e a coleta ocasional desta amostra favoreceu o desenvolvimento em cultura, dificultando a compreensão da verdadeira origem geográfica da cepa. De qualquer forma, deve haver algum fator limitante ainda não compreendido que impede o desenvolvimento de *Arthrospira* na lagoa Mangueira.

1.2. As espécies de *Arthrospira* produzem toxinas?

Os estudos de toxicidade em camundongo com *Arthrospira maxima* do México não encontraram qualquer efeito tóxico (Salazar *et al.* 1998). No entanto, Iwasa *et al.* (2002) detectaram lesão hepática em uma pessoa de 52 anos relacionada à ingestão de *Arthrospira* (“*Spirulina*”), indicando assim uma possível hepatotoxicidade associada a *Arthrospira* comercial.

A análise de cepas comerciais de *Arthrospira* utilizadas em dieta suplementar humana usando os métodos Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência (CLAE – HPLC na sigla em inglês) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) encontrou resultados positivos para microcistinas (Gilroy *et al.* 2000). No entanto, de acordo com Ballot *et al.* (2005) não está claro se as toxinas foram produzidas pela *Arthrospira* ou por fragmentos de células ou tricomas de outras espécies de cianobactérias nas cápsulas estudadas por Gilroy *et al.* (2000).

Registros comprovados de cianotoxinas produzidas por *Arthrospira* foram realizados por Ballot *et al.* (2004, 2005), os quais documentaram a produção de microcistina-YR e anatoxina-a para *Arthrospira fusiformis* (AB2002/10) isolada do lago Bogoria e também para *A. fusiformis* (AB2002/02) isolada do Lago Sonachi, ambos na região do Quênia (África). Para *A. fusiformis* (AB2002/04) isolada do lago Nakuru foi detectada a produção apenas de anatoxina-a. A produção de toxinas por *Arthrospira* foi uma descoberta importante, visto que o gênero era tido como não tóxico por diversos autores anteriores (Ciferri 1983, Jassby 1988, Salazar *et al.* 1998).

Até o momento não foi encontrado na literatura registro de produção de toxinas para as outras espécies de *Arthrospira*.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

2. HIPÓTESES

2.1. Morfologia

Hipótese 1: A presença de aerótopos é facultativa em *Arthrospira platensis* e o hábito é planctônico.

Hipótese 2: A ausência de calíptro nas células apicais, tanto em material da natureza quanto de cultura, é uma característica morfológica estável de *Arthrospira platensis*.

Hipótese 3: Tricomas regularmente espiralados e hormogônios retos ou curvos são características inerentes ao ciclo de desenvolvimento de *Arthrospira platensis*.

2.2. Filogenia

Hipótese 1: A variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e ITS (16S-23S) não expressa a variabilidade fenotípica das espécies de *Arthrospira*.

Hipótese 2: As populações de *Arthrospira platensis* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético.

2.3. Ecofisiologia

Hipótese 1: O crescimento de *Arthrospira platensis* está correlacionado positivamente com o aumento do pH, da concentração de nitrogênio e da temperatura.

Hipótese 2: Não há produção de cianotoxinas por *Arthrospira platensis*.

3. OBJETIVOS

- Estudar a variabilidade dos caracteres morfológicos diacríticos de *Arthrospira platensis*;
- Avaliar os efeitos do pH, temperatura e concentração de nitrato sobre o desenvolvimento da cepa *A. platensis* CCIBt3335;
- Caracterizar filogeneticamente cepas de *A. platensis* do Pantanal brasileiro;
- Investigar a produção de toxinas e de outras substâncias bioativas da cepa *A. platensis* CCIBt3335.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras e obtenção de parâmetros físico-químicos das lagoas

As amostras foram coletadas com auxílio de uma garrafa imersa na superfície da água na região central e/ou na margem das lagoas. Para análise qualitativa e obtenção de cepas, parte da amostra foi mantida viva sob-refrigeração em caixa de isopor com gelo e transportadas até o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica. Parte da amostra foi fixada em campo com formol 4% e posteriormente foi incluída na coleção do Herbário Científico do Estado "Maria Eneida P. Kauffman Fidalgo" (SP), do Instituto de Botânica. Para análise quantitativa do fitoplâncton, cerca de 200 mL de amostra da região central da lagoa foi fixada em campo com solução de lugol a 1%.

Os parâmetros salinidade, condutividade e temperatura foram medidos no campo com uso da sonda WTW 340i.

A contagem do fitoplâncton da lagoa Salina do Meio foi realizada com auxílio de um microscópio invertido Carl Zeiss, em aumento de 400x, de acordo com o método de sedimentação de Utermohl (1958), seguindo as recomendações de Lund *et al.* (1958).

4.2. Estudo morfológico e de crescimento em laboratório

4.2.1. Isolamento e cultivo de *Arthrospira*

A cepa selecionada para o estudo ecofisiológico e de bioativos, *Arthrospira platensis* CCIBt3335 foi coletada na lagoa Salina do Meio, Fazenda Nhumirim (EMBRAPA) no Pantanal da Nhecolândia, no período de seca em 19/08/2009.

Como descrito na área de estudo, a Salina do Meio apresenta as características típicas de salinas do Pantanal da Nhecolândia e é relativamente bem estudada do ponto de vista limnológico (Mourão *et al.* 1988, Mourão 1989, Hamilton *et al.* 1999, Medina-Junior & Rietzler 2005), biogeoquímico (Barbiéro *et al.* 2002, Barbiéro *et al.* 2008, Almeida *et al.* 2011), mineralogia dos solos (Furquim *et al.* 2008, Furquim *et al.* 2010) e composição de microalgas e cianobactérias (Santos 2008, Santos & Sant'Anna 2010, Santos *et al.* 2012). Nessa lagoa, *Anabaenopsis elenkinii* é a espécie mais abundante, forma florações principalmente nos períodos de seca e ocorre simultaneamente com *Arthrospira platensis* (Santos & Sant'Anna 2010). Além destas cianobactérias, a diatomácea *Craticula cf. buderii* ocorre em elevadas densidades juntamente com *Anabaenopsis elenkinii* (Santos *et al.* 2012).

No laboratório, o isolamento das cepas de interesse foi feito por meio da técnica de seleção por capilaridade ou “pescaria”. Esta técnica consiste em inocular um tricoma da

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

amostra da natureza em tubos de ensaio com meio de cultura líquido. Com esta finalidade, uma lâmina de vidro foi flambada em chama de fogo, em seguida adicionou-se uma gota de amostra e várias gotas de meio de cultura (BG-11m) com cicloheximida (responsável pela destruição das células eucariotas). Com o auxílio de micropipeta e microscópio óptico (Carl Zeiss, Primo Star) foram retirados tricomas de *Arthrospira platensis* da gota da amostra, transferindo-os para outra gota com meio de cultura limpo e assim sucessivamente, até conseguir chegar a um tricoma apenas da espécie de interesse (**Figura 1**); este tricoma isolado foi transferido para um tubo de ensaio com meio de cultura líquido e a partir deste processo de “pescaria” foi possível isolar clones de cada cepa de interesse.

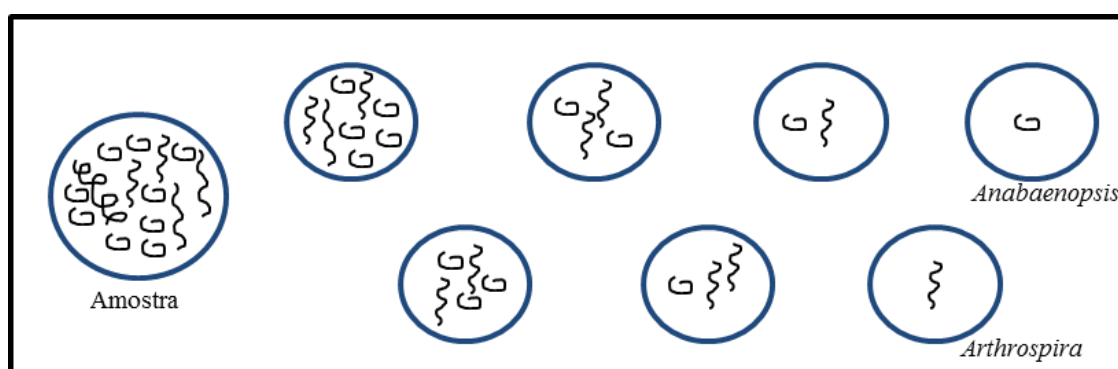


Figura 1. Representação esquemática do isolamento de tricomas de *Arthrospira* através da técnica de “pescaria” em lâmina de microscopia.

4.2.2. Manutenção das cepas isoladas e condições experimentais

As cepas de *Arthrospira platensis* são mantidas em triplicata no Banco de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, o qual faz parte da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt). As cepas são mantidas em meio líquido BG-11 (Stanier *et al.* 1971) modificado (**Tabela 4**), em condições controladas: temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância $40 - 50 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo 14-10h claro-escuro, e s\u00e3o repicadas a cada 30-40 dias (**Figura 2**). Todos os procedimentos para manuten\u00e7\u00e3o e repicagem das cepas foram feitos em c\u00e2mara de fluxo laminar previamente esterilizada com luz UV durante 30 minutos. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C , 1 atm durante 30 minutos.

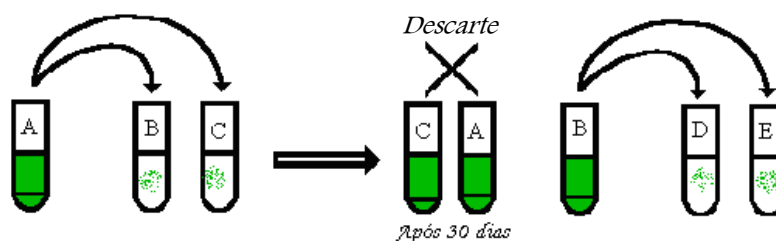


Figura 2. Esquema de repicagem das cepas mantidas na Coleção de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica.

Os experimentos de cultivo com *Arthrospira platensis* CCIBt3335 foram realizados em triplicata, em câmaras incubadoras marca Eletrobab durante 30 dias. As condições nas câmaras foram as seguintes: fotoperíodo 12–12h claro-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (medida na água com sensor subaquático marca Li-COR modelo LI-250 esférico) e temperatura controlada por termostato e termômetro de máxima e mínima colocado no interior das câmaras. As condições adotadas como controle foram as seguintes: concentração de nitrato do meio BG-11 reduzida a 3% (45 mg.L^{-1}) (**Tabela 4**), pH ajustado para 9,5 e temperatura 25°C. Esses valores foram definidos por serem os mais próximos das condições naturais onde o material foi coletado (lagoa Salina do Meio).

Etapas do planejamento experimental: a) 5 mL de inóculo foram transferidos para Erlenmeyer contendo 50 mL de meio BG-11, sendo mantidos em rotação constante de 70 rpm (rotações por minuto) por 7 a 10 dias; b) Após o crescimento da cultura, foram transferidos 50 mL deste inóculo para 500 mL de meio BG-11 mantidos a 70 rpm por 10 a 12 dias, até que atingissem a fase exponencial de crescimento; c) Dos 500 mL do inóculo obtido (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células. mL^{-1}), 50 mL foram transferidos para Erlenmeyer de 1000 mL com 500 mL de meio BG-11m e então transferidos para as câmaras de cultura, sem aeração ou agitação.

Nas câmaras de cultura, além da condição controle foram realizados experimentos em triplicata nos diferentes tratamentos: pH 10,5 e 7, temperatura 30 e 35 °C e nitrato a 750 mg/L (50%) e ausência da fonte de nitrogênio (0%), conforme **Tabela 5** e **Figura 3**.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 4. Meio de Cultura BG-11 (Stanier *et al.* 1971) e BG-11 modificado (BG-11m).

Nutrientes	Concentração do meio BG-11 original (mg/L)	Concentração do meio BG-11m (Nitrato a 3%) (mg.L ⁻¹)*
NaNO ₃ (Nitrato)	1.500	45,0*
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75,0	75,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40,0	40,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36,0	36,0
H ₃ BO ₃	2,86	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	1,81
Na ₂ EDTA	1,00	1,00
Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	0,39	0,39
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	0,22
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08	0,08
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05	0,05
Na ₂ CO ₃	2.000	2.000
Ácido cítrico	6,00	6,00
Citrato ferroso de amônio	6,00	6,00

*Condição controle, concentração de Nitrato semelhante à de ocorrência natural na Salina do Meio.

Tabela 5. Condições do controle e dos tratamentos testados para a cepa *Arthrospira platensis* CCIBt3335.

	pH	Temp. °C	Nitrato mg/L (BG11 modificado)
Controle - C	9,5	25	45 (3%)
Tratamento 1 – T1	9,5	25	750 (50%)
Tratamento 2 – T2	9,5	25	0 (0%)
Tratamento 3 – T3	9,5	30	45
Tratamento 4 – T4	9,5	35	45
Tratamento 5 – T5	10,5	25	45
Tratamento 6 – T6	7,0	25	45

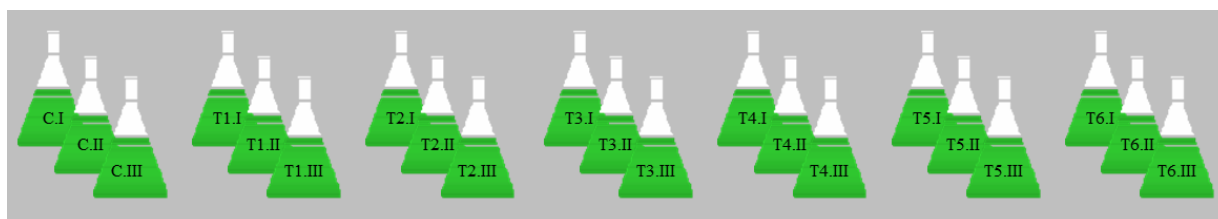


Figura 3. Representação esquemática dos experimentos de crescimento de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 em diferentes concentrações de nitrato (NaNO₃), temperatura e pH, conforme tabela 5.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

4.2.3. Análise do crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em triplicata a partir de contagens diárias em câmara de Fuchs-Rosenthal, sendo estabelecido um número máximo de 200 células por contagem (sempre que ultrapassasse este número a amostra era diluída). A contagem foi realizada em no mínimo uma área, que corresponde a 16 quadrados da câmara. Para avaliar o crescimento das cepas em função dos diferentes tratamentos, foi utilizado Planejamento Fatorial Multiníveis (Montgomery 1991) $3^1 \times 2^1$, com 3 variáveis (pH; temperatura; concentração de nitrato) em dois níveis de variação, resultando 6 condições de cultivo, além da condição controle (**Tabela 5**).

A taxa máxima de crescimento foi calculada de acordo com a fórmula de Fogg e Thake (1987) utilizando os dados da fase exponencial de crescimento:

$$\mu = [\ln(N_1) - \ln(N_0) / t_1 - t_0]$$

onde N é o número de células no tempo 1 e tempo zero.

O tempo de duplicação (G), que corresponde ao tempo necessário em dias para a população dobrar de tamanho (Fogg & Thake 1987), foi calculado pela fórmula:

$$G = \ln 2 / \mu$$

Onde o logaritmo natural de 2 é dividido pela taxa máxima de crescimento (μ), expresso em dias.

4.2.4. Análise morfológica

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas em amostras da natureza e cultivadas em laboratório nas condições experimentais descritas anteriormente, sob microscópio binocular Zeiss Axioskop-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com contraste de fase, ocular micrometrada e câmara digital Sony Cybershot acoplada. As seguintes características morfológicas foram observadas para *Arthrospira platensis*: 1) Morfologia geral do tricoma; 2) Morfologia das células apicais; 3) Morfologia das células vegetativas; 4) Comprimento e largura das 10 primeiras células apicais em 15 tricomas; 5) Número de espiras por tricoma; 6) Altura (largura) das espiras; 7) Distância entre as espiras; 8) Presença de aerótopos; 9) Presença de mucilagem (através da adição de nanquim).

O material da natureza e dos tratamentos testados foi descrito e ilustrado com fotografias.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

4.2.5. Análises estatísticas

As medidas comprimento e largura das células e tricomas foram realizadas nas fotografias digitais com o programa Zeiss Axiovision 4.6.

Para a comparação das médias de comprimento e largura entre material da natureza e de cultura foi utilizado o teste-t para amostras independentes, módulo “Basic Statistics/Tables” (Callegari-Jacques 2003). As características métricas foram descritas estatisticamente através do cálculo de média aritmética e desvio-padrão, como medidas de, respectivamente, tendência central e grau de dispersão absoluta dos dados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Komolgorov-Smirnov (Zar 1999). As diferenças entre material da natureza e de cultura foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de um fator), seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Todos os cálculos foram efetuados pelo programa GraphPadPrim v.5.1.

4.3. Estudo molecular (filogenético)

4.3.1. Extração de DNA e amplificação por PCR dos genes RNA ribossomal 16S e Espaço Intergênico ITS 16S-23S

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo o método descrito por Fiore *et al.* (2000). Aliquotas (5 µl) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30% e 0,1% de SYBER® Green I (Eugene, OR, EUA)) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2% após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). O marcador de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado. A documentação do gel foi feita usando o programa “Kodak MI Application” do “Kodak Gel Logic 212 Imaging System” (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc, Rochester, NY, EUA). O material foi armazenado a temperatura de -20°C até o início dos procedimentos seguintes.

A amplificação por PCR do gene do rRNA 16S e da região intergênica ITS 16S-23S foi realizada em tampão para a reação de PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl₂; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 0,5 µM do primer 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') (Neilan *et al.*, 1997), 0,5 µM do primer 23S30R (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT -3') (Lepère *et al.*, 2000) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne, Chelmsford, Essex, England), nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 10 ciclos de 94 °C/45s, 57 °C/45s, 72 °C/2min; 25 ciclos de 94 °C/45s, 54 °C/45s, 72 °C/2min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita em eletroforese de agarose conforme descrito acima.

4.3.2. Clonagem e transformação dos produtos de PCR

A clonagem dos produtos da PCR foi realizada utilizando o Kit de clonagem “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA). A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita através de choque térmico (Sambrook *et al.* 1989). Aliquotas de 10 µL do produto de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e deixado por 30 segundos, sem agitar. Em seguida o microtubo foi incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio SOC (Sambrook *et al.* 1989) a temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 µg/mL de meio. As placas foram incubadas por 15 horas, a temperatura de 37°C. Em seguida, uma colônia de cor branca foi utilizada visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a reação de PCR como descrito por Nübel *et al.* (1997), utilizando-se os iniciadores CYA359 (5`-GGGGAATTTTCCGCAATGGG-3`) e CYA781aR (5`-GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT-3`) e CYA781bR (5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3`) (Nübel *et al.* 1997). A reação de amplificação foi composta por tampão de PCR 2 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 6 mM MgCl₂; 3 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 10 ng de DNA; 0,4 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne, Chelmsford, Essex, England), nas seguintes condições: 94 °C/2min; 30 ciclos de 94 °C/1min, 63 °C/41min, 72 °C/1min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita em eletroforese de agarose conforme previamente descrito.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

4.3.3. Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5 α que contenham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina (Birnboim & Doly 1979). As colônias brancas foram transferidas para 4 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em microtubos foram colocados 1,5 mL da cultura de células produzidas e, em seguida, foram centrifugadas a 10.000 $\times$ g por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. O pélete formado foi ressuspensão em 100 μ L de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Em seguida, 200 μ L de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram adicionados e misturados gentilmente por meio da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram acrescentados 150 μ L de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 $\times$ g durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 270 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, misturando-se e centrifugando-se conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pélete foi lavado uma vez com 250 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 $\times$ g por 2 minutos. O pélete foi secado e ressuspensão em 30 μ L de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 M e 10 mg RNase/mL. Essa mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Os plasmídeos assim extraídos foram armazenados a -20°C até o próximo uso.

4.3.4. Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit “ABI Prism Big Dye terminator (Applied Biosystems by Life Technologies)”. Para a reação utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol dos iniciadores M13F (5'-GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA-3') ou SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'). Também foram utilizados outros seis iniciadores (357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R), visando o fechamento interno das sequências de RNAr 16S, e 1 μ L de “Big Dye”, 2 μ L de tampão 2,5 X “Save Money” (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 μ L. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit de sequenciamento. Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no sequenciador

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

capilar ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para o sequenciamento dos fragmentos de DNA. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

4.3.5. Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade <20) através do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green 1998, Ewing *et al.* 1998, Gordon *et al.* 1998), em sistema operacional Linux. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.* 1990). Para a construção da árvore filogenética, pelo método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood), as sequências obtidas e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas e editadas usando-se o pacote de programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011). Com as sequências alinhadas foi utilizado o programa TOPALi v.2 (Milne *et al.* 2009) para seleção do modelo estatístico mais adequado para análise filogenética das sequências selecionadas e o modelo indicado foi processado no programa MEGA 5.0. As novas sequências geradas neste estudo serão depositadas em bancos de dados públicos quando forem publicadas em artigo específico.

4.4. Prospeção de substâncias bioativas

4.4.1. Estudos biológicos

a) Ensaios bioautográficos para detecção de atividade inibidora da acetilcolinesterase

Preparo da solução enzimática: A enzima acetilcolinesterase tipo V (Sigma, N° C 2888, 1000 U) foi dissolvida em solução tampão Tris HCl (pH 7,8) e estabilizada pela adição de albumina de soro bovino V (0,1%, Sigma, N° A-4503).

Alíquotas das biomassas dos tratamentos 1 e 5 ao qual foi submetida a cepa *Arthrospira platensis* CCIBt3335 (**Tabela 5**) foram aplicadas a placas cromatográficas, para a avaliação de atividade anticolinesterásica, segundo Marston *et al.* (2002): 200 µg.spot⁻¹ de cada amostra, juntamente com o controle positivo eserina (Sigma, 1 µg.spot⁻¹) foram submetidos à Cromatografia de Camada Delgada (CCD), desenvolvida com a fase móvel

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

clorofórmio:metanol:água (64:36:8, v/v/v). Após o desenvolvimento, as placas foram secas, nebulizadas com a solução enzimática (6.66 U/ml) e incubadas a 37 °C, por 20 minutos. A atividade enzimática foi detectada pela nebulização de solução 0,25% de acetato de 1-naftila em metanol (5 ml) e de solução aquosa 0,25% do sal Fast Blue B (20 ml). Inibidores anticolinesterásicos em potencial aparecem como halos claros sobre fundo púrpura (roxo) (Marston *et al.* 2002).

b) Ensaios bioautográficos para atividade antifúngica (frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penz. SPC 491)

O fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum* CCIBt0491 (antes SPC 491) é mantido no Banco de Cultura de Fungos do Instituto de Botânica. Para estes ensaios, foram inoculadas placas de Petri de 10 cm contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), que foram incubadas por aproximadamente 12 dias em estufa, a 28°C. A extração dos esporos foi realizada com solução de glicose e sais e a suspensão obtida foi utilizada no ensaio bioautográfico.

A cepa submetida a esses testes foi a *Arthrospira platensis* CCIBt3335. Amostras liofilizadas, pesando 400 µg, dos extratos em ácido acético 0,1 M e metanólicos das biomassas obtidas nos tratamentos 1 e 5 a que foi submetida esta cepa, foram dissolvidas em 10 microlitros do mesmo solvente e aplicadas a placas cromatográficas de gel de sílica (MERCK 60 F₂₅₄). Após a secagem das placas, os cromatogramas foram desenvolvidos na fase móvel clorofórmio: metanol: água (64: 36: 8, v/v/v), em cubas de vidro, em atmosfera previamente equilibrada.

Após a eluição, as placas foram secas em corrente de ar, em capela, por 1 hora, para a remoção completa do solvente. Em seguida, a suspensão de esporos foi aspergida sobre as placas que foram incubadas em câmara úmida, a 28°C, por 2 dias para o desenvolvimento do fungo (Homans & Fuchs 1970, Rahalison *et al.* 1994). A formação de halos brancos sobre a coloração verde escura do fungo, no cromatograma, indica a presença de substâncias com potencial antifúngico. Como controle positivo, foi utilizada a Nistatina (1,0 µg) (Castro & Lima 2011).

c) Teste de ação hemolítica (Rangel *et al.* 1997)

O sangue foi obtido de camundongos Swiss, machos (25-30g), provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. O sangue foi colocado em um béquer com um volume

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

aproximadamente 30 vezes maior de solução fisiológica Krebs-Henseleit (NaCl 113mM; KH_2PO_4 1,2mM; KCl 4mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2mM; CaCl_2 2,5mM; NaHCO_3 25mM; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11,1mM) e mantido sob agitação constante por 15 minutos. A mistura foi centrifugada três vezes, por 7 minutos, a 3.000 rpm, para lavar os eritrócitos de componentes plasmáticos; em seguida, foi preparada uma suspensão de eritrócitos (SE) a (4) % (V/V) em solução fisiológica de Krebs-Henseleit.

Os extratos de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 (tratamentos 1 e 5, no 15° e 30° dia de cultivo) foram diluídos em solução fisiológica de Krebs-Henseleit e posteriormente colocados em uma placa de ELISA, com 96 poços; em seguida, foram adicionados 50 μL de SE a 4 %. Foi utilizada solução fisiológica, para o controle negativo e o detergente Triton X-100 a 1%, como controle positivo (hemólise total). Após uma hora de incubação, à temperatura ambiente, sob agitação constante, a solução foi centrifugada a 3.000 rpm, por 5 minutos; o sobrenadante foi transferido para placa de ELISA e a atividade hemolítica foi medida no comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados, se positivos, são analisados a partir dos logaritmos de suas médias e de seus respectivos erros padrões. O cálculo das CE_{50} (concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e de seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) são realizado a partir de regressão não-linear, no programa GraphPad Prism v. 5.1.

4.4.2. Estudos químicos

a) Prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante

Amostras dos extratos de *A. platensis* CCIBt3335, nos tratamentos T1 e T5 foram aplicadas a placas cromatográficas (MERCK 60 F₂₅₄), que foram eluídas na fase móvel clorofórmio: metanol: água (64: 36: 8, v/v/v), em cubas de vidro, em atmosfera previamente equilibrada. Após desenvolvidos e secos em corrente de ar, em capela, os cromatogramas foram nebulizados solução metanólica (2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), o qual permite detectar substâncias com atividade antioxidante. A atividade dessas substâncias aparece como manchas amareladas, sobre fundo violeta, característico do DPPH (Hostettmann *et al.* 2003). A mudança de coloração da solução de DPPH do violeta para o amarelo ocorre devido à transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de substâncias antioxidantes para o radical livre (Souza *et al.* 2007). Foi utilizada a catequina, como controle positivo.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

b) Análises qualitativa e quantitativa das microcistinas LR, RR, YR e LA, do L-BMAA e da saxitoxina utilizando a técnica de LC-MS/MS

As amostras dos extratos de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 foram analisadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA), São Paulo, Brasil, utilizando a técnica de cromatografia líquida, acoplada a detector de espectrometria de massas do tipo triplo-quadrupolo (LC-MS/MS), operando em modo de varredura MS e MS/MS. Para maior definição dos cromatogramas e espectros, as análises foram realizadas após a otimização da técnica de LC-MS/MS para detecção das cianotoxinas em questão, através do ajuste dos parâmetros do detector de espectrometria de massas (MS/MS).

Para esta análise, os liofilizados dos extratos em ácido acético 0,1 M dos tratamentos 1 e 5, nas fases exponencial (15 dias) e estacionária (30 dias) de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 foram re-suspendidos em água ultrapura (1 mL) e agitados em vórtex, por 1 minuto e filtrados em membrana filtrante Millex[®] de 0,45 µm. De cada uma das amostras, alíquotas de 1 mg/mL foram retiradas e colocadas diretamente nos poços de uma placa de 96 orifícios, para posterior injeção no sistema de LC-MS/MS.

4.4.3. Instrumentação utilizada e condições cromatográficas do LC-MS/MS

Nas tabelas abaixo são apresentados os equipamentos (**Tabela 6**), os reagentes (**Tabela 7**), as informações sobre os padrões analíticos (**Tabela 8**), a metodologia desenvolvida para identificação (**Tabela 9**), os gradientes de eluição cromatográfica (**Tabela 10**), as condições de ionização (**Tabela 11**) e os Parâmetros de Monitoramento de Reação Múltipla (**Tabela 12**) que foram utilizados neste trabalho para o sistema de LC-MS/MS para análise das microcistinas LR, RR, YR e LA; Saxitoxina e, L-BMAA.

Tabela 6. Informações sobre os equipamentos utilizados para as análises das microcistinas LR, RR, YR e LA; Saxitoxina e, L-BMAA.

Equipamento	Modelo	Fabricante
HPLC (bomba binária, desgaseificador e forno de coluna)	<i>Agilent 1260 series</i>	<i>Agilent Technologies</i>
Injetor automático	<i>Agilent 1290 series</i>	<i>Agilent Technologies</i>
Espectrômetro de massas	QTRAP 3200	AB Sciex
Programa de aquisição dos dados	<i>Analyst 1.5.2</i>	AB Sciex

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 7. Informação sobre os solventes e reagentes utilizados nas análises.

Reagentes	Especificação	Frabricante
Água Tipo I (H ₂ O)	18 mOhms	Barnsted
Acetonitrila (ACN)	Grau LC-MS	J.T. Baker
Acetato de Amônio	Padrão Analítico	Sigma-Aldrich
Ácido Fórmico	Grau LC-MS	Sigma-Aldrich

Tabela 8. Informações sobre os padrões analíticos do L-BMAA, das Microcistinas* LR, RR, YR e LA e da Saxitoxina[#].

Substância	Fórmula	MW (g.mol ⁻¹)
Cloridrato de L-BMAA	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ .HCl	154,6
Microcistina LR	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	994,5
Microcistina RR	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1037,0
Microcistina LA	C ₄₆ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	910,5
Microcistina YR	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1044,5
Saxitoxina	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	-

*A solução padrão estoque utilizada foi adquirida junto ao Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP: Solução contendo as microcistinas (LR, RR, LA e YR) na concentração de 10 µg mL⁻¹ em solução 50% Metanol. [#]Devido à ausência do padrão analítico da Saxitoxina (Sax), os parâmetros foram definidos por meio de trabalhos e metodologias publicadas (Seto *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2009).

4.4.4. Condições cromatográficas

Tabela 9. Metodologia desenvolvida para identificação das Microcistinas LR, RR, YR e LA; Saxitoxina e, L-BMAA em LC-MS/MS.

Característica	Detalhe
Coluna	Phenomenex Luna C18(2) 50x2mm 3µ
Fase móvel A	H ₂ O + 0,1 % Ácido Fórmico + 5 mM acetato de amônio
Fase móvel B	Acetonitrila + 0,1 % Ácido Fórmico + 5 mM acetato de amônio
Temperatura da coluna	25°C
Vazão	0,250 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	7,1 minutos
Solução para lavagem de agulha	MeOH:H ₂ O (75:25) (v/v)

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 10. Gradiente de eluição cromatográfica.

Etapas	Tempo (min.)	Vazão ($\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	%A	%B
0	3,70	250	80	20
1	0,80	250	80	20
2	0,81	250	10	90
3	6,00	250	10	90
4	6,10	250	80	20
5	7,10	250	80	20

4.4.5. Detecção por espectrômetro de massas – Modo positivo

Tabela 11. Condições de ionização (*Electro Spray*, ESI).

Parâmetros – Modo Positivo	Valores
<i>Curtain Gás</i>	20 a.u.
<i>Ion Spray Voltage</i>	5200
<i>Source Temperature</i>	550°C
<i>Gas 1 (nebulizer)</i>	55 a.u.
<i>Gas 2 (heater gas)</i>	50 a.u.

Tabela 12. Parâmetros de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*) para o método desenvolvido. *Collision Gas Dissociation* (N_2) = 8 a.u. *Dwell time* = 50 ms.

Substância	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
L-BMAA	119,119	102,100 88,100
Microcistina LR	995,600	135,100 213,100
Microcistina RR	519,800	135,100 213,100
Microcistina LA	910,500	135,100 213,100
Microcistina YR	1045,700	135,100 213,100
Saxitoxina*	300,100	204,100 282,100

*Devido à ausência do padrão analítico da Saxitoxina (Sax), os parâmetros de MRM foram definidos por meio de trabalhos e metodologias publicadas (Seto *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2009).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo morfológico e ocorrência de *Arthrospira platensis* nas lagoas da Nhecolândia

Na **Tabela 13** são indicadas todas as amostras estudadas, algumas características físico-químicas e espécies dominantes nas lagoas.

Tabela 13. Posição geográfica, número da amostra em herbário, algumas características físico-químicas da água e espécies de cianobactérias dominantes nas lagoas do Pantanal da Nhecolândia.

Local - Lagoa	ID Herbário	Coordenada geográfica	Data de coleta	pH	Cond. elétrica (µS/cm)	Salin. (ups)	Temp. (°C)	Espécie dominante*
Salina do Meio	SP400654	18°58'29"S, 56°38'47"W	19/08/2009	9,47	10600	6,2	32,5	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina do Meio	SP427290	18°58'29"S, 56°38'47"W	27/10/2011	9,89	4060	2,2	29,7	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina do Meio	SP427740	18°58'29"S, 56°38'47"W	06/05/2012	9,64	8770	5,1	-	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina do Meio	SP390917	18°58'29"S, 56°38'47"W	25/09/2005	9,85	19020	11,8	23,3	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina do Meio	SP390919	18°58'29"S, 56°38'47"W	22/04/2006	10,16	2870	1,4	33,3	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>Platensis</i>
Salina do Meio	SP390922	18°58'29"S, 56°38'47"W	28/08/2006	10,09	12070	7,3	24,7	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina do Meio	SP390927	18°58'29"S, 56°38'47"W	04/05/2007	10,19	3890	2,0	31,0	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Reserva	SP400842	18°57'35"S, 56°37'18"W	09/05/2005	-	2380	1,2	22,9	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Reserva	SP401692	18°57'35"S, 56°37'18"W	19/08/2009	9,68	11040	6,4	34,1	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Reserva	SP427741	18°57'35"S, 56°37'18"W	06/05/2012	10,10	5435	3,1	-	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Ponta	SP400843	18°58'56"S, 56°39'33"W	25/09/2005	9,9	5790	3,3	23,8	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Ponta	SP400845	18°58'56"S, 56°39'33"W	22/04/2006	9,8	864	0,3	32,8	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Ponta	SP400487	18°58'56"S, 56°39'33"W	28/08/2006	9,8	8970	5,2	22,8	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da Ponta	SP400849	18°58'56"S, 56°39'33"W	17/11/2006	9,9	716	0,2	30,8	<i>An. elenkinii</i> , Art. <i>platensis</i>
Salina da	SP401691	18°58'56"S,	19/08/2009	9,22	8130	4,7	30,4	<i>An. elenkinii</i> , Art.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Local - Lagoa	ID Herbário	Coordenada geográfica	Data de coleta	pH	Cond. elétrica (µS/cm)	Salin. (ups)	Temp. (°C)	Espécie dominante*
Ponta		56°39'33"W						<i>platensis</i>
Salina Pedra do Sol	SP427742	19°10'36"S, 56°57'44"W	26/08/2006	10,06	2100	1,1	28,0	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina Pedra do Sol	SP427743	19°10'36"S, 56°57'44"W	16/11/2006	10,23	12200	7,1	32,0	<i>Art. platensis</i> , <i>An. elenkinii</i>
Salina Pantanal	SP427747	18°55'40"S, 56°33'03"W	16/08/2009	-	-	-	-	<i>Art. platensis</i> , <i>An. elenkinii</i>
Salitrada Campo Dora	SP390925	18°58'05"S, 56°38'58"W	16/11/2006	8,42	1852	0,9	32,0	<i>Art. platensis</i> , <i>Spirulina subsalsa</i> , <i>An. elenkinii</i>

**An. elenkinii* = *Anabaenopsis elenkinii*; *Art. platensis* = *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis ocorreu nas lagoas salinas do Pantanal em valores de pH que variaram de 9,2-10,2, condutividade elétrica de 716-19020 µS.cm⁻¹ e temperatura 22,8-33,3°C (Tabela 13). Na lagoa Salitrada Campo Dora, a espécie foi registrada apenas uma vez, em período de seca-início de chuva, com pH 8,4, condutividade 1852 µS.cm⁻¹ e temperatura 32°C. Estes dados evidenciam a especificidade de pH alcalino, elevada condutividade e temperaturas mornas para ocorrência de *Arthrospira platensis* nas lagoas do Pantanal. Sabe-se que em águas continentais os elevados valores de condutividade elétrica indicam elevada disponibilidade de nutrientes (Tundisi & Matsumura-Tundisi 2012), e nas lagoas salinas do Pantanal esta condição é um dos fatores que provavelmente também contribui para a ocorrência e o desenvolvimento da espécie na natureza.

5.2. Caracterização morfológica de *Arthrospira platensis*

Tricomas solitários, regularmente espiralados, constrictos ou não, geralmente longos, 35-151(-371) µm compr., largura ou altura das espiras 16,0-32,4 µm, distância entre as espiras 22,0-40,6 µm, geralmente sem envelope mucilaginoso; células mais curtas que largas a subquadráticas, raramente mais longas que largas, 1,7-5,3(-9) µm compr., 4,0-7,8 µm larg., Rc/l = 0,5-1,3; células apicais arredondadas, levemente atenuadas, raramente dilatadas, sem caliptra; conteúdo celular verde azulado, geralmente granuloso, com aerótopos (Figuras 4, 5).

Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Corumbá, Pantanal da Nhacolândia, **Salina do Meio**, 25-IX-2005, K.R.S. Santos & C.F.S. Malone (SP390917), 22-IV-2006, K.R.S. Santos (SP390919), 28-VIII-2006, K.R.S. Santos (SP390922), 4-V-2007, K.R.S. Santos

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

(SP390927), 19-VIII-2009, K.R.S. Santos (SP400654), 27-X-2011, K.R.S. Santos (SP427290), 06-V-2012, C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna (SP427740); **Salina Pantanal**, 16-VIII-2009, K.R.S. Santos (SP427747); **Salina da Reserva**, 19-VIII-2009, K.R.S. Santos (SP401692), 06-V-2012, C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna (SP427741); **Salina da Ponta**, 19-VIII-2009, K.R.S. Santos (SP401691); **Salina Pedra do Sol**, 26-VIII-2006, K.R.S. Santos (SP427742), 16-XI-2006, K.R.S. Santos (SP427743).

De acordo com a descrição original (Gomont 1892), *Arthrospira platensis* apresenta tricomas não atenuados ou apenas levemente, 6-8 μm de larg., 26-36 μm altura das espiras, 43-57 μm distância entre as espiras; as células são aproximadamente isodiamétricas, 2-6 μm de compr. com protoplasma granuloso. Gomont (1892) não menciona a ocorrência ou não de aerótopos nesta espécie originalmente coletada na região de Montevideu (Uruguai), nem mesmo se o hábito seria bentônico ou planctônico. A breve indicação do hábito que aparece na descrição diz “Trichomata aeruginea, stratum tenue saturate aerugineum formantia, fragilia, in spiram laxam et amplissimam” – tricomas esverdeados, formando um estrato fino verde escuro, frágil, com espiras mais frouxas” (comparado à *Spirulina*). Analisando esta descrição, o fato de formar “estrato fino verde escuro, frágil” não ausenta a possibilidade da espécie possuir aerótopos, uma vez que florações de *Arthrospira* spp. frequentemente formam fina camada sobre a lâmina d’água e estes espécimes possuem aerótopos. As florações de *A. platensis* observadas em nosso estudo (**Capítulo 1 - Figura 3, C**) mostram claramente isso.

Conforme observado no presente estudo, a ocorrência de aerótopos em *A. platensis* pode ser facultativa (**Figuras 4 e 5**), o que poderia justificar a não representação de aerótopos na ilustração e descrição original da espécie documentada em Gomont (1892), nem no material tipo depositado no Museu Britânico de História Natural e analisado por Komárek & Lund (1990).

Komárek & Lund (1990) afirmaram, a partir de observações do material tipo depositado em exsicata de herbário, que *A. platensis* seria bentônica, não apresenta aerótopos e os tricomas não atenuam ou apenas levemente. No entanto, questiona-se o fato de considerar *A. platensis* como espécie não planctônica com base nas células secas do isótipo depositado em herbário, o que é plenamente justificável já que os aerótopos tendem a ser destruídos em material seco (Tomaselli 1997). Além disso, de acordo com a revisão do gênero realizada por Jeeji-Bai (1999), *A. platensis* apresenta tricomas com 5-7 μm de larg., gradualmente e

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

distintivamente atenuados para os ápices, células apicais frequentemente subcapitadas a distintivamente captadas, mas sempre sem caliptra e protoplasma com aerótopos.

No presente estudo e no trabalho realizado por Santos & Sant'Anna (2010) foi observado variação morfológica dos tricomas de *A. platensis* em material da natureza (**Figura 4, A-D, Figura 5**): tricomas geralmente cilíndricos, mas às vezes gradualmente atenuados; células apicais arredondadas sem formação de caliptra, aerótopos presentes em praticamente todos os tricomas, ocorrência de grânulos em alguns indivíduos e tricomas de 4-7,8 μm largura. A análise dessas populações indica que as características diagnósticas desta espécie devem ser ampliadas e revisadas, uma vez que foi observada ampla variação morfológica nas características diacríticas e sempre foram observadas formas intermediárias. Assim, o material brasileiro está de acordo com a circunscrição original de *A. platensis* (medidas e forma do tricoma) apresentada por Gomont (1892) acrescida dos caracteres observados por Jeeji-Bai (1999), principalmente em relação à presença de aerótopos. Além das características morfométricas, a ocorrência de *A. platensis* no Pantanal, parece ser mais coerente com essa espécie descrita originalmente para a região de Montevideu, Uruguai, América do Sul.

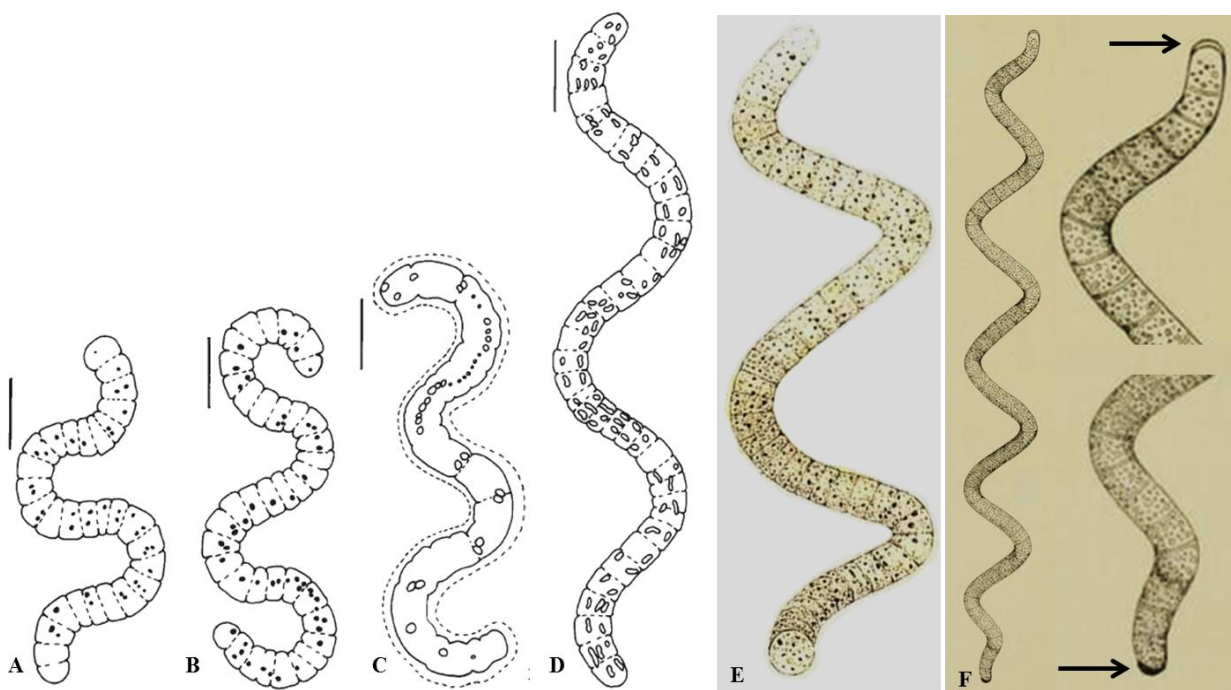


Figura 4. A-D: Variabilidade morfológica de *Arthrospira platensis* em amostras da lagoa Salina do Meio, Pantanal da Nhecolândia; **A, B.** Tricomas com grânulos, ápice levemente atenuado ou dilatado; **C.** Tricoma com mucilagem (ocorrência rara); **D.** Tricoma regularmente espiralado, com aerótopos, aspecto comumente encontrado nas lagoas salinas (Figuras de acordo com Santos & Sant'Anna 2010). **E.** Ilustração original (iconotipo) de *Arthrospira*

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

platensis mostrando tricoma com célula apical amplamente arredondada, sem caliptra (Gomont 1892, pl. 7, fig. 27). **F.** Ilustração original (iconotipo) de *Arthrospira maxima* mostrando tricoma com célula apical com caliptra (setas) (Gardner 1917, pl. 33, fig. 3). Escalas = 10 µm.

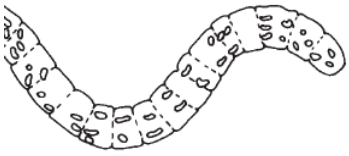
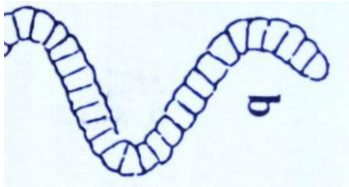
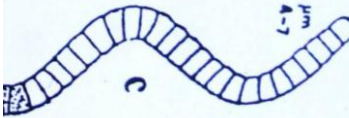
Na **Figura 4** é apresentada a variação morfológica de *A. platensis* do Pantanal e as ilustrações originais (iconotipos) de *A. platensis* (Gomont 1892) e de *A. maxima* (Gardner 1917) para comparação. Conforme observado nas **Figuras 4 e 5**, e nos dados morfométricos (**Tabela 14**), fica evidente a semelhança do material do Pantanal com *A. platensis*, que difere de *A. maxima* principalmente pela primeira possuir espiras com dimensões menores e ausência de caliptra.



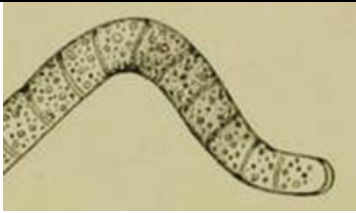
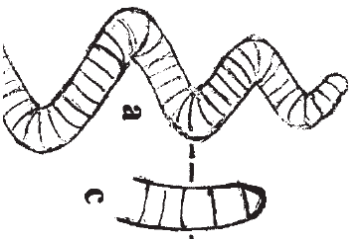
Figura 5. A-D. Aspecto geral dos tricomas regularmente espiralados e com aerótopos de *Arthrospira platensis* em lagoas salinas do Pantanal. A, B. Amostras da Salina Pantanal; C. Salina da Reserva; D. Salina do Meio; E-F. Amostras da Salina do Meio. E. Tricoma sem aerótopos, F. Hormogônios com grânulos e sem aerótopos. Escalas = 10 µm.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 14. Principais características morfológicas de *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont e a espécie mais próxima - *Arthrospira maxima* Setchell & N.L.Gardner, de acordo com a descrição original e diferentes autores.

Espécie / Referência	Aerótopos - hábito	Construção do tricoma	Ápice do tricoma/ célula apical	Largura do tricoma (µm)	Comprimento das células (µm)	Altura das espiras (µm)	Distância entre espiras (µm)	Local de coleta e data	Figura
<i>A. platensis</i> (Nordstedt) / Gomont / Gomont (1892) conceito original	? - ?	Levemente constrito	Levemente ou não atenuado/ arredondada sem caliptra	6-8	2-6	26-36	43-57	Próximo a Montevideu, Uruguai; 1884	
<i>A. platensis</i> / Santos & Sant'Anna (2010) e presente estudo	Presentes (facultativo, podem ocorrer tricomas e hormogônios sem aerótopos) - planctônico	Constrito ou levemente constrito	Levemente ou não atenuado/ arredondada sem caliptra	4-7,8	1,7-5,3(9)	16,0-32,4	22,0-40,6	Lagoas Salinas do Pantanal da Nhecolândia, Brasil; 2004-2012	
<i>A. platensis</i> / Komárek & Anagnostidis (2005)	Ausentes - perifítico, bentônico	Levemente constrito	Levemente ou não atenuado/ arredondada ou com caliptra plana	(4)6-7(9?)	-	(20?)26-36	(24?)30-57	América do Sul, dados para Europa não comprovados; distribuição mais ampla (?)	
<i>A. platensis</i> / Komárek & Lund 1990	Ausentes - perifítico, bentônico	Levemente constrito	Levemente atenuado	(4)6-7(8?)	-	26-36	30-57	América do Sul, distribuição mais ampla (?)	

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Espécie / Referência	Aerótopos - hábito	Construção do tricoma	Ápice do tricoma/ célula apical	Largura do tricoma (µm)	Comprimento das células (µm)	Altura das espiras (µm)	Distância entre espiras (µm)	Local de coleta e data	Figura
<i>Arthrospira maxima</i> / Gardner (1917)	Presentes - planctônico	Não constrito	Levemente atenuado/ com caliptra	7-9	5-7	40-60	70-80	Lagoas de águas mornas salinas, Sul da Califórnia, Key Route Power-house, Oakland, Estados Unidos; 1916.	
<i>Arthrospira maxima</i> / Komárek & Komárková-Legnerová (2002)	Presentes - planctônico	Não constrito ou muito levemente constrito	Levemente ou não atenuado/ com caliptra cônica	8-(12)	Mais curtas que largas, raramente isodiamétricas	(34,5)-51	±(34,5)-51	Lagos vulcânicos e alcalinos Atlacoya (Tecuitlapa) e El Rincon de Parangueo, México; 1992-1993.	

CAPÍTULO 3 – *Anabaenopsis*

5.3. Características de *A. platensis* CCIBt3335 isolada da lagoa Salina do Meio

A amostra da lagoa Salina do Meio (coleta 19/08/2009) apresentou apenas três espécies dominantes, sendo as cianobactérias *Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis* responsáveis por 49% e 17% da densidade celular total, respectivamente, e a diatomácea *Craticula cf. buder* contribuiu com 34% da densidade (**Tabela 15**).

Nesta amostra ocorreram apenas hormogônios (tricomas curtos, retos ou levemente curvos com função de reprodução) de *Arthrospira platensis* (**Figura 6**).

Tabela 15. Composição fitoplanctônica e densidade (células.mL⁻¹) da amostra da lagoa Salina do Meio, Pantanal da Nhecolândia (coleta 19/08/2009).

Táxon	Densidade (células.mL ⁻¹)	Porcentagem de contribuição na amostra
Cyanobacteria		
<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	243.754	49%
<i>Arthrospira platensis</i> (hormogônios)	84.440	17%
Bacillariophyceae		
<i>Craticula buder</i>	171.377	34%
Total	499.571	100%

O cultivo desses hormogônios permitiu comprovar o desenvolvimento dos mesmos em tricomas regularmente espiralados típicos da espécie. Conforme observado na **Figura 6**, durante o cultivo foi possível demonstrar o ciclo de desenvolvimento completo de *A. platensis*, desde o crescimento dos hormogônios formando tricomas espiralados, até a formação de necrídio (célula morta) que facilita a quebra do tricoma e consequente liberação de hormogônios, dando início novamente ao ciclo. Vale destacar que o material isolado da natureza apresentava-se com ou sem aerótopos e ambos desenvolveram-se em cultura formando tricomas regularmente espiralados com aerótopos. Além disso, durante a quebra dos tricomas pode haver liberação de hormogônios com ou sem aerótopos (**Figura 6**, E-F), demonstrando o caráter facultativo da ocorrência de aerótopos nesta espécie. A formação de caliptra jamais foi observada, tanto em material da natureza quanto de cultura.

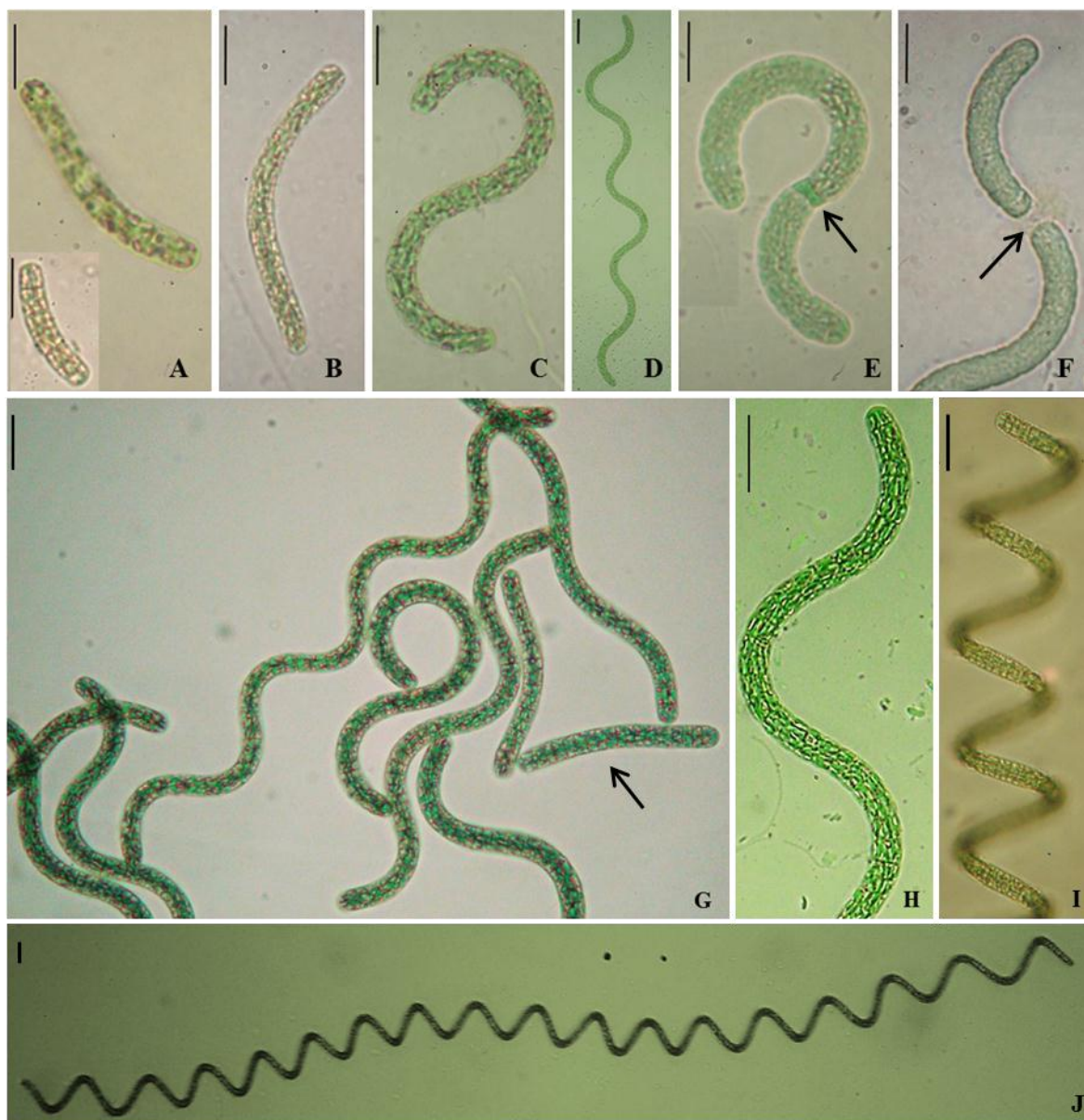


Figura 6. A-F. Fases de desenvolvimento de *Arthrospira platensis*: **A.** Hormogônios na amostra da natureza (Salina do Meio); **B, C.** Hormogônios em crescimento na cultura; **D.** Tricoma adulto, forma típica em cultura; **E.** Tricoma com necrídio (seta) e parte do tricoma com aerótopos e outra sem aerótopos; **F.** Quebra do tricoma na região do necrídio (seta) e consequente liberação de hormogônio. **G-J.** Aspecto dos tricomas em cultura; **G.** Ocorrência de hormogônios retos (seta); **H.** Detalhe do ápice do tricoma arredondado e sem caliptra; **I, J.** Tricomas regularmente espiralados. Escalas = 10µm.

Portanto, de acordo com os resultados do presente estudo, as hipóteses referentes à morfologia foram confirmadas, demonstrando que: 1) A presença de aerótopos é facultativa em *Arthrospira platensis* e o hábito é planctônico; 2) A ausência de caliptra nas células

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

apicais, tanto em material da natureza quanto de cultura, é uma característica morfológica estável de *Arthrospira platensis*; e, 3) Tricomas regularmente espiralados e hormogônios retos ou curvos são características inerentes ao ciclo de desenvolvimento de *Arthrospira platensis*.

5.4. Caracterização filogenética de *Arthrospira platensis*

Na **Tabela 16** são listadas as cepas de *Arthrospira platensis* isoladas e os genes sequenciados no presente estudo. Na **Tabela 17** são listadas as cepas de *Arthrospira* utilizadas nas análises filogenéticas das árvores do 16S e ITS e algumas características ambientais do local de origem da cepa são apresentadas (quando disponível em literatura).

Tabela 16. Lista de cepas de *Arthrospira* e genes sequenciados no presente estudo.

Espécie	Cepa	Lagoa - Data da coleta	ID Herbário	Origem	16S RNAr	ITS (16S-23S)
<i>A. platensis</i>	CCIBt3335	Salina do Meio 19/08/2009	SP400654	Pantanal, MS, Brasil	X	X
<i>A. platensis</i>	CCIBt3254	Salina Pedra do Sol 18/11/2006	SP427743	Pantanal, MS, Brasil	X	-

Tabela 17. Lista de cepas de *Arthrospira* incluídas nas análises filogenéticas: em negrito as cepas sequenciadas no presente estudo; as demais sequências foram obtidas do NCBI (GenBank). Os dados de condutividade em itálico foram estimados a partir da salinidade, de acordo com a equação da reta extraída da tabela de conversão de Weyl (1964).

Identificação da cepa na coleção de cultura	Número da cepa	Origem	pH	Salinidade (ups)	Cond. elétrica ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)	ID GenBank RNAr 16S	ID GenBank ITS (16S-23S)
<i>A. platensis</i>	CCIBt3335	Salina do Meio, Pantanal, Brasil	9,5	6,3	10600	X	X
<i>A. platensis</i>	CCIBt3254	Salina Pedra do Sol, Pantanal, Brasil	10,2	7,4	12200	X	-
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/01*	Lago Bogoria, Quênia	9,8	55,1	<i>86422</i>	-	FJ001876
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/02*	Lago Bogoria, Quênia	9,8	55,1	<i>86422</i>	-	FJ001877
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/03*	Lago Bogoria, Quênia	9,8	55,1	<i>86422</i>	-	FJ001878
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/04*	Lago Elmenteita, Quênia	9,7	32,7	<i>51586</i>	-	FJ001879
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/05*	Lago Bogoria, Quênia	9,8	55,1	<i>86422</i>	-	FJ001880
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/06*	Lago Oloidien, Quênia	9,6	3,6	<i>6330</i>	-	FJ001881
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/08*	Lago Texcoco (L. Recreativo), México	10,6	11,5	<i>18616</i>	-	FJ001882
<i>Arthrospira</i>	AB2006/09*	Lago Texcoco	10,2	35,0	<i>55163</i>	-	FJ001883

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Identificação da cepa na coleção de cultura	Número da cepa	Origem	pH	Salinidade (ups)	Cond. elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	ID GenBank RNAr 16S	ID GenBank ITS (16S-23S)
<i>Arthrospira</i> sp.		(Caracol), México					
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/10*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	3,6	6330	-	FJ001884
<i>Arthrospira</i> sp.	ABB2006/11*	Lago Texcoco (L. Recreativo), México	10,6	11,5	18616	-	FJ001885
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/12*	Lago Texcoco (Caracol), México	10,2	35,0	55163	-	FJ001886
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/13*	Lago Texcoco (L. Recreativo), México	10,6	11,5	18616	-	FJ001887
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/14*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	3,6	6330	-	FJ001888
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/15*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	3,6	6330	-	FJ001889
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2006/16*	Lago Texcoco (Caracol), México	10,2	35,0	55163	-	FJ001890
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/02*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	11,5	18616	-	FJ001891
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/04*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,2	35,0	55163	-	FJ001892
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/05*	Lago Texcoco (Caracol), México	10,2	35,0	55163	-	FJ001893
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/06*	Lago Texcoco (Caracol), México	10,2	35,0	55163	-	FJ001894
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/09*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	3,6	6330	-	FJ001895
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/10*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	3,6	6330	-	FJ001896
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2004/12*	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	10,4	3,6	6330	-	FJ001897
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2005/113*	Lago Nakuru, Quênia	10,2	24,8	39300	-	FJ001898
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2005/115*	Lago Nakuru, Quênia	10,2	24,8	39300	-	FJ001899
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2005/117*	Lago Nakuru, Quênia	10,2	24,8	39300	-	FJ001900
<i>Arthrospira</i> sp.	KR2005/118*	Lago Katwe, Uganda	9,7	300,0	467291	-	FJ001901
<i>Arthrospira</i> sp.	PD2002/02*	Lago Shambhar, Índia	9,8	40,0	62939	-	FJ001902
<i>Arthrospira</i> sp.	PD2002/03*	Lago Shambhar, Índia	9,8	40,0	62939	-	FJ001907
<i>Arthrospira</i> sp.	PD2002/04*	Lago Shambhar, Índia	9,8	40,0	62939	-	FJ001903
<i>Arthrospira</i> sp.	PD2002/06*	Lago Mansagar, Índia	9,2	1,1	2442	-	FJ001904
<i>Arthrospira</i> sp.	PD2002/07*	Lago Shambhar, Índia	9,8	40,0	62939	-	FJ001905
<i>Arthrospira</i> sp.	PD2002/08*	Lago Shambhar, Índia	9,8	40,0	62939	-	FJ001906

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Identificação da cepa na coleção de cultura	Número da cepa	Origem	pH	Salinidade (ups)	Cond. elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	ID GenBank RNAr 16S	ID GenBank ITS (16S-23S)
<i>Arthrospira</i> sp.	AB2002/38*	Lago Big Momella, Tanzânia	-	28,5	45054	-	FJ001875
<i>A. indica</i>	PD2002/ana°	Lago Anasaggar (Ajmer), Índia	9,6	1,9	3686	AY575932	AY575932
<i>A. indica</i>	PD1998/pus°	Lagoa Pushkar, Índia	7,6	< 1,0	-	AY575930	AY575930
<i>A. indica</i>	PD1997/ram°	Proximidades do Lago Ramgarh (Jaipur), Índia	8,0	< 1,0	-	AY575931	AY575931
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/01°	Lago Elmenteita, Quênia	10,4	27,7	43810	AY575923	AY575923
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/02°	Lago Sonachi, Quênia	10,4	10,4	16905	AY575924	AY575924
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/03°	Lago Magadi, Quênia	9,9	46,7	73359	AY575925	AY575925
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/04°	Lago Nakuru, Quênia	10,5	30,1	47542	AY575926	AY575926
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/05°	Lago Bogoria, Quênia	9,9	53,1	83312	AY575927	AY575927
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/10°	Lago Bogoria, Quênia	9,9	53,1	83312	AY575928	AY575928
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/11°	Lago Simbi, Quênia	10,1	9,7	15816	AY575929	AY575929
<i>A. platensis</i>	SP-1 (D0884)'	Lago Texcoco, México	-	-	-	-	AJ292324
<i>Arthrospira</i> sp.	OUQDS6 (Mao et al. 2001)	?	-	-	-	-	AF329393
<i>Arthrospira</i> sp.	PCC 9223'	Lago Santa Olalla (Parque Nacional Donana), Espanha	-	-	-	-	AJ292335
<i>A. fusiformis</i>	AB2002/11°	Quênia (Ballot et al. 2004)	-	-	-	-	AY575929
<i>Arthrospira</i> sp.	C1'	Lago Bodou (Kanem), Chade	-	-	-	-	AJ292330
<i>A. fusiformis</i>	CCAP 1475/8'	Lago Chitu, Etiópia	-	-	-	-	AJ292321
<i>Arthrospira</i> sp.	3832 ("dried sample")'	Lago Yoan (Ounianga Kébir), Chade	-	-	-	-	AJ292339
<i>Arthrospira</i> sp.	Titicaca'	Lago Titicaca, Peru	-	-	-	-	AJ292331
<i>A. maxima</i>	Lefevre 1963/M-132 (Sena et al. 2011)	Lago Natron, Chade	-	-	-	FJ798612	FJ798612
<i>Arthrospira</i> sp.	TKF1	Taiwan ?	-	-	-	-	AY101599
<i>A. maxima</i>	SAG 84.79'	Lago Natron, Chade	-	-	-	-	AJ292323
<i>Arthrospira</i> sp.	ROHRER'	Pílula commercial (pill) ?	-	-	-	-	AJ292341
<i>Arthrospira</i> sp.	SP-10	Madagascar	-	-	-	-	AJ292325
<i>A. platensis</i>	SP-7	México ?	-	-	-	-	EF432313
<i>Arthrospira</i> sp.	FACHB-438	?	-	-	-	-	AF329392
<i>A. platensis</i>	SP-2	?	-	-	-	DQ279768	DQ279768
<i>A. platensis</i>	SAG 257.80	Lagoa Huacachina (Ica), Peru	-	-	-	DQ393282	AJ292337
<i>A. fusiformis</i>	AICB 664	?	-	-	-	AY672718	-

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Identificação da cepa na coleção de cultura	Número da cepa	Origem	pH	Salinidade (ups)	Cond. elétrica ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)	ID GenBank RNAr 16S	ID GenBank ITS (16S-23S)
<i>A. fusiformis</i>	AICB 663	?	-	-	-	AY672715	-
<i>Arthrospira</i> sp.	PCC 8005 [°]	?	-	-	-	X70769.2	-
<i>A. platensis</i>	SP-10	?	-	-	-	DQ279767	-
<i>A. platensis</i>	SP-1	?	-	-	-	DQ279770	-
<i>A. platensis</i>	SP-18	?	-	-	-	EF432320	-
<i>A. platensis</i>	SP-6	?	-	-	-	EF432312	-
<i>A. platensis</i>	UTEX 2340 (LB 2340)	Lago Natron, Chade	-	-	-	DQ393280	-
<i>A. platensis</i>	SP-14	?	-	-	-	EF432316	-
<i>A. jenneria</i>	EB 9604	Lago alcalino do Planalto Ordos (Bayannaoer), China	-	-	-	GQ184185	GQ154660
<i>A. platensis</i>	SP-8	?	-	-	-	EF432314	-
<i>A. platensis</i>	HZ01	?	-	-	-	EU427543	-
<i>A. maxima</i>	FACHB438	?	-	-	-	EF564663	-
<i>Arthrospira</i> sp.	PCC 7345 [°]	?	-	-	-	X75044	-
<i>A. maxima</i>	BJ2000	Lago Texcoco, México	-	-	-	GQ206141	-
<i>Arthrospira</i> sp.	FACHB439	Produto comercial, ?	-	-	-	AF329391	-

*Conforme Dadheech *et al.* (2010); °Conforme Ballot *et al.* (2004); °Conforme Baurain *et al.* (2002); °Nelissen *et al.* (1994).

O estudo realizado por Scheldeman *et al.* (1999), utilizando sequências dos genes ITS (16S-23S) e *cpcBA*-IGS (operon da ficocianina) de cepas de *Arthrospira* provenientes de quatro continentes (Ásia, África, América e Europa) geraram árvores filogenéticas com apenas dois clados principais. Os referidos autores concluíram que não pode ser observada nenhuma relação clara entre esta divisão com a origem geográfica das cepas ou sua designação nas coleções ou morfologia. Da mesma maneira, Baurain *et al.* (2002) também chegaram às mesmas conclusões ao estudarem cepas dos quatro continentes utilizando os genes ITS e RNAr 16S, o que torna evidente a problemática filogenética e taxonômica das espécies do gênero. Por outro lado, estudo recente com os mesmos genes (ITS 16S-23S e *cpcBA*-IGS) e adição de novas sequências, indicou que os membros do gênero *Arthrospira* podem ser relacionados de acordo com a hipótese de coincidência de linhagens evolutivas distintas com a origem geográfica, apesar da delimitação das espécies ainda não ser bem definida (Dadheech *et al.* 2010).

Em nosso estudo, tanto na árvore filogenética de sequência do gene RNAr 16S quanto do ITS (16S-23S) observa-se também dois clados principais (**Figuras 7 e 8** respectivamente). Na árvore do 16S, o primeiro clado inclui cepas originárias da África (Quênia e Chade) e

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

algumas de origem duvidosa (China, ou cepas comerciais). O segundo clado agrupa a cepa do Pantanal com *Arthrospira* spp. principalmente da América Latina (Lago Texcoco no México; Peru). Estas observações parecem indicar um agrupamento por origem geográfica, conforme sugerido por Dadheech *et al.* (2010).

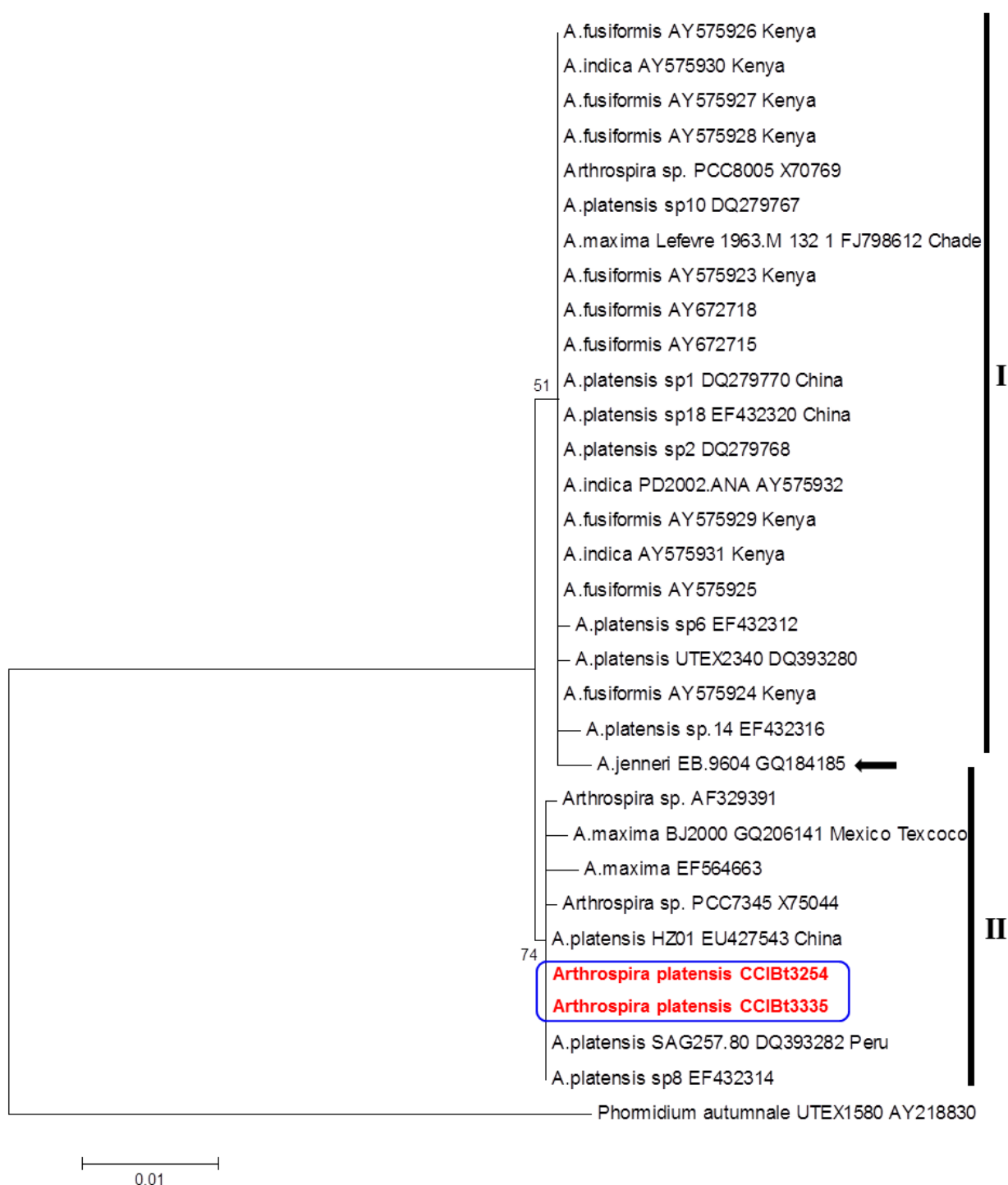


Figura 7. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do gene **RNAr 16S** (1245 pb). Em vermelho as cepas de *Arthrospira platensis* do Pantanal CCIBt3254 e CCIBt3335. Valores de porcentagem de reamostragem (1000x) são apresentados na base dos clados. Seta indica a cepa *A. jenneri* EB 9604, representando uma espécie tipicamente bentônica e sem aerótopos.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

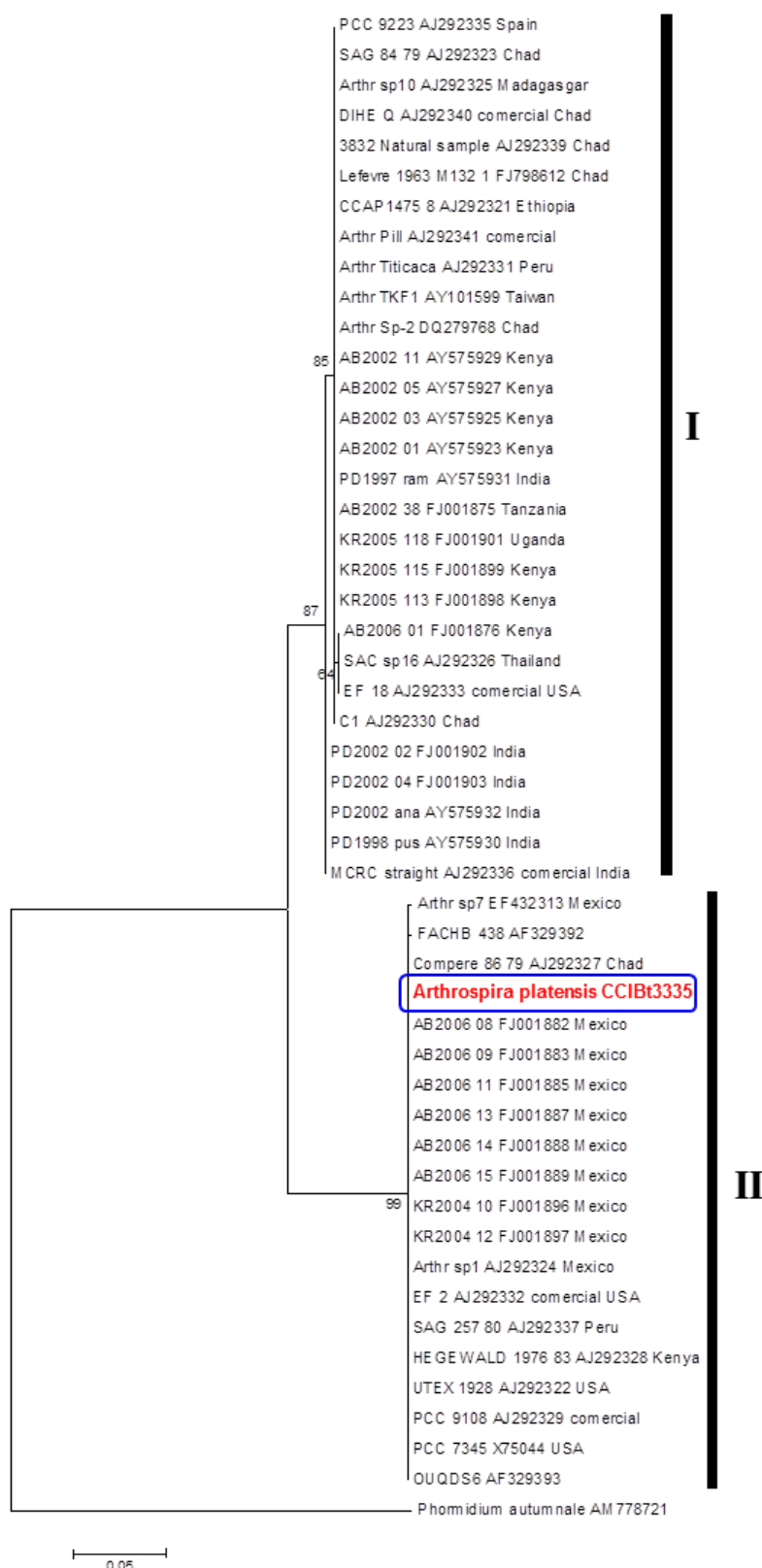


Figura 8. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do espaço intergênico **ITS RNAr 16S-23S** (410 pb). Em vermelho a cepa *Arthrospira platensis* CCIBt3335. Valores de porcentagem de reamostragem (1000x) são apresentados na base dos clados.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

De acordo com os dados moleculares e a elevada similaridade de nucleotídeos entre os táxons do clado I e do clado II (**Tabelas 18 e 19**), tanto na árvore filogenética do 16S (>99,3%) quanto do ITS (>91,0 %), é possível inferir do ponto de vista genético que ocorram apenas duas espécies de *Arthrospira* sequenciadas (conforme sugerido por Baurain *et al.* 2002 e Dadheech *et al.* 2010) ou que estes marcadores moleculares não apresentam diferenças suficientes para distinguir as diferentes morfoespécies conhecidas. Considerando a primeira hipótese, o clado I das árvores 16S e ITS parece representar táxons relacionados à espécie *Arthrospira fusiformis* (tricomas com ampla variação morfológica das espiras, ápices atenuados, captados ou com caliptra – Komárek & Lund 1990) que ocorrem principalmente no continente Africano (Dadheech *et al.* 2010), enquanto o clado II inclui os morfotipos relacionados com *A. platensis* ou *A. maxima*, de ocorrência predominante no continente Americano (Dadheech *et al.* 2010).

Tabela 18. Similaridade *p*-distans (%) entre os clados I e II do gene **RNAr 16S** obtida de sequências de *Arthrospira* (ver Figura 7).

Clados	Clado I	Clado II
Clado I	99,8-100,0	-
Clado II	99,3-99,7	99,8-100,0

Tabela 19. Similaridade *p*-distans (%) entre os clados I e II do espaço intergênico **ITS RNAr 16S -23S** obtida de sequências de *Arthrospira* (ver Figura 8).

Clados	Clado I	Clado II
Clado I	99,8-100,0	-
Clado II	91,0-92,0	99,5-100,0

A distribuição cosmopolita e conservação dos genes 16S e ITS é mais fácil de compreender no caso de cianobactérias marinhas, como *Microcoleus chthonoplastes* (Garcia-Pichel *et al.* 1996) e espécies de *Phormidium* ou *Leptolyngbya* (Wilmotte *et al.* 1997), que podem ser transportadas por longas distâncias através da circulação da água do mar (Mullins *et al.* 1995). Por outro lado, as cepas de *Arthrospira* são provenientes de habitats muito típicos (alcalinos, salinos ou salobros) e apresentam distribuição ampla e irregular nos continentes (Scheldeman *et al.* 1999, Baurain *et al.* 2002).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

De acordo com Scheldeman *et al.* (1999), a ampla distribuição geográfica dos dois clados intimamente relacionados de *Arthrospira* pode ser explicada, até certo ponto, por aves aquáticas migratórias (flamingos, pelicanos, íbis, patos etc.) que distribuem estes táxons entre os lagos de um mesmo continente ou continentes próximos (como África e Ásia). No entanto, as sobreposições geográficas e a distribuição aparentemente bastante aleatória das cepas dos diferentes continentes em ambos os clados são difíceis de explicar (Baurain *et al.* 2002).

Dadheech *et al.* (2010) sugerem que a velocidade de propagação de *Arthrospira* pode ser rápida e influenciada pelas aves migratórias e também pelo vento, à exemplo do que foi demonstrado para *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenayya & Subba Raju que tem origem na África tropical e apresentou expansão na sua distribuição para regiões temperadas do norte da Europa em um intervalo de tempo menor que 100 anos (Padisák 1997).

Em relação à presença de aerótopos, vale destacar que para alguns gêneros de cianobactérias este caráter é muito importante e serviu de base para distinguir e separar, por exemplo, o gênero *Planktothrix* (com aerótopos) de *Phormidium* (sem aerótopos), cada um agrupando-se em clados filogenéticos distintos com base no gene RNAr 16S (Anagnostids & Komárek 1988, Komárek & Anagnostids 2005) . Por outro lado, a presença ou ausência de aerótopos nas espécies de *Arthrospira* parece não diferir filogeneticamente, visto a alta similaridade dos genes 16S e ITS de *A. jenneri* EB9604 (cepa tipicamente bentônica e sem aerótopo) com as espécies *A. fusiformis*, *A. maxima* e *A. platensis*, cepas tipicamente planctônicas e com aerótopos (**Figuras 4 e 5**).

Mühling *et al.* (2006) realizaram estudo fenotípico/fisiológico em 35 cepas clonais axênicas de *Arthrospira* (33 com tricomas helicoidais e duas com tricomas retos) utilizando 28 caracteres: 14 dos quais foram morfológicos, 1 ultra-estrutural, 7 fisiológicos e 6 bioquímicos. O estudo revelou dois grupos fenotípicos que tiveram alta correlação com caracteres descrevendo a forma dos tricomas helicoidais: Grupo I com hélice dos tricomas altamente variável, sempre irregular, ou com hélice dos tricomas fusiformes, com uma rápida diminuição e atenuação da hélice para os ápices (*A. maxima*, *A. fusiformis*, *A. indica*), e Grupo II com hélice dos tricomas regulares e leve atenuação em direção aos ápices (*A. platensis*). Estes dois grupos, em comparação com as análises moleculares das mesmas cepas estudadas por Scheldeman *et al.* (1999) e Baurain *et al.* (2002), mostraram alta taxa de correlação (Sili *et al.* 2012).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Apesar das diferenças morfológicas entre *A. platensis* e *A. maxima* (**Tabela 14**), ainda não há consenso entre os pesquisadores sobre a filogenia destes táxons (Tomazeli 1997, Scheldeman *et al.* 1999, Baurain *et al.* 2002, Choi *et al.* 2012). Além disso, uma possível proposta para sinonimizar estas espécies, considerando a elevada similaridade genética, teria como prioritário o nome *A. platensis* (Gomont 1892), conforme previsto pelo princípio da prioridade no Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Melbourne 2011). Assim, nossos dados morfológicos e filogenéticos corroboram com a literatura e reforçam a possibilidade de haver apenas duas espécies de *Arthrospira* planctônicas (dois clados principais) e as populações abundantes no plâncton de lagoas alcalinas do Pantanal, Peru e México são provavelmente mais relacionadas à *A. platensis*, espécie originalmente descrita para Montevideo (Uruguai, próximo ao Rio de La Plata).

Desta forma, a hipótese 1 de filogenia, proposta no presente estudo foi confirmada, ou seja, a variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e ITS (16S-23S) não expressa a variabilidade fenotípica das espécies de *Arthrospira*. No entanto, a hipótese 2 (as populações de *Arthrospira platensis* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético) foi apenas parcialmente confirmada, visto que muitas sequências de *A. platensis* depositadas no GenBank não puderam ter a identificação morfológica confirmada e, além disso, o conceito morfológico desta espécie varia de acordo com diferentes autores, principalmente em relação à presença ou ausência de aerótopos, o que indica que podem haver erros de identificação das linhagens depositadas no GenBank.

Portanto, alguns estudos ainda precisam ser realizados para resolver este problema: 1) sequenciar o material tipo ou da localidade tipo de *A. platensis* e comparar com as demais espécies sequenciadas, especialmente *A. maxima*; 2) Sequenciar o material tipo ou da localidade tipo de *A. jenneri* (espécie tipo do gênero) e demais espécies tipicamente bentônicas sem aerótopos (como *A. massartii*) para avaliar se a presença ou ausência de aerótopos formaria outro clado distinto das cepas até agora sequenciadas do gênero; 3) Rever o conceito de espécie para o gênero *Arthrospira* e com base em análises polifásicas padronizar a nomenclatura de suas espécies e propor os devidos sinônimos.

5.5. Estudos ecofisiológicos com *Arthrospira platensis* CCIBt3335

Os experimentos com *Arthrospira platensis* CCIBt3335 mostraram que a cepa requer elevada concentração de nitrogênio para seu crescimento e pH alcalino, visto que os

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

tratamentos com nitrato 45 mg.L⁻¹ ou zero em pH 7 ou 9,5 foram limitantes para o crescimento da espécie, assim como as temperaturas de 30 ou 35°C com 45 mg.L⁻¹ de nitrato (**Tabela 20** e **Figura 9**). Apenas no tratamento 5, com pH 10,5 a espécie foi capaz de multiplicar sua população mesmo em meio de cultura limitado por nitrogênio (3% de nitrato). Na condição com maior disponibilidade de nitrogênio (T1 – 750 mg.L⁻¹ nitrato, pH 9,5), a cepa apresentou o maior rendimento celular e taxa máxima de crescimento, com diferença altamente significativa comparada ao T5 (**Tabela 20**, **Figuras 9 e 10**).

Tabela 20. Fase de crescimento exponencial, taxa máxima de crescimento, tempo de duplicação e rendimento celular de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 em diferentes tratamentos (meio BG-11 modificado, fotoperíodo 12-12h luz-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$).

Tratamentos	Fase exponencial (dias)	Taxa máxima de crescimento (μ ; dia ⁻¹)	Tempo de duplicação (G; dias)	Rendimento celular 30 dias (R; células.mL ⁻¹)
Controle:				
3% NaNO ₃ , pH 9,5, 25°C	no	no	no	no
T.1: 50% NaNO ₃	9-15	0,33	2,09	5.519.083
T.2: 0% NaNO ₃	no	no	no	no
T.3: 30°C	no	no	no	no
T.4: 35°C	no	no	no	no
T.5: pH 10,5	9-15	0,27	2,56	2.352.417
T.6: pH 7,0	no	no	no	no

no = não obtido

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

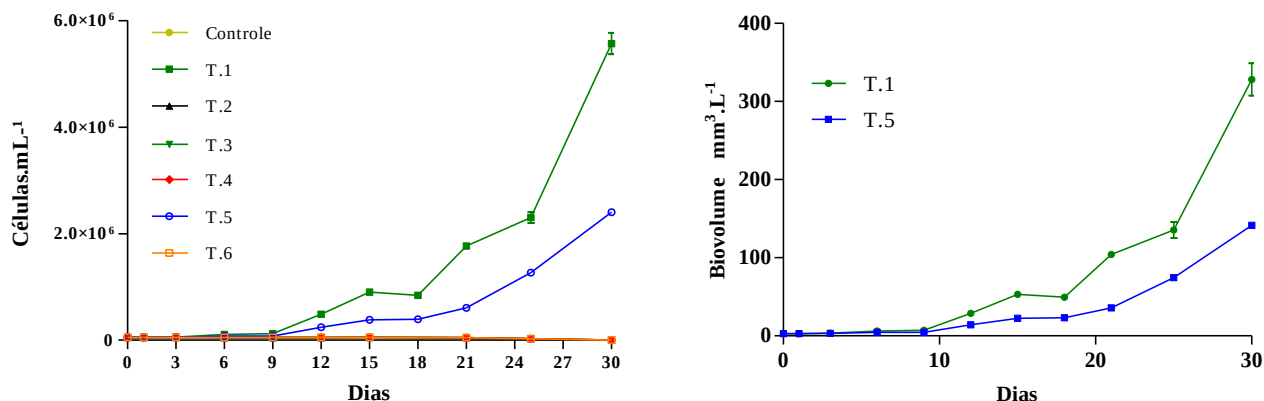


Figura 9. Curvas de crescimento de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 em diferentes tratamentos. Controle: BG-11 3% NaNO₃, Temp. 25°C e pH 9,5; T.1: BG-11 50% NaNO₃; T.2: BG-11 0% NaNO₃; T.3: Temp. 30°C; T.4: Temp. 35°C; T.5: pH 10,5; T.6: pH 7,0.

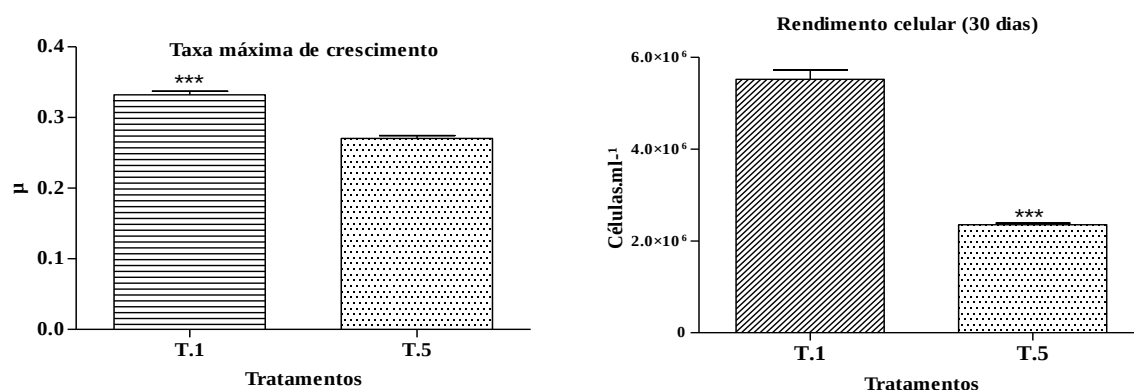


Figura 10. Taxa máxima de crescimento e rendimento celular de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 em diferentes tratamentos (meio BG-11 modificado, fotoperíodo 12-12h luz-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). T.1: BG-11 50% NaNO₃; T.5: pH 10,5.

A domin\u00e2ncia ocasional de *Arthrospira platensis* (n\u00e3o heterocitada) nas salinas da Nhecol\u00e2ndia pode indicar elevados valores de pH e/ou maior disponibilidade de nitrog\u00eanio nessas lagoas, desde que a ocorr\u00eancia da esp\u00e9cie foi restrita a valores de pH 9,2-10,2, condutividade el\u00e9trica 716-19020 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ e temperatura de 22,8-33,3°C (**Tabela 13**). Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos detalhados realizados por Iltis (1968, 1970, 1971) onde foi encontrado correla\u00e7\u00e3o entre a densidade da biomassa de *Arthrospira* e a salinidade (proporcional \u00e0 condutividade) das \u00e1guas de lagos alcalinos do leste da \u00c1frica (Chade). As flora\u00e7\u00f5es massivas de *Arthrospira fusiformis* foram encontradas em valores de

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

salinidade de 22-62 g.L⁻¹ (ups), pH 8,5-11,0 e temperatura 25-40°C (Iltis 1968, Vonshak & Tomaselli 2000).

Por outro lado, Tuite (1981) documentou declínio na densidade populacional de *Arthrospira* no período de elevação da condutividade em lagos alcalinos no leste da África.

Nossos resultados experimentais comprovaram que em pH altamente alcalino (10,5) o crescimento de *A. platensis* pode ocorrer mesmo em baixa concentração de nitrato (BG-11 3%, NaNO₃ 45 mg.L⁻¹), considerando que a cepa não apresentou crescimento em pH 7,0 e 9,5 na mesma concentração de nitrogênio disponível. No entanto, a maior taxa máxima de crescimento e rendimento celular foi observada na condição com maior disponibilidade de nitrato (BG-11 50%, NaNO₃ 750 mg.L⁻¹) em pH 9,5, e não houve crescimento na ausência de fonte nitrogenada (BG-11 0%), ou mesmo à 3% de nitrato em pH 9,5. Este resultado indica que tanto a disponibilidade de nitrogênio quanto o pH elevado influenciam o crescimento de *A. platensis*.

De acordo com Mourão (1989), os elevados valores de pH e a baixa razão Nitrogênio/Fósforo que ocorrem na lagoa Salina do Meio, são provavelmente os principais fatores limitantes para o crescimento de muitas espécies de algas e cianobactérias, visto que apenas 1% do nitrogênio presente nesta lagoa encontra-se na forma disponível para assimilação pelo fitoplâncton e, portanto, somente espécies adaptadas ou com estratégias para fixar outras formas nitrogenadas seriam capazes de se desenvolver neste ambiente extremo.

Na natureza, o nitrogênio pode ter se originado da lixiviação do solo com a água das chuvas e/ou das fezes das aves migratórias, do gado e animais silvestres que frequentam as lagoas salinas. Além desses fatores citados, a decomposição da biomassa da floração de *Anabaenopsis elenkinii* (heterocitada fixadora de nitrogênio que forma frequentes florações nas salinas) deve disponibilizar o nitrogênio necessário para o crescimento e posterior floração de *Arthrospira platensis* nas salinas do Pantanal. No entanto, a substituição da dominância de *Arthrospira platensis* por *Anabaenopsis elenkinii* e vice-versa nas salinas do Pantanal ainda não foi completamente entendida e somente estudos específicos com acompanhamento semanal ou diário *in situ* poderia ajudar a explicar este processo tão interessante.

Na África, ao longo das últimas três décadas o impacto da excessiva captação de água e a falta de cuidados com a eutrofização teve efeito marcante em alguns dos lagos do Vale Rift, onde *Arthrospira* comumente é encontrada em floração como resposta à acentuada

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

deterioração das características ambientais e aumento progressivo na concentração de nutrientes (Ballot *et al.* 2009, Sili *et al.* 2012). Os lagos Naivasha e Oloidien (Quênia) são exemplos típicos desta degradação e salinização recente que promoveram o aparecimento de *Arthrospira* (Ballot *et al.* 2009).

A modificação do Lago Oloidien originalmente de água doce para o estado hipereutrófico e alcalino provocou mudanças na dominância de espécies de Chlorophyceae cocóides para a dominância de *Arthrospira fusiformis* e *Anabaenopsis elenkinii*. As principais fontes de entrada de nutrientes neste lago são os rebanhos de gado e caprinos e os detergentes utilizados para lavagem de roupa no lago. Estes fatos indicam que o uso doméstico da água do Lago Oloidien está ameaçado pelas suas inadequadas condições físico-químicas (Ballot *et al.* 2009).

No Pantanal brasileiro, Malone *et al.* (2012) demonstraram que o efeito de alterações naturais e/ou antrópicas, que permitem a entrada de água doce nas lagoas salinas, descaracteriza a flora típica desses ambientes. Os autores enfatizaram ainda, que as características naturais de isolamento das salinas devem ser preservadas e que a composição da sua microflora é uma importante ferramenta para avaliar mudanças ecológicas nestes sistemas.

Além do pH, outros fatores como a disponibilidade de nitrogênio, luz, temperatura etc., possivelmente influenciam a dominância das cianobactérias nas lagoas salinas do Pantanal. A água da lagoa Salina do Meio é caracterizada pela baixa transparência (Disco de Secchi <0,10 m) resultando em uma estreita zona eufótica (Santos & Sant'Anna 2010). A baixa transparência é decorrente da combinação da alta densidade populacional fitoplanctônica e a presença de material inorgânico em suspensão proveniente do distúrbio do sedimento nestas lagoas rasas. De acordo com Vareschi & Jacobs (1985), o auto sombreamento é provavelmente o fator limitante mais importante para densidade e produção dos organismos fitoplanctônicos. Assim, este fator provavelmente desempenha papel importante na dinâmica do fitoplâncton nas lagoas salinas.

A co-ocorrência de *Arthrospira platensis* e *Anabaenopsis elenkinii* nas salinas da Nhecolândia parecem ser determinadas pelos elevados valores de pH (>9,5), condutividade (>2000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$), temperatura (25°C), disponibilidade de fósforo (>1500 mg.L^{-1}) e nitrato (>45 mg.L^{-1}) (Santos 2008, Santos & Sant'Anna 2010).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

A hipótese 1 de ecofisiologia levantada no presente estudo: “O crescimento de *Arthrospira platensis* está correlacionado positivamente com o aumento do pH, da concentração de nitrogênio e da temperatura” foi parcialmente confirmada. Ou seja, o crescimento de *A. platensis* foi relacionado com os maiores valores de pH (10,5) e concentração de nitrato (50%, NaNO_3 750 mg.L^{-1}) no meio de cultura, e, apenas a relação do crescimento com o aumento da temperatura (25, 30 e 35°C) não pode ser confirmada com os experimentos, visto que à 3% de nitrato não houve crescimento da espécie nas temperaturas testadas.

5.6. Prospecção de substâncias bioativas

5.6.1. Estudos biológicos

a) Ensaio bioautográfico para atividade inibidora da acetilcolinesterase

Os extratos metanólicos e em ácido acético de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 nos tratamentos 1 e 5 não apresentaram atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase (**Figura 14**).

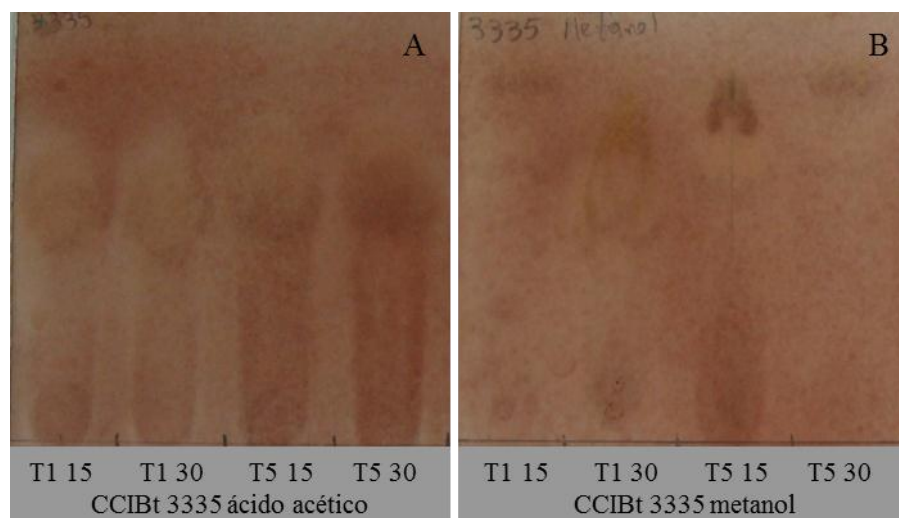


Figura 11. Cromatograma do extrato de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 revelado para detecção de atividade anticolinesterásica. **A.** Extrato em ácido acético nos tratamentos 1 (BG-11 50% NaNO_3 , pH 9,5) e 5 (BG-11 3% NaNO_3 , pH 10,5), nos dias 15 e 30 para cada tratamento. **B.** Extrato em metanol nos tratamentos 1 (BG-11 50% NaNO_3 , pH 9,5) e 5 (BG-11 3% NaNO_3 , pH 10,5), nos dias 15 e 30 para cada tratamento.

De acordo com Carvalho *et al.* (2013, no prelo), foi detectada atividade anticolinesterásica nos extratos metanólicos e em ácido acético de cinco cepas de

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

cianobactérias brasileiras: *Calothrix* sp. CCIBt3320, *Tolypothrix* sp. CCIBt3321, *Phormidium* cf. *amoenum* CCIBt3412, *Phormidium* sp. CCIBt3265 e *Geitlerinema splendidum* CCIBt3223, que causaram efeitos sistêmicos semelhantes aos descritos para substâncias terapêuticas (*in vivo*). Além disso, os referidos autores mostram que todos os extratos, com exceção de *G. splendidum*, apresentaram efeitos anticolinesterásicos reversíveis em camundongos. O caráter reversível da atividade do extrato é fundamental para ser considerado como potencial fonte de estudos para a produção de drogas terapêuticas (Singh *et al.* 2005). Compostos com ação anti acetilcolinesterase desempenham papel muito importante na busca de potenciais medicamentos contra a doença de Alzheimer. Esta doença neurodegenerativa é associada com déficit de neurotransmissores cerebrais e seu tratamento sintomático depende da restauração da função colinérgica pela inibição da acetilcolinesterase (Mastrantonio *et al.* 2008). Assim, a busca por cianobactérias que apresentam estes compostos torna-se importante.

b) Ensaios bioautográficos para atividade antifúngica (frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penz. CCIBt0491)

Os extratos em ácido acético (**Figura 12**) e metanólico (**Figura 13**) de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 apresentaram resultados positivos para atividade antifúngica para o fungo *Cladosporium sphaerospermum*.

Conforme observado na **Figura 12**, a atividade antifúngica apresentou efeito maior no 15º dia de cultivo (final da fase exponencial) quando comparado ao 30º dia (fase estacionária) tanto no tratamento 1 quanto no 5. Este resultado evidencia que a produção de compostos metabólicos capazes de inibir o crescimento do fungo (formação de halos claros na placa) é maior no final da fase exponencial. Este registro mostra ainda que para futuros estudos de isolamento desta (ou destas) substância potencialmente antifúngica, o cultivo da biomassa na condição com maior disponibilidade de nitrogênio (T1) durante 15 dias é o mais indicado para obtenção deste composto.

Em relação ao extrato metanólico, a atividade antifúngica ocorreu somente no tratamento 1, e a maior atividade neste extrato, também ocorreu no final da fase exponencial (**Figura 13**).

Estudos sobre a presença de compostos antifúngicos em determinado tipo de extrato e organismo são importantes contribuições científicas, que podem conduzir ao desenvolvimento

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

de tecnologias para futuramente empregá-los na prevenção e controle do fungo durante o transporte e armazenamento de alimentos e ou ainda, na sua aplicação em medicamentos.

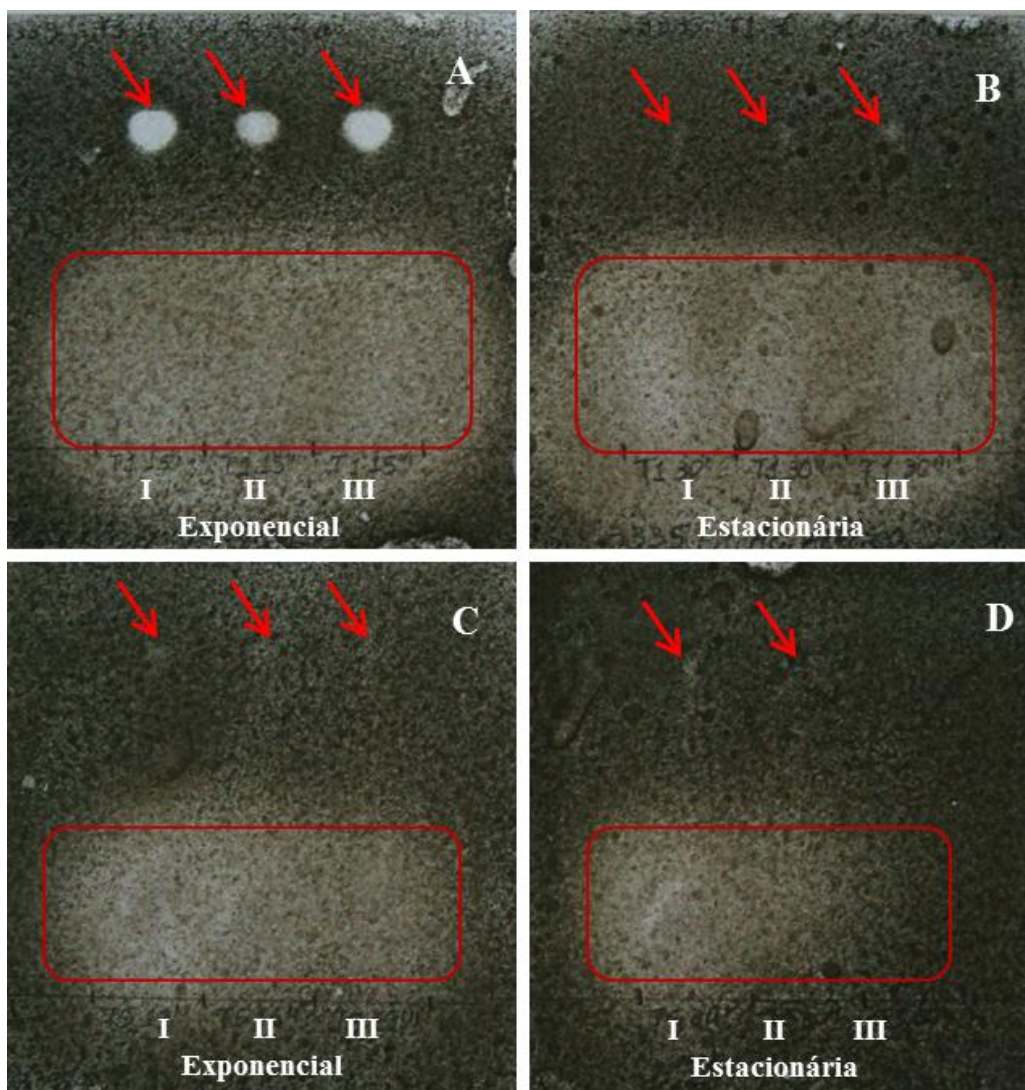


Figura 12. Atividade antifúngica (contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*) de extratos em ácido acético 0,1 M de *Arthrospira platensis* CCIBt3335. **A, B.** Tratamento 1 (BG-11 50% NaNO₃); **C, D.** Tratamento 5 (pH 10,5). Setas e quadros indicam região de ocorrência da atividade antifúngica.

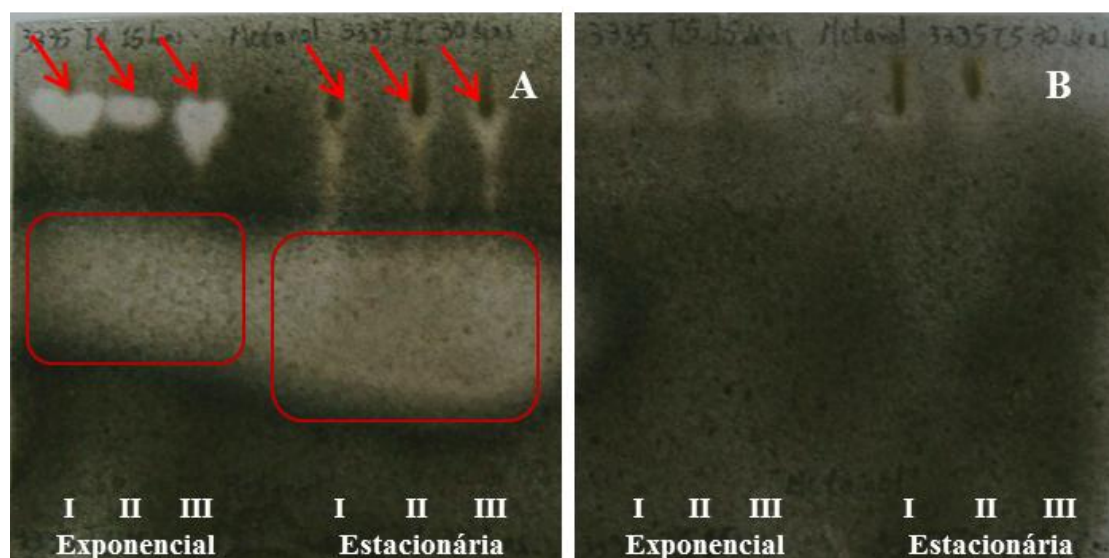


Figura 13. Atividade antifúngica (contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*) de extratos metanólicos de *Arthrospira platensis* CCIBt3335. **A.** Tratamento 1 (BG-11 50% NaNO_3); **B.** Tratamento 5 (pH 10,5). Setas e quadros indicam região de ocorrência da atividade antifúngica.

Souza *et al.* (2011) detectaram atividade antifúngica em extrato metanólico de *Arthrospira* (“*Spirulina*”) *platensis* isolada da Lagoa Mangueira (Rio Grande do Sul) contra *Aspergillus flavus* e indicaram que este extrato pode ser empregado como antifúngico natural quando for necessária a proteção de alimentos. Da mesma forma, a cepa do Pantanal possui potencial promissor para futuras aplicações desta atividade natural.

c) Teste de ação hemolítica

No presente estudo, os extratos em ácido acético de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 nos dois tratamentos testados (T.1 e T.5) apresentaram resultados negativos em sangue de camundongo (**Tabela 21**).

O teste de ação hemolítica é útil como indicador da toxicidade de cianobactérias em causar hemólise sanguínea. A hemólise ocorre devido aos danos causados nas membranas de eritrócitos através de um mecanismo de formação de poros, uma ação detergente ou uma atividade de lipase (Bi *et al.* 2011). Estudar a ocorrência de hemólise causada por cianobactérias pode facilitar a avaliação do seu impacto sobre a qualidade da água, sobre a morte de peixes (por afetar as brânquias), e abrir caminho sobre a pesquisa do impacto biológico e ecológico da hemolisina de cianobactérias na natureza (Liu *et al.* 2008).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 21. Teste de ação hemolítica com extratos em ácido acético de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 cultivada em diferentes tratamentos.

Tratamento	Dias de cultivo	Ação hemolítica
T.1 (BG-11 50%, NaNO ₃ a 750 mg.L ⁻¹), pH 9,5, temperatura 25°C.	15	-
	30	-
T.5 (BG-11 3%, NaNO ₃ a 45 mg.L ⁻¹), pH 10,5, temperatura 25°C.	15	-
	30	-

Até o presente, não há dados na literatura sobre atividade hemolítica produzida por espécies de *Arthrospira*. No entanto, para a cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 foi encontrada a produção da proteína hemolisina com potente atividade hemolítica em eritrócitos de coelho e ovelha (Liu *et al.* 2008). De acordo com Bi *et al.* (2011), a hemolisina produzida pela cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 também causou hemólise aos eritrócitos de ratos, mas não aos eritrócitos de humanos e peixe. Os referidos autores afirmam que são necessários mais estudos para determinar de forma mais precisa o processo empregado por esta hemolisina nos danos causados aos eritrócitos.

Considerando os resultados do presente estudo, concluímos que a hipótese ecofisiológica 2 foi confirmada, e a cepa *Arthrospira platensis* CCIBt3335 não produz cianotoxinas, mas apresenta outras atividades biológicas com potencial biotecnológico.

5.6.2. Estudos químicos

a) Prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante

O extrato em ácido acético de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 apresentou resultado positivo para atividade antioxidante (**Figura 14**). A atividade observada mostra que compostos antioxidantes são produzidos pela *A. platensis* e podem ser usados, após estudos mais detalhados, para prevenir, por exemplo, a oxidação em alimentos.

As cianobactérias possuem uma série de mecanismos de proteção e reparação enzimáticos e não enzimáticos antioxidantes como arsenal natural para proteger dos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), assim, elas apresentam imenso potencial para servir como fonte para a produção de substâncias antioxidantes (Richa & Sinha 2011).

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

A atividade antioxidante em extratos de cianobactérias foi documentada por diversos autores (Miranda *et al.* 1998, Estrada *et al.* 2001, Krishnaraj *et al.* 2012) e alguns estudos encontraram relação entre a atividade antioxidante e efeito anti-inflamatório, demonstrando que extratos com atividade antioxidante poderiam ser utilizados no tratamento de processos anti-inflamatórios (Romay *et al.* 2001, 2003, Raymundo *et al.* 2004).

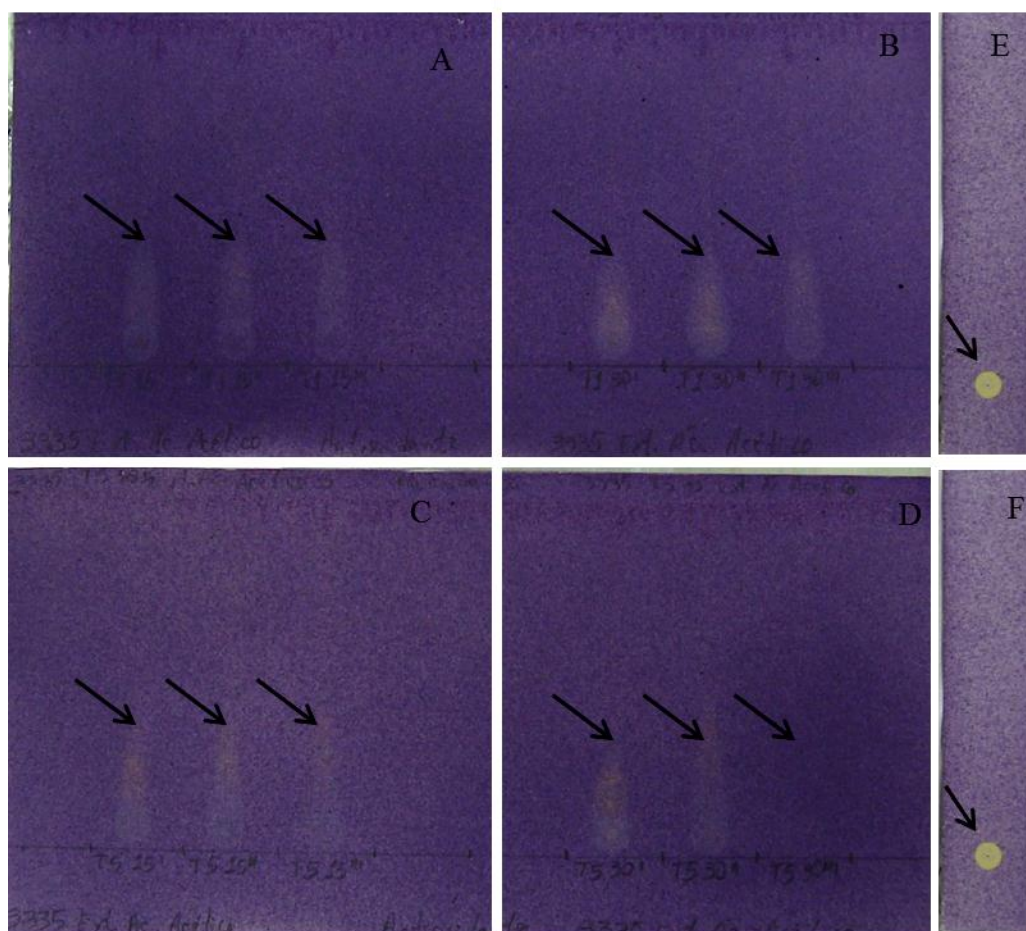


Figura 14. Cromatograma do extrato ácido acético de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 de placas reveladas com solução de DPPH. **A.** Tratamento 1 (BG-11 50% NaNO₃, pH 9,5), fase exponencial (15° dia). **B.** Tratamento 1, fase estacionária (30° dia). **C.** Tratamento 5 (BG-11 3% NaNO₃, pH 10,5), fase exponencial (15° dia). **D.** Tratamento 5, fase estacionária (30° dia). **E-F.** Cataquina usada como controle positivo. Setas indicam região da atividade antioxidante.

Existe interesse mundial em encontrar novos e seguros antioxidantes de fontes naturais como plantas e microorganismos para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar o dano oxidativo para as células vivas (Pratt 1992, Takamatsu *et al.* 2003). A

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

atividade antioxidante em extrato metanólico de *Arthrospira* (“*Spirulina*”) *maxima* foi documentada em literatura, e esta atividade é atribuída a presença abundante de β -caroteno, ácidos fenólicos, tocoferol e ficocianina (Miranda *et al.* 1998).

A pesquisa por novos antioxidantes de origem natural tem aumentado nos últimos 10-20 anos quando se descobriu que a produção de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo estavam envolvidos na etiologia de diversas doenças do envelhecimento, por exemplo, a Doença de Alzheimer, a qual está associada aos processos inflamatórios, onde as espécies reativas de oxigênio são liberadas com outros componentes (Tasdemir 2004). Assim, as espécies reativas de oxigênio são capazes de causar danos aos constituintes celulares e agir como mensageiro secundário do processo inflamatório. Com isso os antioxidantes são considerados muito importantes por serem capazes de sequestrar as espécies reativas de oxigênio e diminuir as vias inflamatórias, sendo úteis inclusive no tratamento da Doença de Alzheimer, em especial quando estão agregados ao potencial de inibição da Acetilcolinesterase (Tasdemir 2004, Stein 2012).

b) Análise qualitativa e quantitativa das microcistinas LR, RR, YR e LA, do L-BMAA e da saxitoxina utilizando a técnica de LC-MS/MS

Conforme determinado por LC-MS/MS, os extratos de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 apresentaram resultados negativos em todas os tratamentos testados para as microcistinas (LR, RR, YR e LA), para o L-BMAA e para saxitoxina (**Tabela 22, Figura 15**).

Apesar do antigo histórico de consumo humano de *Arthrospira* por comunidades astecas na região do Lago Texcoco no México e também na região do Lago Chade no continente Africano indicarem que este alimento seria seguro (Ciferri 1983, Salazar *et al.* 1998), recentes estudos realizados com cápsulas comercializadas de *Arthrospira* detectaram a presença de microcistinas (Gilroy *et al.* 2000). Além disso, Ballot *et al.* (2004, 2005) documentaram a produção de microcistina-YR e anatoxina-a para cepas de *Arthrospira fusiformis* isoladas de lagos alcalinos do Vale Rift na região do Quênia. Assim, diante do crescente aumento na demanda por alimentos seguros, a descoberta de cepas tóxicas de *Arthrospira* trouxe preocupação às indústrias produtoras de biomassa de *Arthrospira* e torna a busca por cepas não tóxicas um caminho fundamental para o desenvolvimento de produtos de origem natural sem riscos para saúde humana e animal.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Tabela 22. Resultado das análises em LC-MS/MS dos extratos em ácido acético 0,1 M de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 em diferentes tratamentos. ND: Analito não detectado; <LD: Abaixo do limite de detecção do método; TR: Tempo de retenção (minutos).

Composto analisado	TR (min.)	Amostras			
		T1_I 15° dia	T1_I 30° dia	T5_I 15° dia	T5_I 30° dia
Microc. RR	4,36	<LD	<LD	<LD	<LD
Microc. LA	5,08	<LD	<LD	<LD	<LD
Microc. LR	4,57	<LD	<LD	<LD	<LD
Microc. YR	4,54	<LD	<LD	<LD	<LD
L-BMAA	0,51	<LD	<LD	<LD	<LD
Saxitoxina	-	ND	ND	ND	ND

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

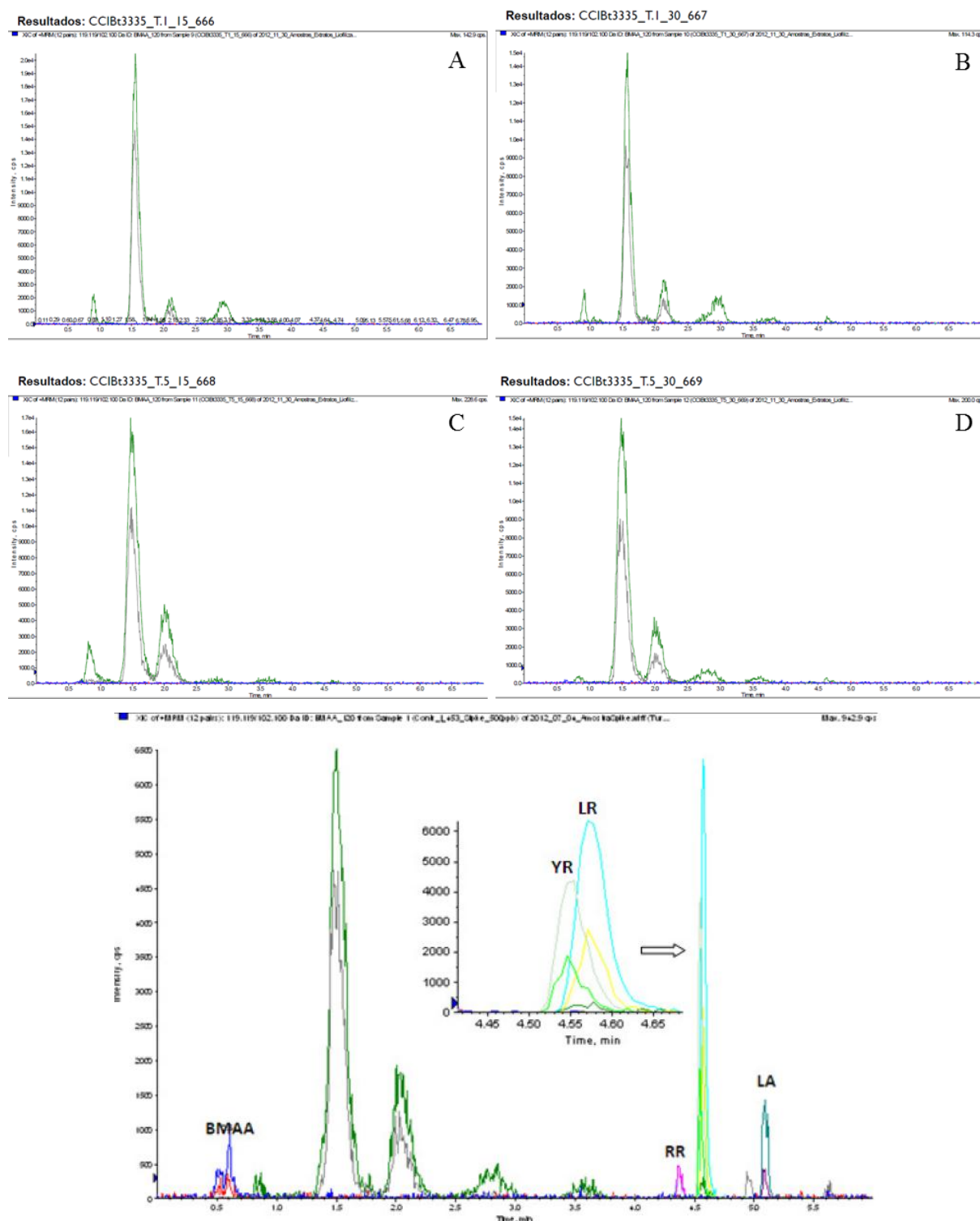


Figura 15. Cromatograma obtido para as amostras de extrato em ácido acético 0,1 M de *Arthrospira platensis* CCIBt3335. A, B. Tratamento 1 (BG-11 50% nitrato, pH 9,5) no 15° e 30° dia de cultivo, respectivamente. C, D. Tratamento 5 (BG-113% nitrato, pH 10,5) no 15° e 30° dia de cultivo, respectivamente. E. Padrões analíticos das microcistinas (LR, RR, YR e LA) e do L-BMAA.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

A técnica de LC-MS/MS é um dos métodos mais acurados e sensíveis para analisar e quantificar toxinas de cianobactérias. Este resultado negativo para *A. platensis* CCIBt3335 indica que esta cepa apresenta grande potencial de uso futuro em aplicações biotecnológicas, inclusive voltada para produção de biomassa livre de toxinas como suplemento alimentício para consumo humano e também para ração animal.

Considerando que os estudos e produção de biomassa de *Arthrospira* no Brasil utilizam basicamente cepas exóticas, provenientes de outros países como Estados Unidos e África, o presente estudo abre caminho para o uso de cepas isoladas do território brasileiro, com potencial para produção de biomassa nativa livre de toxinas.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

Referências Bibliográficas

- Aldea, R., Gutu, A., Nicoară, A. & Dragoș, N. 2002.** Genetic variation of *Arthrospira* (Spirulina) strain assessed by PCR techniques based on genomic repetitive sequences. *Contributi Botanice* 37:127-136.
- Almeida, T.I.R., Calijuri, M.C., Falco, P.B., Casali, S.P., Kupriyanova, E., Paranhos Filho, A.C.; Sigolo, J.B. & Bertolo, R.A. 2011.** Biogeochemical processes and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83: 391-407.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. 1988.** Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Algological Studies* 50-53: 327-472.
- Antelo, F. Costa, J. & Kalil, S. 2008.** Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 41:43-47.
- AOAC. 1990.** Paralytic shellfish poison. Biological method. Final action. In: K. Hellrich (Ed.), *Official methods of analysis* (15th ed.). Arlington, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists, Sec 959.08. pp. 881-882.
- Avila-Leon, I.A., Matsudo, M.C., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2012.** *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. *Journal of Applied Microbiology* 112: 1086-1094.
- Ballot, A., Kotut, K., Novelo, E. & Krienitz, L. 2009.** Changes of phytoplankton communities in Lakes Naivasha and Olkaria, examples of degradation and salinization of lakes in the Kenyan Rift Valley. *Hydrobiologia* 632:359–363.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C. & Pflugmacher, S. 2005.** Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4: 139-150.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S. Codd, G.A. & Pflugmacher, S. 2004.** Cyanobacteria and Cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya – Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal Plankton Research* 26: 925-935.
- Barbiero L., Rezende Filho, A., Furquim, S.A.C., Furian S., Sakamoto5, A.Y., Valles, V., Graham, R. C., Fort, M., Ferreira, R.P.D. & Queiroz Neto, J.P. 2008.** Soil morphological control on saline and freshwater lake hydrogeochemistry in the Pantanal of Nhecolândia, Brazil. *Geoderma* 148: 91-106.
- Barbiéro, L., Queiroz-Neto, J.P., Ciornei, G., Sakamoto, A.Y., Capellari, B., Fernandes, E. & Valles, V. 2002.** Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. *Wetland* 22: 528-540.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Barros, K. K. S. 2010.** Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana. 2010. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 111 p.
- Baurain, D., Renquin, L., Grubisic, S., Scheldeman, P., Belay, A. & Wilmotte, A. 2002.** Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ("Spirulina") (Cyanophyceae, Cyanobacteria). Strains from four continents and of recent and 30-years old samples from Africa. *Journal of Phycology* 38: 384–393.
- Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Converti, A., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2008.** Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 297-305.
- Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Converti, A., Sato, S., Perego, P., Converti, A. & Carvalho, J.C.M. 2012.** Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: bioenergetic aspects. *Biomass & Bioenergy* 37: 309-317.
- Bi, S., Wang, W., Zhao, Y., Ru, S. & Liu, Y. 2011.** Studies on hemolysis of hemolysin produced by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Ocean University of China* 10(4): 362-368.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1518.
- Busson, F. 1971.** *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler et *Spirulina geitleri* De Toni, Cyanophycées Alimentaires. Service de Santé, Marseille.
- Callegari-Jacques, S.M. 2003.** Bioestatística: princípios e aplicações. Artmed, Porto Alegre, 256p.
- Carvalho, J.C.M., Francisco, F.R., Ameida, K.A., Sato, S. & Converti, A. 2004.** Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. *Journal of Phycology* 40(3): 589-597.
- Carvalho, L.R., Costa-Neves, A., Conserva, G.A.A., Brunetti, R., Hentschke, G.S., Malone, C.F.S., Torres, L.M.D., Sant'Anna, C.L. & Rangel, M. 2013.** "Biologically active compounds from Cyanobacteria extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects". *Revista Brasileira de Farmacognosia* (no prelo).
- Castro, R.D. & Lima, E.O. 2011.** Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13(2): 203-208.
- Choi, G.G., Ahn, C.Y & Oh, H.M. 2012.** Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-IGS sequences. *Algae* 27(2): 75-82
- Chopra, K. & Bishnoi, M. 2008.** Antioxidant profile of *Spirulina*: A blue-green microalga. *In: Spirulina in human nutrition and health*. Edited by M.E. Gershwin and Amha Belay, CRC Press, Taylor & Francis Group, 101-118.
- Ciferri, O. 1983.** *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiology Reviews* 47: 551-578.
- Costa, J.A.V., Bertolin, T.E., Colla, L.M., Giacominni, A.C., Bavaresco, C. & Pilatti, D. 2009.** Effect of Microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 1253-1259.
- Costa, J.A.V., Colla, L.M. & Reinehr, C.O. 2007.** Production of biomass and nutraceuticals compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology* 98: 1489-1493.
- Costa, J.A.V., Colla, L.M., Bertolin, T.E., Reinehr, C.O. & Ambrosi, M.A. 2008.** Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 29: 109-117.
- Costa, J.A.V., Furlong, E.B., Machado, V.G., Bierhals, V.S., Echevengúá, W.O. & Santos, A.S. 2010.** Estudo da conservação de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. *Brazilian journal of food technology* 13: 75-82.
- Costa, J.A.V., Bertolin, T.E., Colla, L.M. & Guarienti, C. 2011.** Viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* tratada com *Spirulina platensis*. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano* 6: 115-121.
- Costa, J.A.V., Furlong, E.B. & Bierhals, V.S. 2009.** Compostos fenolicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 68: 42-48.
- Dadheech, P.K., Ballot, A., Casper, P., Kotut, K., Novelo, E., Lemma, B., Pröschold, T. & Krienitz, L. 2010.** Phylogenetic relationship and divergence among planktonic strains of *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) of African, Asian and America origin deduced by 16S-23S ITS and phycocyanin operon sequences. *Phycologia* 49(4): 361-372.
- Dangeard, P. 1940.** Sur une algue bleue alimentaire pour l'homme: *Arthrospira platensis* (Nordst.) Gomont. *Act Soc Linn Bordx* 91: 39-41.
- Desikachary, T.V. & Jeeji-Bai, N. 1992.** Taxonomic studies in *Spirulina*. In: C.V. Seshradi, N. Jeeji-Bai (eds.). *Spirulina* ETTA National Symposium, pp. 12-21.
- Desikachary, T.V., Jeeji-Bai, N. 1996.** Taxonomic studies in *Spirulina*. II. The identification of *Arthrospira* ("Spirulina") strains and natural samples of different geographical origins. *Algological Studies* 83: 163-168.
- Donato, N.R., Costa, M.J.C., Barbosa, M.Q., Bion, F.M., Carvalho Filho, E.V., Veras, R.C., Medeiros, I.A. & Silva, J.A. 2010.** Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição protéica. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 69: 69-77.
- El-Bestawy, E., Bellinger, E.G. & Sigee, D.C. 1996.** Elemental composition of phytoplankton in a subtropical lake: X-ray microanalytical studies on the dominant algae *Spirulina platensis* (Cyanophyta) and *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology* 31: 157-166.
- Estrada, J.E., Bescós, P., Villar Del Fresno, A.M. 2001.** Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco* 56:497-500.
- Ewing, B. & Green, P. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Falquet, J. & Hurni, J.P. 2007. *Spiruline: bibliographie scientifique (1966–2006)*. Antenna Technologies Suisse.
- Farrar, W.V. 1966. Tecuitlatl: a glimpse of Aztec food technology. *Nature* 211: 341-342.
- Fathi, A.A., Abdelzaher, A., Flower, R.J., Ramdani, M. & Kraïem, M.M. 2001. Phytoplankton communities of North African wetland lakes: the CASSARINA Project. *Aquatic Ecology* 35: 303-318.
- Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Converti, A., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2012. Kinetic and growth parameters of *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivated in tubular photobioreactor under different cell circulation systems. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 444-450.
- Fiore, M.F., Moon, D.H., Tsai, S.M., Lee, H. & Trevors, J.T. 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 39: 159-169.
- Fogg, G.E. & Thake, B.A. 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*. 3 ed. The University of Wisconsin Press, London, 269p.
- Fox, R.D. 1996. *Spirulina* production and potential. Edisud, Aix-en-Provence.
- Furquim, S.A.C., Barbiéro, L., Robert, G., Queiroz Neto, J.P., Ferreira, R.P. & Furian, S. 2010. Neoformation of micas in soils surrounding an alkaline-saline lake of Pantanal wetland, Brazil. *Geoderma* 158: 331-342.
- Furquim, S.A.C., Robert, G., Barbiéro, L., Queiroz Neto, J.P. & Valles, V. 2008. Mineralogy and genesis of smectites in an alkaline-saline environment of Pantanal wetland, Brazil. *Clays and Clay Minerals* 56: 580-596.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L. & Muyzer, G. 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3284-3291.
- Gardner, N.L. 1917. *New Pacific coast marine algae I*. University of California Publications in Botany 6: 377-416.
- Geitler, L. 1925. Cyanophyceae. In: A. Pascher (ed.) *Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz*, v. 12. Gustav Fischer Verlag, Jena, 450 p.
- Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. In: Rabenhorst's *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Aufl. Leipzig, v. 14, Akademische Verlagsgesellschaft, 1196p.
- Gilroy, D.J., Kauffman, K.W., Hall, R.A., Huang, X & Chu, F.S. 2000. Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green. *Environmental Health Perspectives* 108(51): 435-439.
- Gomont, M.M. 1982. *Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocytées)*. Annales Sciences Naturelles Botanique. Sér. 7, Paris, v.16, p.91-264.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195-202.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Guarienti, C., Bertolin, T.E. & Costa, J.A.V. 2010.** Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 69: 56-62.
- Hamilton, S., Sippel, S.S.J., Calheiros, D.F. & Melack, J. 1999.** Chemical Characteristics of Pantanal Waters. *In: Anais Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal 2*, Corumbá, MS. Manejo e Conservação. Embrapa Pantanal, Corumbá, pp. 89-100.
- Harada, K.I., Kondo, F. & Lawton, L. 1999.** Laboratory analysis of cyanotoxins. *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. 369-405.
- Hindák, F. 1985.** Morphology of trichomes in *Spirulina fusiformis* Voronichin from Lake Bogoria, Kenya. *Algological Studies* 38(39): 209-218.
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kastovsky, J. 2005.** System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) – state in 2004. *Algological Studies* 117: 95-115.
- Homans, A.L., Fuchs, A. 1970.** Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* 51(2): 327-329.
- Hongsthong, A., Sirijuntarut, M., Prommeenate, P., Thammathorn, S., Bunnag, B., Cheevadhanarak, S. & Tanticharoen, M. 2007.** Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. *Molecular Biotechnology* 36: 123–130.
- Hostettmann, K., Queiroz, E. F. & Vieira, P. C. 2003.** Princípios ativos de plantas superiores. v. 4. EdUFSCar, São Carlos, 152p.
- Iltis, A. 1968.** Tolérance de salinité de *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler, (Cyanophyta) dans les mares natronées du Kanem (Tchad). *Hydrobiology* 2: 119–125.
- Iltis, A. 1969.** Phytoplankton des eaux natronées du Kanem (Tchad). I. Les lacs permanents a Spirulines. *Hydrobiololy* 3: 29–44
- Iltis, A. 1970.** Phytoplankton des eaux natronées du Kanem (Tchad). III. Variations annuelles du plancton d'une mare temporaire. *Hydrobiololy* 4:53–59
- Iltis, A. 1971.** Phytoplankton des eaux natronées du Kanem (Tchad). V. Les lacs mésohalins *Hydrobiol* 5:73–84.
- Iltis, A. 1972.** Algues des eaux natroné du Kanem (Tchad). Primo. Première saltie. *Hydrobiology* 4:129–134.
- Iwasa, M., Yamamoto, M., Tanaka, Y., Kaito, M. & Adachi, Y. 2002.** *Spirulina*-associated hepatotoxicity. *The American Journal of Gastroenterology* 97: 3212–3213.
- Jassby, A. 1988.** *Spirulina*: A model for microalgae as human food. *In: Lembi, C.A. & Waaland, J.R. (eds). Algae and Human Affairs.* Cambridge University Press, Cambridge, p. 149-179.
- Jeeji-Bai, N. 1999.** A taxonomic revision of the genus *Arthrospira* based on certain new criteria. *In: Marine cyanobacteria* (L. Charpy, & A.W.D. Larkum, eds.). *Bulletin of the Institute Oceanography. Monaco, special issue* 19:47-52.
- Jenkin, P. M. 1929.** **Biology of lakes in Kenya. *Nature* 3128: 574.**

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Johnson, R.C.; Zhou, Y.; Statler, K.; Thomas, J.; Cox, F.; Hall, S.; Barr, J.R. 2009.** Quantification of saxitoxin and neosaxitoxin in human urine utilizing isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 33: 8-14.
- Kebede, E. & Ahlgren, G. 1996.** Optimum growth conditions and light utilisation efficiency of *Spirulina platensis* (equal *Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia* 332: 99–109.
- Kim C.J., Jung, Y.H. & Oh, H.M. 2007.** Factors indicating culture status during cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *The Journal of Microbiology* 45: 122-127.
- Komárek & Komárková-Legnerová 2002.** Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia* 74: 207-233.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005.** Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales. *In*: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 19/2. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, pp.1-759.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005.** Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales. *In*: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 19/2. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, pp.1-759.
- Komárek, J. & Lund, J.W.G. 1990.** What is “*Spirulina platensis*” in fact? *Algological Studies* 58:1-13.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J. S., Codd, G. A. and Pflugmacher, S. 2003.** Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 141–148.
- Krishnaraj, R.N., Babu, S.V., Ashokkumar, B., Malliga, P. & Varalakshmi, P. 2012.** Antioxidant Property of fresh and marine water cyanobacterial extracts in Swiss mice. *Journal of Biopesticides* 5: 250-254.
- Lacaz-Ruiz, R. & Mós, E.N. 1990.** Produção de biomassa de *Spirulina* spp. para alimentação humana e animal. *Revista Brasileira de Microbiologia* 21(1): 85-97.
- Lacaz-Ruiz, R. & Kiyan, C. 1996.** Utilisation de cendres dans le milieu de culture pour *Spirulina platensis*. *Phyton - International Journal of Experimental Botany* BA Argentina 59(1/2): 33-37.
- Lacaz-Ruiz, R. 2003.** *Espirulina*. 1 ed. São Paulo: Roca, v. 1. 296p .
- Lacaz-Ruiz, R., Kornfeld, M.E. & Zanetti, M. A. 1993.** *Spirulina* grown on citrus industry effluent. *Cyanonews* 9(2): 1-3.
- Lacaz-Ruiz, R., Shiroma, N.N., Carlquist, T.A. & Lima, F.R. 1999.** Evaluation of culture media for *Spirulina* spp. using a minimum cost formulation program. *Phyton - International Journal of Experimental Botany* BA Argentina 65: 77-81.
- Léonard, J. & Compère, P. 1967.** *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en protéines. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 37:1–23.
- Lepère, C., Wilmotte, A. & Meyer B. 2000.** Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants* 70: 275-283.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Lewin, R.A. 1980.** Uncoiled variants of *Spirulina platensis* (Cyanophyceae: Oscillatoriaceae). *Algological Studies* 26:48–52.
- Liu, Y., Wang, W., Ru, S. & Zhao, Y. 2008.** Evidence for the production of a proteinaceous hemolytic exotoxin by wild-type strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology* 20: 89-95.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & Le Cren, E.D. 1958.** The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143–170.
- Magrin, A.G.E., Senna, P.A.C. & Komárek, J. 1997.** *Arthrospira skujae*, a new planktic tropical cyanoprokaryote. *Archiv für Protistenkunde* 148(4): 479-489.
- Malone C.F.S, Santos K.R.S. & Sant’Anna C.L. 2012.** Algas e cianobactérias de ambientes extremos do Pantanal brasileiro. *Oecologia Australis* 16(4): 784-794.
- Manen, J.F. & Falquet, J. 2002.** The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 861–867.
- Mao, Y.X., Yang, G.P., Zhang, B.H., Zhang, X.C. 2001.** Application of the sequences analysis of the 16S rRNA gene and ITS of 16S-23S rRNA to the systematic study of the genus *Arthrospira* and *Spirulina*. *High Technology Letters* 11: 12–18.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K. 2002.** A rapid TLC bioautographic method for detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.
- Mastrantonio, G., Mack, H.G. & Omar D.V.C. 2008.** Interpretation of the mechanism of acetylcholinesterase inhibition ability by organophosphorus compounds through a new conformational descriptor. an experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Modeling* 14: 813-821.
- Matsudo, M.C., Bezerra, R.P., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. 2011.** CO₂ from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. *Biotechnology Progress* 27: 650-656.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knaapp, S., Marhold, K., Prado, J. , Prud’Homme Van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H. & Turland, N.J. 2012.** International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. (Regnum Vegetabile, 154). Hardcover.
- Medina-Júnior, P.B. & Rietzler, A. C. 2005.** Limnological study of a Pantanal saline lake. *Brazilian Journal of Biology* 65(4): 651-659.
- Melack, J.M. 1979.** Photosynthesis and growth of *Spirulina platensis* (Cyanophyta) in an equatorial lake (Lake Simbi, Kenya). *Limnology Oceanography* 24(4): 753–760.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Milne I., Lindner D., Bayer M., Husmeier D., McGuire G., Marshall D.F. & Wright F. 2008.** TOPALI v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25(1): 126-127.
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M., & Mancini-Filho, J. 1998.** Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31(8): 1075-1079.
- Montgomery, D.C. 1991.** Introduction to Statistical Quality Control, 2nd ed. John Wiley & Sons, New Yourk, NY.
- Morais, M.G., Reichert, C.C., Dalcanton, F., Durante, A.J. Marins, L.F. & Costa, J.A.V. 2008.** Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. *Z Naturforsch* 63c: 144-150.
- Morais, M.G., Stillings, C., Dersch, R., Rudisile, M., Pranke, P., Costa, J.A.V. & Wendorff, J. 2010.** Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Bioresource Technology* 101: 2872-2876.
- Morocho-Jacome, A.L., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. 1986.** Kinetic and thermodynamic investigation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* fed-batch cultivation in a tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87: 1574-1583.
- Mourão, G.M. 1989.** Limnologia comparativa de três lagoas (duas “Baías” e uma “Salina”) do Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
- Mourão, G.M., Ishii I.H. & Campos, Z.M.S. 1988.** Alguns fatores limnológicos relacionados com a ictiofauna de baías e salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Acta Limnológica Brasiliensia* 2: 181-198.
- Mühling M., Somerfield P.J., Harris N., Belay A. & Whitton, B.A. 2006.** Phenotypic analysis of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains (cyanobacteria). *Phycologia* 45(2): 148–157.
- Mullins, T., Britschgi, T.B., Krest, R.L. and Giovannoni, S.J. 1995.** Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 40: 148-158.
- Mussagy, A., Wilmotte, A. & Cronberg, G. 2006.** The cyanophyte *Arthrospira fusiformis* from Mozambique, Africa: morphological and molecular characterization. *Algological Studies* 121: 59-73
- Navacchi, M.F.P., Carvalho, J.C.M., Takeuchi, K.P. & Danesi, E.D.G. 2012.** Development of cassava cake enriched with its own bran and *Spirulina platensis*. *Acta Scientiarum. Technology* 34: 465-472.
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall ,L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. & Goodman, A.E. 1997.** rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:693-697.
- Nelissen, B., Wilmotte, A., Neefs, J.M. & De Wachter, R. 1994.** Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 17: 206-210.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Nogueira, I.S., Nabout, J.C., Oliveira, J.E. & Silva, K.D. 2008.** Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. *Hoehnea* 35:219-233.
- Nübel, U., Garcia Pichel, F. & Muyzer, G. 1997.** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327-3332.
- Oberholster, P.J., Botha, A.M., Ashton, P.J. 2009.** Appearance of new taxa: invertebrates phytoplankton and bacteria in a alkaline, saline, meteorite crater lake, South Africa. *Fundamental and Applied Limnology* 173: 271-282.
- Padisák, J. 1997.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archive Hydrobiology* 107(4): 563-593.
- Pelizer, L.H., Danesi, E.D.G., Rangel, C.O., Sassano, C.E.N., Carvalho, J.C.M., Sato, S., Moraes, I.O. 2003.** Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering* 56(4): 371-375.
- Pinho, M., Torres, R.C.O. & Sant'anna, E.S. 2010.** Fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) spp. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* 28: 159-168.
- Pratt D.E. 1992.** Natural antioxidants from plant material. In: Huang MT, Ho CT & Lee CY (eds.), *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health. II.* American Chemical Society, Washington, 54-71 (ACS Symposium Series, 507).
- Pratt, D.E. 1992.** Natural antioxidants from plant material. In: M.T. Huang, C.T. Ho & C.Y. Lee (eds.). *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II.* American Chemical Society, Washington, pp. 54-71.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Mono, M., Frenk, E. & Hostettmann, K. 1994.** Antifungal test in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Medica* 60: 41-44.
- Rangel, M., Malpezzi, E.L.A., Usini, S.M.M. & Freitas, J.C. 1997.** Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* 35(2): 305-309.
- Raymundo, M.S., Horta, P. & Fett, R. 2004.** Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40(4): 495-503.
- Rich, F. 1931.** Notes on *Arthrospira platensis*. *Revue Algologique* 6: 75-82.
- Richa, M.K. & Sinha, R.P. 2011.** Antioxidants as natural arsenal against multiple stresses in cyanobacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(2): 168-187.
- Rippka, R. & Herdman, M. 1992.** Catalogue of strains. Pasteur culture collection of cyanobacterial strains in axenic culture. Institut Pasteur, Paris, 103 p.
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Carvalho, J.C.M., Lodi, A., Finocchio, E., Converti, A. 2012.** Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* and *Chlorella vulgaris*: multi-metal systems. *Journal of Hazardous Materials* 217-218: 246-255.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Romay, C., Ramirez, D. & González, R. 2001.** Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 20(1): 38-41.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Ramirez, D. & Rimbau, V. 2003.** C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein and Peptide Science* 4: 207-216.
- Sadique, J., Chandra, T. & Thenmozhi, T. 1987.** Biochemicals modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicatum* in inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 19: 213-219.
- Salazar, M., Martinez, E., Madrigal, E., Ruiz, L. E. & Chamorro, G.A. 1998.** Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 235-241.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Luna, L.D., Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Sato, S., Converti, A., Carvalho, J.C.M. 2007.** Influence of pH, Temperature and Urea Molar Flowrate on *Arthrospira platensis* Fed-Batch Cultivation. A kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnology and Bioengineering* 96: 702-711.
- Sant'anna, C.L., Branco, L.H.Z., Gama Jr, W.A. & Werner, V.R. 2011.** Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. *Biota Neotropica* 11: 1-47.
- Santos, K.R.S. & Sant'Anna, C.L. 2010.** Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33(1): 61-83.
- Santos, K.R.S. 2008.** Biodiversidade de algas e cianobactérias de três lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Santos, K.R.S., Rocha, A.C.R. & Sant'Anna, C.L. 2012.** Diatoms from shallow lakes in the Pantanal of Nhecolândia, Brazilian wetland. *Oecologia Australis* 16(4): 795-808.
- Sassano, C.E.N., Gioielli, L.A., Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Sato, S., Converti, A. & Carvalho, J.C.M. 2010.** Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass & Bioenergy* 34: 1732-1738.
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B.A., Belay, A. & Wilmotte, A. 1999.** *Arthrospira (Spirulina)* strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters* 172: 213-222.
- Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., Gonzalez, H., Moret, J. & Naranjo, L. 2011.** A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. *Cyanobacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(5): 1045-1053.
- Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., Gonzalez, H., Moret, J. & Naranjo, L. 2011.** A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. *Cyanobacteria. World Journal Microbiology. Biotechnology* 27(5): 1045-1053.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Seto, Y. & Kataoka, M.K. 2005.** Mass spectrometric strategy for the determination of natural and synthetic organic toxins. *Journal of Health Science* 51(5): 519-525.
- Sili, C., Giuseppe, T. & Vonshak, A. 2012.** *Arthrospira (Spirulina)*. In: Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Brian A. Whitton (ed.). School of Biological & Biomedical Sciences, Durham University, UK, pp 677-705.
- Singh, S., Kate, B.N. & Banerjee, U.C. 2005.** Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25(3): 73-95.
- Souza, M.M., Prietto, L., Ribeiro, A.C., Souza, T.D. & Furlong, E.B. 2011.** Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1050-1058.
- Souza, T.M., Severi, J.A., Silva, V.Y.A., Santos, E. & Pietro, R.C.L.R. 2007.** Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28(2): 221-226.
- Springer Link (<http://link.springer.com/>)
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. 1971.** Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35, 171-205.
- Stein, E. M. 2011.** Avaliação das atividades biológicas e composição química dos extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Takamatsu, S., Hodges, T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M.T. & Nagle, D.G. 2003.** Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products* 66(5): 605-608.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tasdemir1, D., Dönmez, A.A., Çalı, I. & Rüedi1, P. 2004.** Evaluation of Biological Activity of Turkish Plants. Rapid Screening for the Antimicrobial, Antioxidant, and Acetylcholinesterase Inhibitory Potential by TLC Bioautographic Methods. *Pharmaceutical Biology* 42(4-5): 374–383.
- Thein, M. 1993.** Production of *Spirulina* in Myanmar. *Bulletin de l'Institut Oceanographique* 12: 175-178.
- Tomaselli, L. 1997.** Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: A. Vonshak (ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor and Francis, London, pp. 79-99.
- Torres, R.C.O., Krestchmar, M., Ogliari, P. J. & Sant'anna, E.S. 1998.** Growth of *Spirulina maxima* using rice straw ashes as culture medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 29(1): 7-11.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Tseng, C.T. & Chang, T.P. 1990.** Ultrastrukturen von vier ` *Spirulina* ' - Arten. *Algological Studies* 60: 33-41.
- Tuite, C.H. 1981.** Standing crop densities and distribution of *Spirulina* and benthic diatoms in East African alkaline saline lakes. *Freshwater Biology* 11: 345–360.
- Utermohol, H. 1958.** Zur vervollkommenung der quantitativen phytoplankton methoden. *Mitteilungen. Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-38.
- Vareschi, E. & Jacobs, J. 1985.** The ecology of Lake Nakuru (Kenya). VI. Synopsis of production and energy flow. *Oecologia* 65: 412-424.
- Vareschi, E. 1982.** The ecology of lake Nakuru (Kenya). III. Abiotic factors and primary production. *Oecologia* 55:81–101.
- Vieira, D.C.M., Matsudo, M.C., Sato, S., Converti, A. & Carvalho, J.C.M. 2012.** Simultaneous use of urea and potassium nitrate for *Arthrospira* (*Spirulina*) platensis cultivation. *Biotechnology Journal* 7: 649-655.
- Viti, C, Ventura, S., Lotti, F., Capolino, E., Tomaselli, L. & Giovannetti, L. 1997.** Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis. *Research in Microbiology* 148: 605-611.
- Vonshak, A. & Tomaselli, L. 2000.** *Arthrospira* (*Spirulina*): Systematics and ecophysiology. *In: B.A. Whitton & M. Potts (eds.). The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 505–522.
- Vonshak, A., Abielovich, A., Boussiba, S., Arad, S. & Richmond, A. 1982.** Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass* 2: 175–185
- Vonshak, A., Boussiba, S., Abielovich, A. & Richmond, A. 1983.** Production of *Spirulina* biomass: maintenance of monoalgal culture. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 341–351.
- Voronichin, N.N. 1934.** Biologie des bassins mineral des steppes Koulondine. Expedition de l'Academie des Sciences d'URSS 1931–1933 I. Leningrad. Trav Soviet pour serv l'étude ressource natur. Sér Sibirie 8: 182–183.
- Werner, V.R., Cabezudo, M.M., Neuhaus, E.B., Azevedo, M.T.P., Galina, L., Sant'Anna, C.L. 2013.** Cyanophyceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB107919>)
- Weyl, P.K. 1964.** On the changes in electrical conductance of sea-water with temperature. *Limnology and Oceanography* 9: 75-78.
- Williams, S. 1984.** Paralytic shellfish poison. *In: Official Methods of Analysis: 344-345, 14th Ed.* AOAC, Arlington, VA, Sections 18.086-18.0892.
- Wilmotte, A., Stam, W. & Demoulin, V. 1997.** Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. III. DNA-DNA hybridization studies and taxonomic conclusions. *Algological Studies* 87: 11-28.

CAPÍTULO 2 - *Arthrospira*

- Wolkman, H., Imianovsky, U. ; Oliveira, J.L.B., Furlong, E.B. & Sant'anna, E.S. 2007.** Use of desalinator wastewater for cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Fatty acids profile. *Grasas y Aceites* 58: 396-401.
- Wolkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L.B. & Sant'anna, E.S. 2008 .** Cultivation of *Arthrospira* (*spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: Protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 98-101.
- Zar, J.H. 1999.** Biostatistical analysis. 4^a Ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zarrouk, C. 1966.** Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner) Geitler. Ph D thesis, University of Paris, France.
- Zheng, X.Y., Zhang, M.G., Dong, Y.H., Gao, Z.H., Xu, C., Han, Z.M., Zhang, B.Z., Sun, D.P. & Wang, K.J. 1992.** Salt lakes in Inner Mongolia. Science press, Beijing, pp. 41–266.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*



CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e distribuição geográfica de *Anabaenopsis*

Os primeiros táxons reconhecidos na literatura como pertencentes ao gênero *Anabaenopsis* (Woloszynska) Miller foram descritos por West (1907) como *Anabaena flos-aquae* var. *circularis* G.S. West e *Anabaena tanganyikae* G.S. West (atualmente sinônimos de *Anabaenopsis cunningtonii* Taylor 1932 e *Anabaenopsis tanganyikae* (G.S. West) Miller, respectivamente) e foram coletados no plâncton do lago Tanganica, leste da África. Ao estudar populações similares da Indonésia (Java), Woloszyńska (1912) reconheceu a estratégia especial de desenvolvimento do heterocito e estabeleceu a nova seção “*Anabaenopsis*” dentro do gênero *Anabaena*. Posteriormente, Miller (1923) transferiu a seção proposta por Woloszyńska para o status de gênero e designou *Anabaenopsis elenkinii* Miller a espécie tipo do gênero.

De acordo com Komárek (2005), todas as cerca de 20 espécies de *Anabaenopsis* descritas são planctônicas, a maioria pode formar florações e apresentar facultativamente aerótopos. A maioria dessas espécies ocorre em lagos e lagoas com altas concentrações de sais (salobras, alcalinas, salinas, “soda lakes” ou “salty lakes”) e regiões estuarinas (Jeeji-Bai 1980, Komárek 2005, Ballot *et al.* 2008).

Anabaenopsis elenkinii foi descrita a partir de uma floração em um empoçado temporário (?) próximo à cidade de Iwanovo, na região central da Rússia (Miller 1923). A partir da proposição do gênero (Miller 1923), numerosas espécies foram descritas para o plâncton de lagos e reservatórios com águas alcalinas, mineralizadas ou mais ou menos ricas em sais, principalmente de países da África e regiões quentes da Eurásia (Komárek 2005).

A. elenkinii pode desenvolver florações e é frequentemente encontrada em lagoas rasas alcalinas (pH 9-11) e salobras de regiões tropicais, como o Pantanal brasileiro (Santos & Sant'Anna 2010, Malone *et al.* 2012), o Leste Africano (Quênia e Uganda), México - Lago Texcoco (Ballot *et al.* 2008), no Uruguai (UNESCO 2009), durante o verão na Ásia central, Turcomenistão, Mar Cáspio, República Tcheca, Hungria, Rússia (sul e central), Ucrânia (Komárek 2005), Lago Erie nos Estados Unidos (Smithi 2010) e Lago Langer na Alemanha (Ballot *et al.* 2010).

A principal característica morfológica que distingue o gênero *Anabaenopsis* dos gêneros mais próximos (*Cronbergia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* e *Nodularia*) é o tipo especial de formação de heterocito (**Figura 1**): os heterocitos formam-se aos pares a partir da

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

divisão assimétrica de células intercalares, posteriormente ocorre a quebra do tricoma entre o par de heterocitos tornando-os secundariamente terminais (Miller 1923, Komárek 2005).

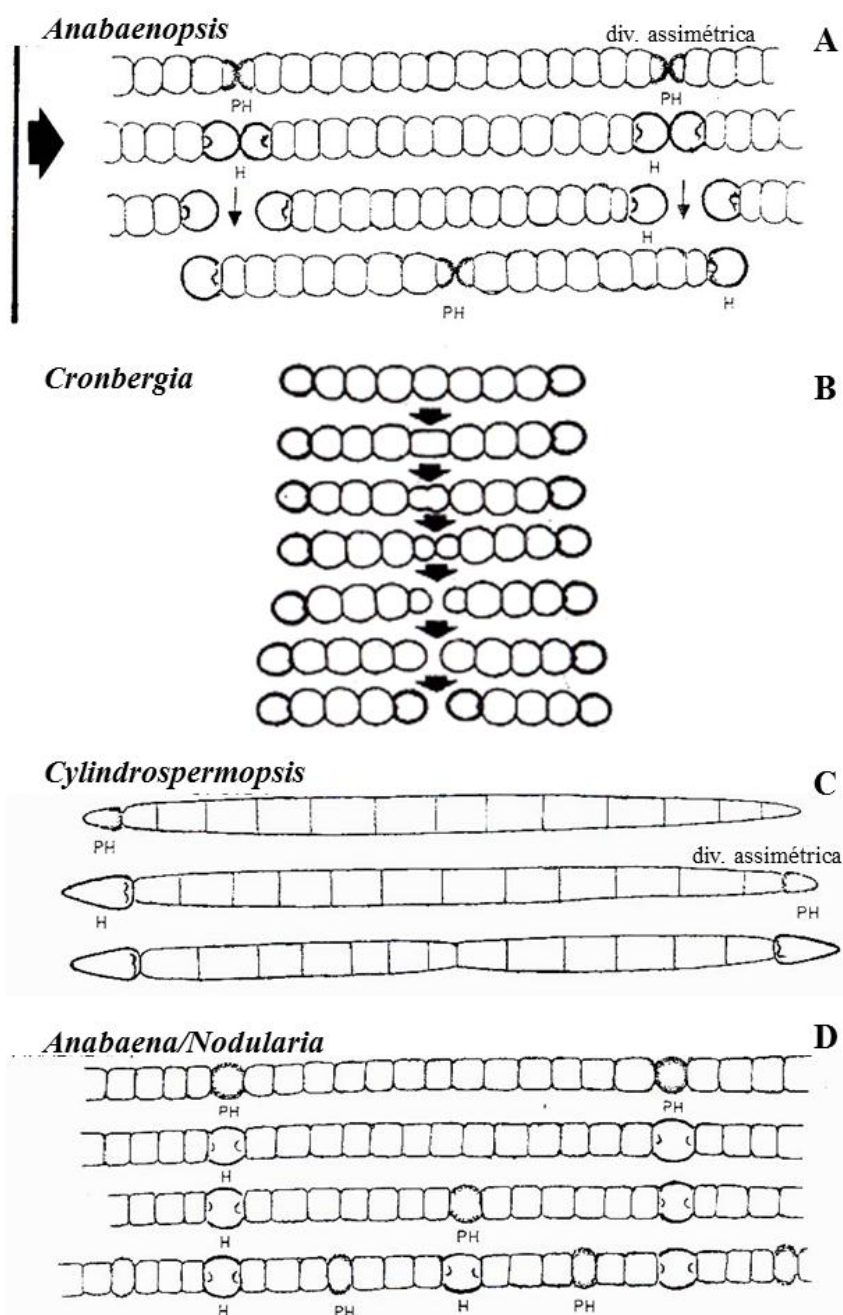


Figura 1. A. Desenvolvimento típico dos heterocitos no gênero *Anabaenopsis*; e nos gêneros mais próximos morfologicamente: B. *Cronbergia*, C. *Cylandrospermopsis*, D. *Anabaena/Nodularia*. Adaptado de Komárek (2005) e Komárek *et al.* (2010). PH = pró heterocito; H = heterocito; Seta indica região de quebra do tricoma.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Apesar de o gênero *Anabaenopsis* ser bem delimitado tanto fenotipicamente (Komárek & Anabnostids 1989, Komárek 2005) quanto filogeneticamente (Iteman *et al.* 2002, Ballot *et al.* 2008), a diversidade infragenérica ainda não é clara, visto que as espécies diferem apenas levemente uma das outras e formas transitórias ocorrem entre quase todas as populações das cerca de 20 espécies descritas (Komárek 2005).

Na **Tabela 1** são apresentados os sinônimos das espécies mais comuns de *Anabaenopsis* e na **Tabela 2** a distribuição geográfica das mesmas. Observa-se que as espécies de *Anabaenopsis* estão distribuídas principalmente em países tropicais e apenas citadas para algumas localidades de clima temperado, geralmente no período quente (verão) (Komárek 2005).

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Tabela 1. Sinônimos das espécies mais comuns de *Anabaenopsis* de acordo com Komárek (2005) e Komárek & Hauer (2012).

Nome válido	Sinônimos na literatura
Espécies de corpos de água alcalina, planctônicas com aerótopos (formam floração)	
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Miller 1923	? <i>Anabaenopsis circularis</i> (G.S. West) Miller sensu Tiffany (1934); <i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>curta</i> Dedusenko-Shchegoleva (1959); <i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>ovalispore</i> Dedus.–Ščegol. (1959); <i>Anabaenopsis circularis</i> f. <i>casgica</i> Usačev in Proškina-Lavrenko & Makarova (1968).
<i>Anabaenopsis circularis</i> (G.S. West) Wołoszyńska et Miller In Miller 1923	<i>Anabaena flos-aquae</i> var. <i>circularis</i> G.S. West (1907); <i>Anabaena</i> (<i>Anabaenopsis</i>) <i>circularis</i> (G.S. West) Wołoszyńska (1912); <i>Anabaenopsis circularis</i> (G.S. West) Wołoszyńska et Miller in Miller (1923); <i>Anabaenopsis circularis</i> (G.S. West) Miller sensu Taylor, 1932. <i>Anabaenopsis nadsonii</i> sensu Proškina-Lavrenko & Makarova (1968); ? <i>Anabaenopsis tanganyikae</i> sensu Guarrera et al. (1972); <i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>circularis</i> (G.S. West) Jeeji-Bai (1977).
<i>Anabaenopsis nadsonii</i> Voronichin 1929	<i>Anabaenopsis nadsonii</i> Voronichin (1929); ? <i>Anabaenopsis arnoldii</i> var. <i>natrophila</i> Kol (1929); <i>Anabaenopsis kulundinensis</i> Voronichin in Elenkin (1938); ? <i>Anabaenopsis peruviana</i> Tutin (1940); <i>Anabaenopsis</i> sp. sensu Niemi & Hällfors (1974).
<i>Anabaenopsis arnoldii</i> Aptekar 1926	<i>Anabaena flos-aquae</i> var. <i>circularis</i> G.S. West (1907); <i>Anabaena</i> (<i>Anabaenopsis</i>) <i>circularis</i> (G.S. West) Wołoszyńska (1912); <i>Anabaenopsis circularis</i> (G.S. West) Miller (1923); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> Aptekar' (1926); ? <i>Anabaenopsis arnoldii</i> var. <i>recta</i> Roll (1928); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. sensu Kiselev (1931); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. („African form“) sensu Taylor (1932); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. <i>rossica</i> Aptekar' in Elenkin (1938); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. <i>africana</i> Taylor in Elenkin (1938); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. <i>kisseleviana</i> Elenkin (1938); <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. <i>philippinensis</i> Taylor in Elenkin (1938); ? <i>Anabaenopsis arnoldii</i> f. <i>recta</i> (Roll) Elenkin (1938).

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Tabela 2. Distribuição geográfica das espécies mais comuns de *Anabaenopsis*. Adaptado e ampliado de Komárek (2005) e Guiry & Guiry (2013).

País	Localização	Táxon	Referência
ÁSIA			
Rússia	Iwanovo	<i>A. elenkinii</i>	Miller (1923)
		<i>A. elenkinii</i>	Ballot <i>et al.</i> (2008)
		<i>A. elenkinii</i>	
Turcomenistão	Mar Cáspio	<i>A. elenkinii</i>	Komárek (2005)
Israel		<i>A. elenkinii</i>	Vinogradova <i>et al.</i> (2000)
AMÉRICA			
Brasil	Lagoa salina, salitrada e baía do Pantanal da Nhecolândia	<i>A. elenkinii</i> , <i>A. cunningtonii</i>	Santos & Sant'Anna (2010),
	Lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia	<i>A. elenkinii</i> , <i>A. arnoldii</i>	Malone <i>et al.</i> (2012)
	Lagoa no Rio de Janeiro	<i>A. circularis</i>	Peixoto & Huszar (1983)
	Lagoa do Violão, RS	<i>A. circularis</i> (<i>A. elenkinii</i> f. <i>circularis</i>)	Carvalho <i>et al.</i> (2008)
	Reservatórios no Estado de SP	<i>A. tanganyikae</i>	Sant'Anna (1991)
Cuba	Laguna de Baconao, Santiago	<i>A. tanganyikae</i>	Komárek (1984)
Uruguai	Lagura Pajarera	<i>A. elenkinii</i>	UNESCO (2009)
México	Lagos Texcoco, Quitzeo, Tecuitlapa, Parque Chapultepec	<i>A. elenkinii</i> , <i>A. cf. circularis</i> , <i>A. tanganyikae</i>	Ballot <i>et al.</i> (2008), Komárek & Komárková-Legnerová (2002)
Colômbia	Laguna del Parque Norte	<i>A. elenkinii</i> , <i>A. hungarica</i>	Ramírez (1994)
Estados Unidos	Lago Erie,	<i>A. elenkinii</i>	Smithi (2010)
ÁFRICA			
Quênia	Lagos Elmenteita, Nakuru e Sonachi / Nakuru, Simbi, Elmenteita e Magadi	<i>A. elenkinii</i> / <i>A. abijatae</i> / <i>A. tanganyikae</i>	Ballot <i>et al.</i> (2008), Komárek (2005)
Uganda	Canal Kazinga	<i>A. elenkinii</i> / <i>A. tanganyikae</i>	Ballot <i>et al.</i> (2008), Komárek (2005)
Chade		<i>A. tanganyikae</i>	Komárek (2005)
EUROPA			
Alemanha	Lago Langer; outros 33 lagos no norte da Alemanha	<i>A. elenkinii</i>	Ballot <i>et al.</i> (2010); Dolman <i>et al.</i> (2012)
República Tcheca		<i>A. elenkinii</i>	Komárek (2005)
Romênia		<i>A. elenkinii</i>	Caraus (2012)
Hungria		<i>A. elenkinii</i>	Komárek (2005)
Ucrânia		<i>A. elenkinii</i>	Komárek (2005)
Reino Unido		<i>A. elenkinii</i>	Whitton <i>et al.</i> (1998)
OCEANIA			
Austrália	Queensland, Victoria	<i>A. elenkinii</i>	Day <i>et al.</i> (1995)
Nova Zelândia		<i>A. elenkinii</i>	Broady & Merican (2012)

1.2. O conceito de espécie e espécie críptica em cianobactéria

O conceito de espécie em cianobactéria difere do conceito biológico de espécie, visto que neste grupo de organismo não ocorre reprodução sexuada. Assim, o conceito de espécie em cianobactéria deve considerar a abordagem da taxonomia polifásica, que inclui pelo menos alguns elementos da genética, morfologia, citologia, ultra-estrutura, fisiologia, bioquímica e ecologia (Castenholz & Norris 2005).

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

De acordo com Komárek (2010), a diversidade subgenérica de cianobactérias com base no conhecimento atual, mostra que a categoria "espécie" é útil, mas seu conceito ou definição pode ser apenas uma medida convencional, com critérios distintos em gêneros diferentes. O mesmo autor aponta que a definição mais adequada para espécie em cianobactéria seria a seguinte:

“Grupo de populações (? cepas) que pertencem ao mesmo genótipo (gênero) delimitado por características fenotípicas estáveis (definível e reconhecível, com limites distintos de variação) e tendo os mesmos critérios ecológicos. Elas ocorrem repetidamente (no tempo) e em uma variedade de locais ecologicamente semelhantes”.

Atualmente, sabe-se que utilizar apenas os caracteres fenotípicos para descrever e nomear táxons de cianobactérias não é o mais adequado, uma vez que é bem conhecido na literatura que cianobactérias morfológica e fisiologicamente semelhantes podem ser bastante diferentes geneticamente e cianobactérias com a mesma composição genética podem apresentar fenótipos muito distintos sob diferentes condições ecológicas ou fisiológicas (essas últimas, muitas vezes são resultantes simplesmente de expressão diferencial de genes) (Castenholz & Norris 2005). Conforme Castenholz & Norris (2005), as atuais regras de nomenclatura botânica e bacteriológica devem ser usadas para descrição formal de novos táxons, mas outra forma de delinear novos táxons deve ser utilizada para o crescente número de cepas que vem sendo descobertas e incluídas nos bancos de cultura. Estes autores sugerem que, ao menos temporariamente, os nomes genéricos tradicionais devem ser usados com os números das cepas de cada espécime isolado ou coletado, dispensando o epíteto específico ou utilizando “cf.” para auxiliar os taxonomistas nas comparações fenotípicas, a exemplo de muitas cepas da Coleção de Cultura Pasteur – PCC.

Contudo, Komárek & Marés (2012) indicam que apesar de não existir critérios universais facilmente definíveis e uniformes para delimitação de espécies, as populações e linhagens dentro de um único gênero, que pertencem ao mesmo genótipo e apresentam características fenotípicas estáveis e limite ecológico mais ou menos estável devem ser consideradas como uma única espécie. Assim, de acordo com essa definição, uma espécie deve ser geneticamente, ecologicamente e morfolologicamente uniforme. E todas essas premissas devem ser aplicadas na classificação moderna de cianobactérias.

Quando os taxonomistas se deparam com dois ou mais grupos de organismos que são morfolologicamente indistinguíveis entre si, mas pertencem a diferentes linhagens evolutivas, trata-se de um conjunto de espécies crípticas (Saéz & Lozano 2005). A busca em

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

compreender a ocorrência de espécies crípticas cresceu fortemente nas últimas duas décadas, sendo considerada como fator chave para estimar a biodiversidade e sua conservação (Bickford *et al.* 2007). Em cianobactéria, alguns exemplos de espécies crípticas têm sido documentados para táxons que antes eram considerados cosmopolitas: *Phormidium retzii* (Casamata *et al.* 2003), *Microcoleus vaginatus* (Boyer *et al.* 2002,), *Coleofasciculus chthynoplastes* (Siegesmund *et al.* 2008).

Ballot *et al.* (2008) encontraram divergência filogenética entre cepas de *Anabaenopsis elenkinii* de água doce e de água salobra-alcalina, bem como distintas origens geográficas, o que pode indicar a provável ocorrência de espécies crípticas dentro deste táxon. Desta forma, o estudo de novas linhagens de *A. elenkinii* pode contribuir para responder esta importante questão: existem espécies crípticas em *Anabaenopsis*?

1.3. As espécies de *Anabaenopsis* produzem toxinas?

De acordo com Lanaras & Cook (1994), *Anabaenopsis milleri* é capaz produzir microcistina LR. Além disso, em 2007 foi documentada a mortalidade em massa de pássaros, principalmente flamingos (*Phoeniconaias minor* Goeffroy), associada a florações tóxicas de *Anabaenopsis* spp. e *Arthrospira fusiformis* em um lago raso na Grécia (Lago Koronia) (Moustaka-Gouni 2007). Por outro lado, o estudo realizado por Ballot *et al.* (2010) com a cepa *Anabaenopsis elenkinii* AB2008/61 não detectou a produção das cianotoxinas neurotóxicas PSP (toxina paralisante de molusco) e anatoxina-a, e a hepatotóxica cilindrospermopsina em análises combinadas de LC-MS/MS e ELISA, demonstrando assim que a cepa não é tóxica.

Contudo, inexistem trabalhos sobre a produção de toxinas por cepas de *Anabaenopsis elenkinii* isoladas do Brasil.

1.4. Hipóteses

1.4.1. Morfologia

Hipótese 1: A presença de aerótopos é facultativa em *Anabaenopsis elenkinii* e o hábito é planctônico.

1.4.2. Filogenia

Hipótese 1: A variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e *cpcBA*-IGS (ficocianina) corrobora a variabilidade fenotípica das espécies de *Anabaenopsis*.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Hipótese 2: As populações de *Anabaenopsis elenkinii* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético na árvore do RNAr 16S.

Hipótese 3: Existem espécies crípticas no gênero *Anabaenopsis* relacionadas ao morfotipo de *A. elenkinii* que são diferenciadas quanto ao hábitat e origem geográfica.

1.4.3. Ecofisiologia

Hipótese 1: O crescimento de *Anabaenopsis elenkinii* está correlacionado positivamente com o aumento do pH e negativamente com o aumento da temperatura.

Hipótese 2: A temperatura influencia a frequência de formação de heterocitos em *A. elenkinii*.

Hipótese 3: Não há produção de cianotoxinas por *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059.

2. OBJETIVOS

- Estudar a variabilidade dos caracteres morfológicos diacríticos de *Anabaenopsis elenkinii*;
- Avaliar os efeitos do pH, temperatura e concentração de nitrato sobre o desenvolvimento da cepa *A. elenkinii* CCIBt1059;
- Caracterizar filogeneticamente cepas de *A. elenkinii* do Pantanal brasileiro;
- Investigar a produção de toxinas e de outras substâncias bioativas da cepa *A. elenkinii* CCIBt1059.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo morfológico e de crescimento em laboratório

3.1.1. Isolamento e cultivo de *Anabaenopsis*

A cepa selecionada para o estudo ecofisiológico e de bioativos, *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059, foi coletada na lagoa Salina do Meio, Fazenda Nhumirim (EMBRAPA) no Pantanal da Nhecolândia, no período de seca em 19/08/2009.

Como descrito na área de estudo, a Salina do Meio apresenta as características típicas das salinas do Pantanal da Nhecolândia e é relativamente bem estudada do ponto de vista limnológico (Mourão *et al.* 1988, Mourão 1989, Hamilton *et al.* 1999, Medina-Junior & Rietzler 2005), biogeoquímico (Barbiéro *et al.* 2002, Barbiéro *et al.* 2008, Almeida *et al.* 2011), mineralogia dos solos (Furquim *et al.* 2008, Furquim *et al.* 2010) e composição de microalgas e cianobactérias (Santos 2008, Santos & Sant'Anna 2010, Santos *et al.* 2012).

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Nessa lagoa, *Anabaenopsis elenkinii* é a espécie mais abundante, forma florações principalmente nos períodos de seca e ocorre simultaneamente com *Arthrospira platensis* (Santos & Sant’Anna 2010). Além destas cianobactérias, a diatomácea *Craticula* cf. *buderi* ocorre em elevadas densidades juntamente com *Anabaenopsis elenkinii* (Santos *et al.* 2012).

No laboratório, o isolamento das cepas de interesse foi feito por meio da técnica de seleção por capilaridade ou “pescaria”. Esta técnica consiste em inocular um tricoma da amostra da natureza em tubos de ensaio com meio de cultura líquido. Com esta finalidade, uma lâmina de vidro foi flambada em chama de fogo, em seguida adicionou-se uma gota de amostra e várias gotas de meio de cultura (BG-11m) com cicloheximida (responsável pela destruição das células eucariotas). Com o auxílio de micropipeta e microscópio óptico (Carl Zeiss, Primo Star) foram retirados tricomas de *Anabaenopsis elenkinii* da gota da amostra, transferindo-os para outra gota com meio de cultura limpo e assim sucessivamente, até conseguir chegar apenas a um tricoma da espécie de interesse (**Figura 2**); este tricoma isolado foi transferido para um tubo de ensaio com meio de cultura líquido e a partir deste processo de “pescaria” foi possível isolar clones de cada cepa de interesse.

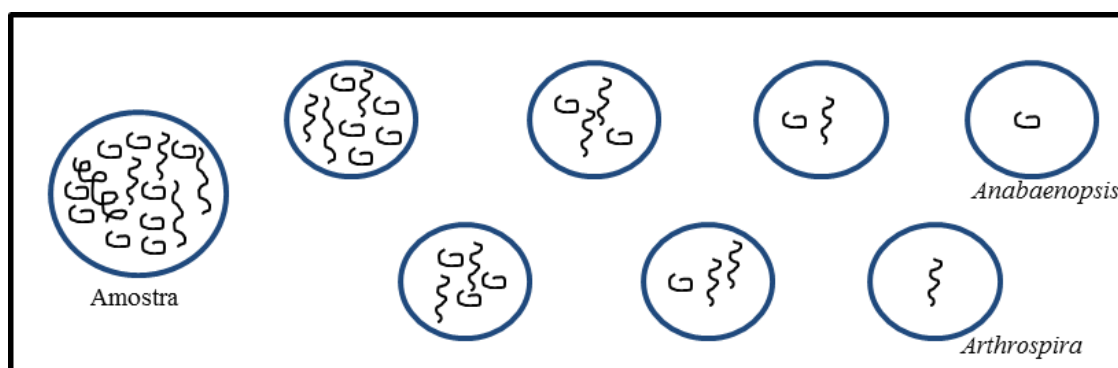


Figura 2. Representação esquemática do isolamento de tricomas de *Anabaenopsis* através da técnica de “pescaria” em lâmina de microscopia.

3.2. Manutenção das cepas isoladas e condições experimentais

As cepas de *Anabaenopsis elenkinii* são mantidas em triplicata no Banco de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, o qual faz parte da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt). As cepas são mantidas em meio líquido BG-11 (Stanier *et al.* 1971) modificado (**Tabela 3**), em condições controladas: temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância $40 - 50 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo 14-10h claro-escuro, e s\u00e3o repicadas a cada 30-40 dias (**Figura 3**). Todos os procedimentos para

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

manutenção e repicagem das cepas foram feitos em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com luz UV durante 30 minutos. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C, 1 atm durante 30 minutos.

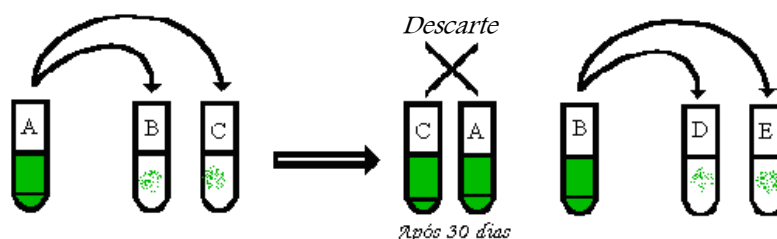


Figura 3. Esquema de repicagem das cepas mantidas na Coleção de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica.

Os experimentos de cultivo com *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 foram realizados em triplicata, em câmaras incubadoras marca Eletrobab durante 30 dias. As condições nas câmaras foram as seguintes: fotoperíodo 12–12h claro-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (medida na água com sensor subaquático marca Li-COR modelo LI-250 esférico) e temperatura controlada por termostato e termômetro de máxima e mínima colocado no interior das câmaras. As condições adotadas como controle foram as seguintes: concentração de nitrato do meio BG-11 reduzida a 3% (45 mg.L^{-1}) (**Tabela 29**), pH ajustado para 9,5 e temperatura 25°C. Esses valores foram definidos por serem os mais próximos das condições naturais onde o material foi coletado (lagoa Salina do Meio).

Etapas do desenho experimental: a) 5 mL de inóculo foram transferidos para Erlenmeyer contendo 50 mL de meio BG-11m, sendo mantidos em rotação constante de 70 rpm (rotações por minuto) por 7 a 10 dias; b). Após o crescimento da cultura, os 50 mL deste inóculo foram transferidos para 500 mL de meio BG-11m mantidos a 70 rpm por 10 a 12 dias, até que atingissem a fase exponencial de crescimento; c) Dos 500 mL do inóculo obtido, foi coletada uma amostra de 1 mL e realizada contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal, posteriormente efetuou-se o cálculo do volume necessário a ser transferido para que a concentração de células no início do experimento fosse de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ (Santos *et al.* 2011). Os cultivos experimentais foram realizados em Erlenmeyer de 1000 mL com 500 mL de meio BG-11m, mantidos em câmaras de cultura, sem aeração ou agitação.

Nas câmaras de cultura, além da condição controle foram realizados experimentos em triplicata nos diferentes tratamentos: pH 10,5 e 7,0, temperatura 30 e 35 °C, concentração de

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

nitrato 750 mg/L (50%) e ausência da fonte de nitrogênio (0%), conforme **Tabela 4** e **Figura 4**.

Tabela 3. Meio de Cultura BG-11 (Stanier *et al.* 1971) e BG-11 modificado (BG-11m).

	Concentração do meio BG-11 original (mg/L)	Concentração do meio BG-11m (Nitrato a 3%) (mg/L)*
NaNO ₃ (Nitrato)	1.500	45,0*
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75,0	75,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40,0	40,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36,0	36,0
H ₃ BO ₃	2,86	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	1,81
Na ₂ EDTA	1,00	1,00
Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	0,39	0,39
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	0,22
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08	0,08
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05	0,05
Na ₂ CO ₃	2.000	2.000
Ácido cítrico	6,00	6,00
Citrato ferroso de amônio	6,00	6,00

*Condição controle, concentração de Nitrato semelhante à de ocorrência natural na Salina do Meio.

Tabela 4. Condições do controle e dos tratamentos testados para a cepa *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059.

	pH	Temp. °C	Nitrato mg/L (BG-11 modificado)
Controle - C	9,5	25	45 (3%)
Tratamento 1 – T1	9,5	25	750 (50%)
Tratamento 2 – T2	9,5	25	0 (0%)
Tratamento 3 – T3	9,5	30	45
Tratamento 4 – T4	9,5	35	45
Tratamento 5 – T5	10,5	25	45
Tratamento 6 – T6	7,0	25	45

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

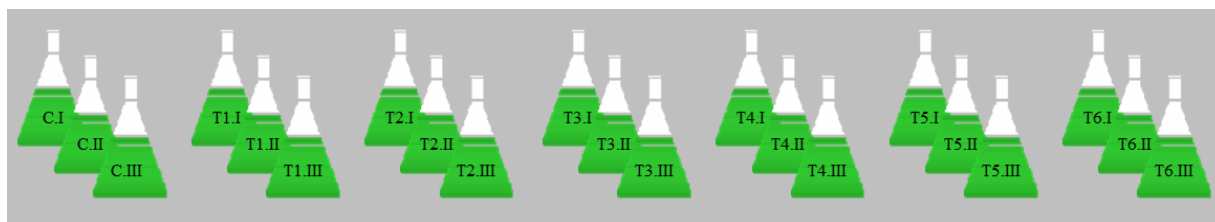


Figura 4. Representação esquemática dos experimentos de crescimento de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 em diferentes concentrações de nitrato (NaNO_3), temperatura e pH, conforme Tabela 4.

3.3. Análise do crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em triplicata a partir de contagens diárias em câmaras de Fuchs-Rosenthal, considerando o limite de até 10% de diferença na contagem entre os dois lados da câmara. A contagem foi realizada no mínimo em uma área, que corresponde a 16 quadrados da câmara. Para avaliar o crescimento das cepas em função dos diferentes tratamentos, foi utilizado Planejamento Fatorial Multiníveis (Montgomery 1991) $3^1 \times 2^1$, com 3 variáveis (pH; temperatura; concentração de nitrato) em dois níveis de variação, resultando 6 condições de cultivo, além da condição controle (**Tabela 4**).

A taxa máxima de crescimento foi calculada de acordo com a fórmula de Fogg e Thake (1987) utilizando os dados da fase exponencial de crescimento:

$$\mu = [\ln(N_1) - \ln(N_0) / t_1 - t_0]$$

onde N é o número de células no tempo 1 e tempo zero.

O tempo de duplicação (G), que corresponde ao tempo necessário em dias para a população dobrar de tamanho (Fogg & Thake 1987), foi calculado pela fórmula:

$$G = \ln 2 / \mu$$

Onde o logaritmo natural de 2 é dividido pela taxa máxima de crescimento (μ), expresso em dias.

O Rendimento Celular (R) foi calculado a partir da densidade celular no final do experimento (30º dia) subtraído da densidade celular do inóculo inicial ($\sim 1,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹).

3.4. Análise morfológica

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas em amostras da natureza ($n = 100$) e cultivadas em laboratório nas condições experimentais descritas anteriormente ($n = 63$ para cada parâmetro em cada tratamento), sob microscópio binocular Zeiss Axioskop-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com contraste de fase, ocular micrometrada e câmara digital

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Sony Cybershot acoplada. As medidas do comprimento e largura das células e dos tricomas foram realizadas com o programa Zeiss Axiovision 4.6. As seguintes características morfológicas foram observadas em *Anabaenopsis elenkinii*: 1) Morfologia geral do tricoma; 2) Morfologia das células vegetativas; 3) Comprimento e largura das 3 primeiras células apicais em 7 tricomas; 4) Número de espiras por tricoma; 5) Altura (largura) das espiras; 6) Distância entre as espiras; 7) Presença de aerótopos; 8) Presença de mucilagem (através da adição de nanquim); 9) Morfologia e medidas de heterocitos (mínimo 20); 10) Morfologia e medidas de acinetos (sempre que presentes).

3.5. Análises estatísticas

Para comparação das médias de comprimento e largura entre material da natureza e de cultura foi utilizado o teste-t para amostras independentes, módulo “Basic Statistics/Tables” (Callegari-Jacques 2003). As características métricas foram descritas estatisticamente através do cálculo de média aritmética e desvio-padrão como medidas de, respectivamente, tendência central e grau de dispersão absoluta dos dados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Komolgorov-Smirnov (Zar 1999). As diferenças entre material da natureza e de cultura foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de um fator), seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Todos os cálculos foram efetuados pelo programa GraphPadPrim v. 5.1.

3.6. Estudo molecular (filogenético)

3.6.1. Extração de DNA e amplificação por PCR dos genes RNA ribossomal 16S e *cpcBA*-IGS (operon da ficocianina).

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo o método descrito por Fiore *et al.* (2000). Aliquotas (5 µl) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30% e 0,1% de SYBER® Green I (Eugene, OR, EUA)) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2% após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). O marcador de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado. A documentação do gel foi feita usando o programa “Kodak MI Application” do “Kodak Gel Logic 212 Imaging System” (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc, Rochester, NY, EUA). O material foi armazenado a temperatura de -20°C até o início dos procedimentos seguintes.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

A amplificação por PCR do gene do rRNA 16S e da região *cpcBA*-IGS foi realizada em tampão para a reação de PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl₂; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 0,5 µM do primer 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') (Neilan *et al.* 1997), 0,5 µM do primer 23S30R (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT -3') (Lepère *et al.* 2000) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. Para *cpcBA*-IGS foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores de acordo com Neilan *et al.* (1995): *cpcB* (5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3'), e o primer reverso *cpcA* (5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3'). A reação foi realizada em um termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne, Chelmsford, Essex, England), nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 10 ciclos de 94 °C/45s, 57 °C/45s, 72 °C/2min; 25 ciclos de 94 °C/45s, 54 °C/45s, 72 °C/2min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita em eletroforese de agarose conforme descrito acima.

3.6.2. Clonagem e transformação dos produtos de PCR

A clonagem dos produtos da PCR foi realizada utilizando o Kit de clonagem “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA). A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita através de choque térmico (Sambrook *et al.* 1989). Aliquotas de 10 µL do produto de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e deixado por 30 segundos, sem agitar. Em seguida o microtubo foi incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio SOC (Sambrook *et al.* 1989) a temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 µg/mL de meio. As placas foram incubadas por 15 horas, a temperatura de 37°C. Em seguida, uma colônia de cor branca foi utilizada visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a reação de PCR como descrito por Nübel *et al.* (1997), utilizando-se os iniciadores CYA359 (5'-GGGGAATTTTCCGCAATGGG-3') e CYA781aR (5'-GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT-3') e CYA781bR (5'-

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3') (Nübel *et al.* 1997). A reação de amplificação foi composta por tampão de PCR 2 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 6 mM MgCl₂; 3 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 10 ng de DNA; 0,4 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne, Chelmsford, Essex, England), nas seguintes condições: 94 °C/2min; 30 ciclos de 94 °C/1min, 63 °C/41min, 72 °C/1min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita em eletroforese de agarose conforme previamente descrito.

3.6.3. Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5α que contenham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina (Birnboim & Doly 1979). As colônias brancas foram transferidas para 4 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em microtubos foram colocados 1,5 mL da cultura de células produzidas e, em seguida, foram centrifugadas a 10.000 × g por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. O pélete formado foi ressuspense em 100 µL de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Em seguida, 200 µL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram adicionados e misturados gentilmente por meio da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram acrescentados 150 µL de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 × g durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 270 µL de isopropanol a temperatura ambiente, misturando-se e centrifugando-se conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pélete foi lavado uma vez com 250 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 x g por 2 minutos. O pélete foi secado e ressuspense em 30 µL de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 M e 10 mg RNase/mL. Essa mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Os plasmídeos assim extraídos foram armazenados a -20°C até o próximo uso.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

3.6.4. Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit “ABI Prism Big Dye terminator (Applied Biosystems by Life Technologies)”. Para a reação utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol dos iniciadores M13F (5'-GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA-3') ou SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'). Também foram utilizados outros seis iniciadores (357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R), visando o fechamento interno das sequências de RNAr 16S, e 1 µL de “Big Dye”, 2 µL de tampão 2,5 X “Save Money” (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit de sequenciamento. Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para o sequenciamento dos fragmentos de DNA. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

3.6.5. Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade <20) através do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green 1998, Ewing *et al.* 1998, Gordon *et al.* 1998), em sistema operacional Linux. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.* 1990). Para a construção da árvore filogenética, pelo método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood), as sequências obtidas e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas e editadas usando-se o pacote de programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011). Com as sequências alinhadas foi utilizado o programa TOPALi v.2 (Milne *et al.* 2008) para seleção do modelo estatístico mais adequado para análise filogenética das sequências selecionadas e o modelo indicado foi processado no programa MEGA 5.0. As novas sequências geradas neste estudo serão depositadas em bancos de dados públicos quando forem publicadas em artigo específico.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

3.7. Prospeção de substâncias bioativas

3.7.1. Estudos biológicos

a) Ensaios toxicológicos – Bioensaios em camundongos

Os materiais testados foram: **1)** a floração coletada na lagoa Salina do Meio (19/08/2009), formada principalmente por *Anabaenopsis elenkinii* (49% da densidade celular total), por *Arthrospira platensis* (17% da densidade celular total) e pela diatomácea *Craticula* cf. *buderi* (Hustedt) Lang-Bertalot (34% da densidade celular total) e, **2)** a cepa uniespecífica *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt 1059, cuja biomassa foi obtida no final da fase exponencial de crescimento (12º dia), na condição do tratamento 5 (**Tabela 4**).

O protocolo seguido para essas análises (Harada *et al.* 1999) foi o seguinte: a biomassa dos dois materiais foi liofilizada; o liofilizado da floração foi dividido em duas porções iguais, sendo uma delas submetida à extração com ácido acético 0,1 M e a outra, com metanol 100%. O extrato em ácido acético foi liofilizado e o metanólico, concentrado a vácuo para eliminação do solvente orgânico e liofilizado.

O liofilizado da cepa CCIBt 1059 foi submetido à extração com ácido acético 0,1 M e o extrato obtido foi também liofilizado.

Alíquotas de quantidades equivalentes a 20 mg de células liofilizadas de todos os extratos foram pesadas, suspensas em 1 mL de solução fisiológica e utilizados nos ensaios toxicológicos.

Estes testes foram realizados em triplicata, em camundongos machos “Swiss-Webster”, com peso variando entre 19 e 22 g. Os animais foram observados por sete dias, durante os quais os sinais de intoxicação foram anotados; após este período, foram eutanaziados e submetidos a exames “post mortem” (Harada *et al.* 1999).

O grupo controle foi submetido a procedimentos idênticos, porém, receberam por via oral, unicamente 1 ml de soro fisiológico. A eutanásia dos animais, quando necessária, foi feita em câmara de CO₂.

b) Ensaios bioautográficos para atividade inibidora da acetilcolinesterase

Preparo da solução enzimática: A enzima acetilcolinesterase tipo V (Sigma, N° C 2888, 1000 U) foi dissolvida em solução tampão Tris HCl (pH 7,8) e estabilizada pela adição de albumina de soro bovino V (0,1%, Sigma, N° A-4503).

Para o estudo prévio da atividade anticolinesterásica dos extratos, optou-se por reunir em uma única amostra, alíquotas das biomassas dos sete tratamentos ao qual foi submetida a

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

cepa *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 (**Tabela 4**). Este material reunido e amostras dos tratamentos 1 e 5 foram aplicadas a placas cromatográficas, para a avaliação de atividade anticolinesterásica segundo Marston *et al.* (2002): 200 µg.spot⁻¹ de cada amostra, juntamente com o controle positivo eserina (Sigma, 1 µg.spot⁻¹) foram submetidos à Cromatografia de Camada Delgada (CCD), desenvolvida com a fase móvel clorofórmio:metanol:água (64:36:8, v/v/v). Após o desenvolvimento, as placas foram secas, nebulizadas com a solução enzimática (6.66 U/ml) e incubadas a 37 °C, por 20 minutos. A atividade enzimática foi detectada pela nebulização de solução 0,25% de acetato de 1-naftila em metanol (5 ml) e 0,25% de solução aquosa do sal Fast Blue B (20 ml). Inibidores anticolinesterásicos em potencial aparecem como halos claros sobre fundo púrpura (roxo) (Marston *et al.* 2002).

c) Ensaios bioautográficos para atividade antifúngica (frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penz. CCIBt0491)

O fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum* CCIBt0491 é mantido no Banco de Cultura de Fungos do Instituto de Botânica. Para estes ensaios, foram inoculadas placas de Petri de 10 cm contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), que foram incubadas por aproximadamente 12 dias em estufa, a 28°C. A extração dos esporos foi realizada com solução de glicose e sais e a suspensão obtida foi utilizada no ensaio bioautográfico.

A cepa submetida a esses testes foi a de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059. Amostras liofilizadas, pesando 400 µg, dos extratos em ácido acético 0,1 M das biomassas obtidas nos sete tratamentos a que foi submetida esta cepa, foram dissolvidas em 10 microlitros do mesmo solvente e aplicadas a placas cromatográficas de gel de sílica (MERCK 60 F₂₅₄). Após a secagem das placas, os cromatogramas foram desenvolvidos na fase móvel clorofórmio: metanol: água (64: 36: 8, v/v/v), em cubas de vidro, em atmosfera previamente equilibrada.

Após a eluição, as placas foram secas em corrente de ar, em capela, por 1 hora, para a remoção completa do solvente. Em seguida, a suspensão de esporos foi aspergida sobre as placas que foram incubadas em câmara úmida, a 28°C, por 2 dias para o desenvolvimento do fungo (Homans & Fuchs 1970, Rahalison *et al.* 1994). A formação de halos brancos sobre a coloração verde escura do fungo, no cromatograma, indica a presença de substâncias com potencial antifúngico. Como controle positivo, foi utilizado Nistatina (1,0 µg) (Castro & Lima 2011).

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

d) Teste de ação hemolítica (Rangel *et al.* 1997)

O sangue, obtido de camundongos Swiss, machos (25-30g) provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foi colocado em um béquer com um volume aproximadamente 30 vezes maior de solução fisiológica Krebs-Henseleit (NaCl 113mM; KH₂PO₄ 1,2mM; KCl 4mM; MgSO₄.7H₂O 1,2mM; CaCl₂ 2,5mM; NaHCO₃ 25mM; C₆H₁₂O₆ 11,1mM) e mantido sob agitação constante por 15 minutos. A mistura foi centrifugada três vezes por 7 minutos a 3000 rpm para lavar os eritrócitos de componentes plasmáticos; a seguir, foi preparada a suspensão de eritrócitos (SE) a 4 % (V/V), em solução fisiológica de Krebs-Henseleit.

Novamente, foram analisadas amostras de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059, idênticas às utilizadas nos testes antifúngicos e anticolinesterásicos. Essas amostras foram diluídas em solução fisiológica de Krebs-Henseleit e posteriormente colocadas em placa de ELISA com 96 poços; a seguir, a cada uma, foram adicionados 50 µL de SE 4 %. Para o controle negativo, foi utilizada solução fisiológica como controle positivo, o detergente Triton X-100 1% (hemólise total). Após uma hora de incubação, à temperatura ambiente, sob agitação constante, a solução foi centrifugada a 3.000 rpm, por 5 minutos; o sobrenadante foi transferido para placa de ELISA e a atividade hemolítica foi medida no comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados, se positivos, são analisados a partir dos logaritmos de suas médias e dos respectivos erros padrões. O cálculo das CE₅₀ (concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) são calculados, a partir de regressão não-linear, no programa GraphPad Prism v. 5.1.

e) Ensaio de atividade antibacteriana (frente às bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

As bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 são mantidas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, em freezer a -80°C em glicerol a 20%. Para este ensaio, inóculos bacterianos foram semeados em placas contendo meio de *Tryptic Soy Broth* (TSB/BioRad) (Koneman *et al.* 1997). Após incubação em estufa incubadora BOD – REVCO, a 37°C por 16-18 horas, a pré-cultura líquida foi diluída em solução salina (NaCl) a 0,85% até atingir uma suspensão bacteriana equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (padrão 0,5 da escala de McFarland), que foi semeada em placas contendo ágar Muller-Hinton com auxílio de um “swab” estéril (Bauer *et al.* 1966). Essas placas foram empregadas para estes ensaios.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Cerca de 1 mg de amostras de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059, obtidas do mesmo modo que para os testes biológicos anteriores, foram filtradas em membrana de 0,22 µm, colocadas sobre discos de papel de filtro Whatmman nº 541 estéril e colocadas sobre a superfície de cada placa, anteriormente preparada.

Após a incubação, nas mesmas condições anteriormente especificadas, as placas foram examinadas quanto à presença ou ausência de halo de inibição do crescimento bacteriano. O ensaio também foi realizado em tubos de ensaio, utilizando as mesmas concentrações bacterianas. Os tubos foram homogeneizados e a leitura foi efetuada após 18 horas de incubação a 37°C, quando foi comparada com a turbidez obtida nos tubos-controle.

Os experimentos-controle dos crescimentos bacterianos foram feitos em placas contendo apenas ágar TSB e o teste de esterilidade dos extratos foi feito em caldo tioglicolato de sódio, incubados a 37°C por 16-18 horas.

3.7.2. Estudos químicos

a) Prospeção de metabólitos secundários com atividade antioxidante

Os mesmos extratos de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 citados anteriormente (**Tabela 4**) foram aplicados a placas cromatográficas de gel de sílica (MERCK 60 F₂₅₄) que foi desenvolvido com a fase móvel clorofórmio: metanol: água (64:36:8, v/v/v). Após secagem em corrente de ar, em capela, os cromatogramas foram nebulizados com solução metanólica (2 mg.mL⁻¹) do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), que permite detectar substâncias com atividade antioxidante a qual aparece como manchas amareladas sobre fundo violeta característico do DPPH (Hostettmann *et al.* 2003).

A mudança de coloração da solução de DPPH do violeta para o amarelo ocorre devido à transferência de elétrons ou átomos de hidrogênios de substâncias antioxidantes para o radical livre (Souza *et al.* 2007). Foi utilizada catequina, como controle positivo.

b) Análises qualitativa e quantitativa das microcistinas LR, RR, YR e LA, do L-BMAA e da saxitoxina utilizando a técnica de LC-MS/MS

Amostras dos sete tratamentos aplicados à *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059, nas fases exponenciais e estacionárias (14 frascos) foram liofilizadas, submetidas à extração com ácido acético 0,1 M e os extratos obtidos foram liofilizados e utilizados nas análises.

Porções dos 14 liofilizados foram analisadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA), São Paulo, Brasil, por cromatografia líquida acoplada a detector de

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

espectrometria de massas do tipo triplo-quadrupolo (LC-MS/MS), operando em modo de varredura MS e MS/MS. Para a obtenção de resultados mais precisos, foi realizada a otimização das condições de desenvolvimento do cromatograma e o ajuste dos parâmetros do detector de espectrometria de massas (MS/MS), para as substâncias em questão.

Cada uma das amostras liofilizadas (1mg) foi ressuspensa em 1 mL de água ultrapura, agitada em vórtex por 1 minuto, filtrada em membrana filtrante Millex® 0,45 µm e colocada diretamente nos poços de uma placa de 96 orifícios, para posterior injeção no sistema de LC-MS/MS.

Instrumentação utilizada e condições cromatográficas do LC-MS/MS

Nas tabelas abaixo são apresentados os equipamentos (**Tabela 5**), os reagentes (**Tabela 6**), as informações sobre os padrões analíticos (**Tabela 7**), a metodologia desenvolvida para identificação (**Tabela 8**), os gradientes de eluição cromatográfica (**Tabela 9**), as condições de ionização (**Tabela 10**) e os Parâmetros de Monitoramento de Reação Múltipla (**Tabela 11**) que foram utilizados neste trabalho no sistema de LC-MS/MS para análise das microcistinas LR, RR, YR e LA, da saxitoxina e do L-BMAA.

Tabela 5. Informações sobre os equipamentos utilizados para as análises das microcistinas LR, RR, YR e LA; Saxitoxina e, L-BMAA.

Equipamento	Modelo	Fabricante
HPLC (bomba binária, desgaseificador e forno de coluna)	<i>Agilent 1260 series</i>	<i>Agilent Technologies</i>
Injetor automático	<i>Agilent 1290 series</i>	<i>Agilent Technologies</i>
Espectrômetro de massas	QTRAP 3200	AB Sciex
Programa de aquisição dos dados	<i>Analyst 1.5.2</i>	AB Sciex

Tabela 6. Informação sobre os solventes e reagentes utilizados nas análises.

Reagentes	Especificação	Fabricante
Água Tipo I (H ₂ O)	18 mOhms	<i>Barnsted</i>
Acetonitrila (ACN)	Grau LC-MS	<i>J.T. Baker</i>
Acetato de Amônio	Padrão Analítico	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido Fórmico	Grau LC-MS	<i>Sigma-Aldrich</i>

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Tabela 7. Informações sobre os padrões analíticos do L-BMAA, das microcistinas* LR, RR, YR e LA e da saxitoxina[#].

Substância	Fórmula	MW (g.mol ⁻¹)
Cloridrato de L-BMAA	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ .HCl	154,6
Microcistina LR	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	994,5
Microcistina RR	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1037,0
Microcistina LA	C ₄₆ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	910,5
Microcistina YR	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1044,5
Saxitoxina	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	-

*A solução padrão estoque utilizada foi adquirida junto ao Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP: Solução contendo as microcistinas (LR, RR, LA e YR) na concentração de 10 µg mL⁻¹ em solução 50% Metanol. [#]Devido à ausência do padrão analítico da Saxitoxina (Sax), os parâmetros foram definidos por meio de trabalhos e metodologias publicadas (Seto *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2009).

3.7.3. Condições cromatográficas

Tabela 8. Metodologia desenvolvida para identificação das microcistinas LR, RR, YR e LA, da saxitoxina e do L-BMAA em LC-MS/MS.

Característica	Detalhe
Coluna	Phenomenex Luna C18(2) 50x2mm 3µ
Fase móvel A	H ₂ O + 0,1 % Ácido Fórmico + 5 mM acetato de amônio
Fase móvel B	Acetonitrila + 0,1 % Ácido Fórmico + 5 mM acetato de amônio
Temperatura da coluna	25°C
Vazão	0,250 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	7,1 minutos
Solução para lavagem de agulha	MeOH:H ₂ O (75:25) (v/v)

Tabela 9. Gradiente de eluição cromatográfica.

Etapas	Tempo (min.)	Vazão (µL.min ⁻¹)	%A	%B
0	3,70	250	80	20
1	0,80	250	80	20
2	0,81	250	10	90
3	6,00	250	10	90
4	6,10	250	80	20
5	7,10	250	80	20

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

3.7.4. Detecção por espectrômetro de massas – Modo positivo

Tabela 10. Condições de ionização (*Electro Spray*, ESI).

Parâmetros – Modo Positivo	Valores
<i>Curtain Gás</i>	20 a.u.
<i>Ion Spray Voltage</i>	5200
<i>Source Temperature</i>	550°C
Gas 1 (<i>nebulizer</i>)	55 a.u.
Gas 2 (<i>heater gas</i>)	50 a.u.

Tabela 11. Parâmetros de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*) para o método desenvolvido. *Collision Gas Dissociation* (N_2) = 8 a.u. *Dwell time* = 50 ms.

Substância	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
L-BMAA	119,119	102,100 88,100
Microcistina LR	995,600	135,100 213,100
Microcistina RR	519,800	135,100 213,100
Microcistina LA	910,500	135,100 213,100
Microcistina YR	1045,700	135,100 213,100
Saxitoxina*	300,100	204,100 282,100

*Devido à ausência do padrão analítico da Saxitoxina (Sax), os parâmetros de MRM foram definidos por meio de trabalhos e metodologias publicadas (Seto *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2009).

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo morfológico e ocorrência de *Anabaenopsis elenkinii* nas lagoas da Nhecolândia

Na **Tabela 12** são indicadas todas as amostras estudadas, algumas características físico-químicas e espécies dominantes nas lagoas.

Tabela 12. Posição geográfica, número da amostra em herbário, algumas características físico-químicas da água e espécies de cianobactérias dominantes nas lagoas do Pantanal da Nhecolândia.

Local - Lagoa	ID Herbário	Coordenada geográfica	Data de coleta	pH	Cond. elétrica (µS/cm)	Salin. (ups)	Temp. (°C)	Espécie dominante*
Salina do Meio	SP400654	18°58'29"S, 56°38'47"W	19/08/2009	9,47	10600	6,3	32,5	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP427290	18°58'29"S, 56°38'47"W	27/10/2011	9,89	4060	2,1	29,7	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP427740	18°58'29"S, 56°38'47"W	06/05/2012	9,64	8770	5,2	-	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP390917	18°58'29"S, 56°38'47"W	25/09/2005	9,85	19020	11,8	23,3	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP390919	18°58'29"S, 56°38'47"W	21/04/2006	10,16	2870	1,4	33,3	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP390922	18°58'29"S, 56°38'47"W	28/08/2006	10,09	12070	7,3	24,7	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP390927	18°58'29"S, 56°38'47"W	04/05/2007	10,19	3890	2,0	31,0	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina do Meio	SP390924	18°58'29"S, 56°38'47"W	16/11/2006	10,4	4380	2,3	36,1	<i>An. elenkinii</i>
Salina do Meio	SP390916	18°58'29"S, 56°38'47"W	28/06/2005	9,85	6850	3,9	21,7	<i>An. elenkinii</i>
Salina do Meio	SP390913	18°58'29"S, 56°38'47"W	08/05/2005	9,04	5500	3,1	25,0	<i>An. elenkinii</i>
Salina do Meio	SP390910	18°58'29"S, 56°38'47"W	14/10/2004	9,88	9030	5,3	24,2	<i>An. elenkinii</i>
Salina do Meio	SP390907	18°58'29"S, 56°38'47"W	10/05/2004	9,6	-	-	34,2	<i>An. elenkinii</i>
Salina da Reserva	SP400842	18°57'35"S, 56°37'18"W	09/05/2005	-	2380	1,1	22,9	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina da Reserva	SP401692	18°57'35"S, 56°37'18"W	19/08/2009	9,68	11040	6,6	34,1	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina da Reserva	SP427741	18°57'35"S, 56°37'18"W	06/05/2012	10,10	5435	3,0	-	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Local - Lagoa	ID Herbário	Coordenada geográfica	Data de coleta	pH	Cond. elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Salin. (ups)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Espécie dominante*
Salina da Ponta	SP400843	18°58'56"S, 56°39'33"W	25/09/2005	9,9	5790	3,3	23,8	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina da Ponta	SP400845	18°58'56"S, 56°39'33"W	22/04/2006	9,8	864	0,1	32,8	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina da Ponta	SP400487	18°58'56"S, 56°39'33"W	28/08/2006	9,8	8970	5,3	22,8	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina da Ponta	SP400849	18°58'56"S, 56°39'33"W	17/11/2006	9,9	716	0,1	30,8	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina da Ponta	SP401691	18°58'56"S, 56°39'33"W	19/08/2009	9,22	8130	4,8	30,4	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina Pedra do Sol	SP427742	19°10'36"S, 56°57'44"W	26/08/2006	10,06	2100	0,9	28,0	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina Pedra do Sol	SP427743	19°10'36"S, 56°57'44"W	16/11/2006	10,23	12200	7,4	32,0	<i>An. elenkinii</i> , <i>Art. platensis</i>
Salina Pantanal	SP427747	18°55'40"S, 56°33'03"W	16/08/2009	-	-	-	-	<i>Art. platensis</i> , <i>An. elenkinii</i>
Salina Centenário	SP427277	19°28'39"S, 56°03'37"W	23/10/2011	9,64	1743	0,7	26,1	<i>An. elenkinii</i>
Salina da Botina	SP427278	19°26'38"S, 56°03'41"W	23/10/2011	9,18	1105	0,3	30,6	<i>An. elenkinii</i>
Salitrada Campo Dora	SP390925	18°58'05"S, 56°38'58"W	16/11/2006	8,42	1852	0,7	32,0	<i>Art. platensis</i> , <i>Spirulina subsalsa</i> , <i>An. elenkinii</i>
Baía da Sede Nhumirim	SP390926	18°59'37" S, 56°37'14" W	16/11/2006	7,84	2020	0,8	35,1	Apenas alguns tricomas de <i>A. elenkinii</i>

**An. elenkinii* = *Anabaenopsis elenkinii*; *Art. platensis* = *Arthrospira platensis*

Anabaenopsis elenkinii ocorreu em todas as amostras coletadas em lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, sendo abundante tanto nos períodos de seca quanto de cheia, em valores de pH que variaram de 9,0-10,4 (média 9,8), condutividade elétrica de 716-19020 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ (média 6413), salinidade 0,1-11,8 ups (média 3,7) e temperatura 21,7-36,1 $^{\circ}\text{C}$ (média 28,6) (**Tabela 12**). A ocorrência de florações desta espécie foram observadas principalmente nos períodos de seca nas lagoas Salina do Meio, Salina Pedra do Sol, Salina da Ponta e Salina da Reserva. Nas lagoas Salitrada Campo Dora e Baía da Sede Nhumirim a espécie ocorreu em apenas uma amostra (final do período de seca-início de chuva) com poucos indivíduos, em pH 8,4 e 7,8, condutividade 1852 e 2020 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$, salinidade 0,7 e 0,8 ups e, temperatura 32 e

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

35°C respectivamente (**Tabela 12**). Interessante notar que as lagoas salitradas e baías geralmente apresentam água doce e pH em torno do neutro (Mourão *et al.* 1988, Santos & Sant'Anna 2010) e nestas condições não foram encontrados exemplares de *A. elenkinii*. No entanto, durante períodos de longa estiagem como ocorreu em 2006 (Santos *et al.* 2007), estas lagoas podem apresentar maiores concentrações de nutrientes e elevados valores de pH (Almeida *et al.* 2011), o que permitiu a ocorrência de *A. elenkinii*. Este fato evidencia as observações feitas por Barbiéro *et al.* (2002) que mostraram que as águas das lagoas da Nhecolândia (salinas e baías) apresentam composição química semelhante, variando apenas na concentração de sais, que depende do grau de isolamento de cada lagoa, ação do pulso de inundação e processo de concentração evaporativa. Devido a essas mudanças biogeoquímicas nas águas, as comunidades biológicas refletem estas alterações e cada lagoa apresenta composição de microalgas e cianobactérias típicas (Santos 2008, Santos & Sant'Anna 2010, Santos *et al.* 2012, Malone *et al.* 2012, Almeida *et al.* 2011). Portanto, a dominância de *A. elenkinii* nas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia pode ser explicada pela especificidade de pH alcalino (9-11), elevada condutividade (geralmente maior que 1000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e temperaturas mornas (entre 22-36°C) para ocorrência da espécie. A dependência de pH alcalino para o crescimento de *A. elenkinii* foi comprovada experimentalmente por Santos *et al.* (2011) e será discutida em maior detalhe no tópico sobre ecofisiologia.

4.2. Caracterização morfológica de *Anabaenopsis elenkinii*

Tricomas solitários, curtos, 2-15(28) células, curvos, espiralados, raramente retos, formando (0)0,5-3(4) voltas completas, constrictos, não atenuados; envelope mucilaginoso hialino ou ausente; células cilíndricas, elípticas, com extremidades arredondadas, achatadas nos pontos de contato, 3,8-11,3 μm compr., (2,2)2,6-6,3 μm larg., $\text{Rc/l} = 1,1-3,6$; conteúdo celular verde-azul claro, granuloso, geralmente com aerótopos; heterocitos terminais solitários ou aos pares quando intercalar, esféricos, raramente alongados, 2,6-6,3 μm compr., 2,6-5,4 μm larg., $\text{Rc/l} = 0,8-1,2(1,5)$; acinetos esféricos a elípticos, solitários ou aos pares, distantes do heterocito, 6,2-11,7 μm compr., 4,7-8,9 μm larg., $\text{Rc/l} = 1,0-2,0$. (**Figura 4**)

Material examinado: BRASIL. Mato Grosso do Sul: Corumbá, Pantanal da Nhecolândia, **Salina do Meio**, 19-VIII-2009 K.R.S. Santos (SP400654), 27-X-2011 K.R.S. Santos (SP427290), 06-V-2012 C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna (SP427740), 25/09/2005 K.R.S.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Santos (SP390917), 21-IV-2006 K.R.S. *Santos* (SP390919), 28-VIII-2006 K.R.S. *Santos* (SP390922), 04-V-2007 K.R.S. *Santos* (SP390927), 16-XI-2006 K.R.S. *Santos* (SP390924), 28-VI-2005 K.R.S. *Santos* (SP390916), 08-V-2005 K.R.S. *Santos* (SP390913), 14-X-2004 K.R.S. *Santos* (SP390910), 10-V-2004 K.R.S. *Santos* (SP390907); **Salina da Reserva**, 09/05/2005 K.R.S. *Santos* (SP400842), 19-VIII-2009 K.R.S. *Santos* (SP401692), 06-V-2012 C.F.S. Malone & C.L. Sant'Anna (SP427741); **Salina da Ponta**, 25-IX-2005 K.R.S. *Santos* & C.F.S. Malone (SP400843), 22-IV-2006 K.R.S. *Santos* (SP400845), 28-VIII-2006 K.R.S. *Santos* (SP400487), 17-XI-2006 K.R.S. *Santos* (SP400849), 19-VIII-2009 K.R.S. *Santos* (SP401691); **Salina Pedra do Sol**, 26-VIII-2006 K.R.S. *Santos* (SP427742), 16-XI-2006 K.R.S. *Santos* (SP427743); **Salina Pantanal**, 16-VIII-2009 K.R.S. *Santos* (SP427747); **Salina Centenário**, 23-X-2011 K.R.S. *Santos* (SP427277); **Salina da Botina**, 23-X-2011 K.R.S. *Santos* (SP427278); **Salitrada Campo Dora**, 16-XI-2006 K.R.S. *Santos* (SP390925); **Baía da Sede Nhumirim**, 16-XI-2006 K.R.S. *Santos* (SP390926).

Discussões taxonômicas sobre *Anabaenopsis elenkinii* do Pantanal foram levantadas por Santos & Sant'Anna (2010) e Santos *et al.* (2011). De acordo com estes autores o material da natureza de *A. elenkinii* é morfologicamente similar a *A. hungarica* Halász devido ao pequeno número de células por tricoma (média 4, variando de 2 a 6) e pela forma cilíndrica de algumas células. Porém, o material brasileiro frequentemente apresenta tricomas mais longos, com até 12 células e células elípticas (Santos & Sant'Anna 2010) ou ainda tricomas com até 28 células, conforme observado no presente estudo para a lagoa Salina Pedra do Sol (**Figura 5; Tabela 13**). Além disso, os parâmetros métricos são bem distintos: *A. hungarica* possui tricomas com cerca de 2,5 µm de diâmetro e *A. elenkinii* em torno de 4,5 µm de diâmetro (Komárek 2005).

Conforme observado na **Tabela 13**, há sobreposição de medidas em todos os parâmetros morfométricos documentados para a descrição original de *A. elenkinii* (Miller 1923), com o material do Pantanal (de várias lagoas salinas) e também com o material do lago Texcoco (México) estudado por Ballot *et al.* (2008). Mas estas medidas diferem de *A. hungarica*, a espécie mais próxima morfologicamente. Estes resultados indicam, portanto, que os parâmetros morfométricos do material do Pantanal fazem parte da variabilidade natural de *A. elenkinii* e o número de células por tricoma, a forma e dimensão das células vegetativas, dos acinetos e dos heterocitos são as características morfológicas mais estáveis para distinguir *Anabaenopsis elenkinii* de *A. hungarica* e também das demais espécies do gênero.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Em relação à presença de aerótopos, foi observado em amostras do plâncton de diferentes lagoas salinas que ocorreram tricomas com e sem aerótopos (**Figura 5**: D-E, L-M). O cultivo desses tricomas com ou sem aerótopos, mostrou que nas condições de cultura os aerótopos estavam sempre presentes. No entanto, Santos *et al.* (2011) observaram que apenas eventualmente ocorreram tricomas sem aerótopos em material de cultura e esta condição foi relacionada à senescência dos tricomas em resposta ao pH neutro (7). Conforme demonstrado por Santos *et al.* (2011), é provável que na natureza a ocorrência de tricomas sem aerótopos se dê em resposta a mudanças no pH e/ou indique senescência dos tricomas. Desta forma, a ocorrência de tricomas com e sem aerótopos seria parte do ciclo de desenvolvimento de *A. elenkinii*. Portanto, a hipótese morfológica foi confirmada: a presença de aerótopos é facultativa em *Anabaenopsis elenkinii* e o hábito é planctônico.

Na **Tabela 13** foram incluídos os dados morfométricos de uma população de *Anabaenopsis arnoldii* Aptekar', coletada no Lago Texcoco (Nabor Carrilo, México). Trata-se de um táxon claramente distinto de *A. elenkinii* por apresentar células quase esféricas e dimensões superiores. O registro das características morfológicas desta espécie se fez importante para auxiliar na interpretação das análises filogenéticas que serão discutidas no próximo tópico.

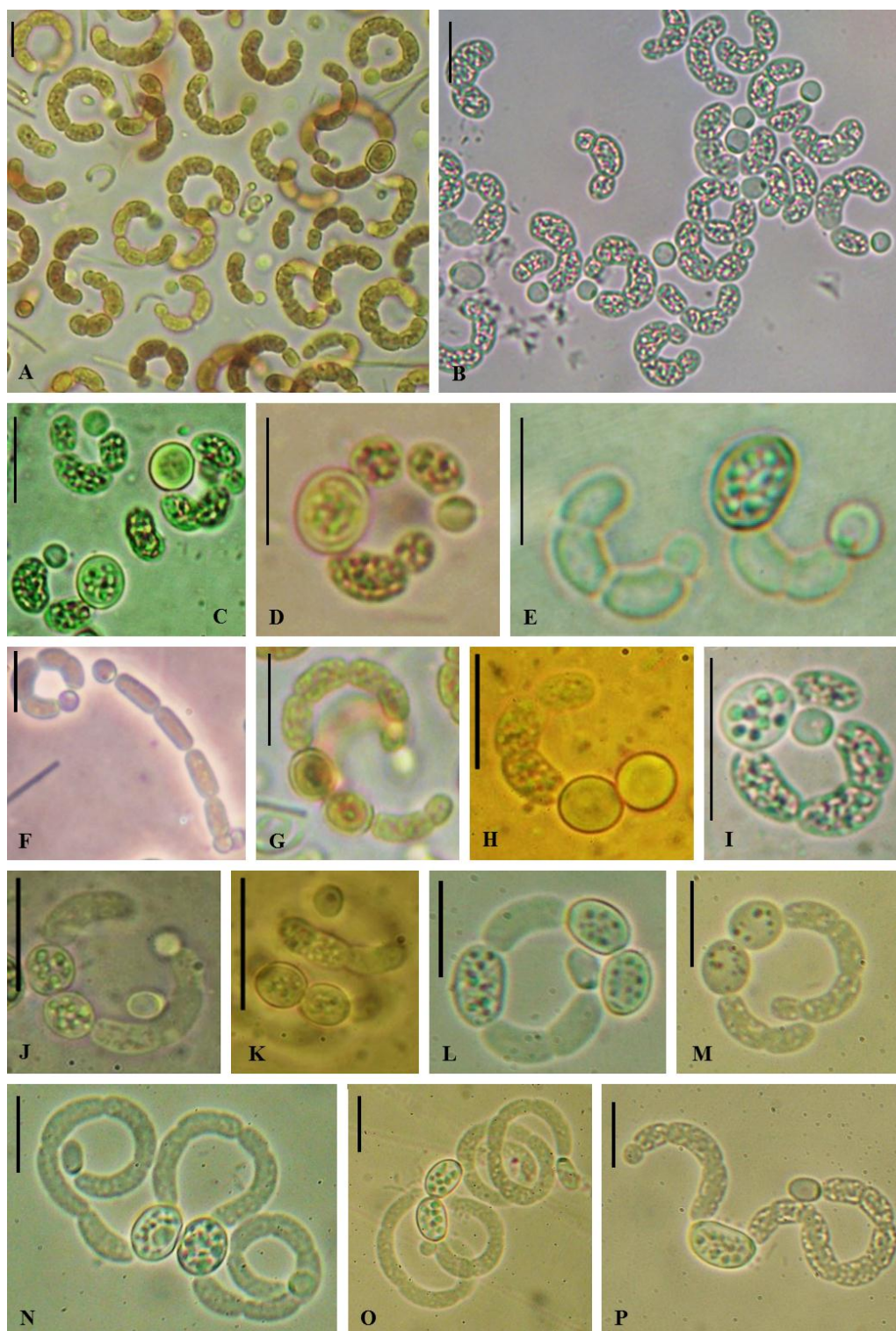
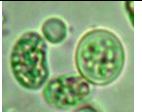
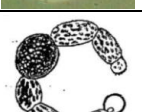


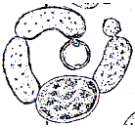
Figura 5. *Anabaenopsis elenkinii* em amostras da natureza das lagoas Salina do Meio (**A-G**), Salina da Ponta (**H-I**), Salina da Reserva (**J-K**) e Salina Pedra do Sol (**L-P**). Para todas as lagoas foram observados tricomas com acinetos isolados (**C-E, I, P**) e aos pares (**G, H, J-O**), e tricomas com aerótopos (**B-D**) e sem aerótopos (**E, F, L, N**). Tricomas retos (**F**) são de ocorrência rara. Escalas = 10 µm.

CAPÍTULO 3 – *Anabaenopsis*

Tabela 13. Características morfológicas de *Anabaenopsis elenkinii* proveniente de diversas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, comparadas com as do material tipo de *A. elenkinii* Miller (1923), com o material do México e com *A. hungarica* Halász. Foi adicionado *A. arnoldii* coletado no México para comparação. Números representam a amplitude mínima e máxima e entre parênteses a média $\pm$ desvio padrão; - = não observado ou não documentado.

	Características do tricoma				Células vegetativas			Heterocitos			Acinetos			Ilustração típica
	Nº de espiras por tricoma	Nº de células por tricoma	Altura do tricoma (µm)	Distância entre espiras (µm)	Comp. (µm)	Largura (µm)	Razão comp./larg.	Comp. (µm)	Largura (µm)	Razão comp./larg.	Comp. (µm)	Largura (µm)	Forma	
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Salina do Meio	0,2-1,2 (0,6 $\pm$ 0,3)	2-12 (4 $\pm$ 1,2)	11-16 (13 $\pm$ 1,5)	-	4,0-10,0 (6,9 $\pm$ 1,2)	3,3-6,3 (4,7 $\pm$ 0,5)	0,9-2,6 (1,5 $\pm$ 0,3)	2,6-5,0 (3,5 $\pm$ 0,5)	2,6-4,9 (3,5 $\pm$ 0,4)	0,8-1,2 (1,0 $\pm$ 0,06)	6,5-9,0 (7,8 $\pm$ 0,4)	6,5-8,0 (6,8 $\pm$ 0,1)	Esférico a elíptico	
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Salina da Reserva	0,5-3,0 (1,3 $\pm$ 0,6)	5-15 (9 $\pm$ 2,5)	17-27 (22 $\pm$ 2,4)	7,4-11,0 (8,6 $\pm$ 1)	5,1-11,6 (7,2 $\pm$ 1,3)	2,2-6,0 (4,0 $\pm$ 0,9)	1,1-3,6 (1,9 $\pm$ 0,5)	3,4-6,3 (4,9 $\pm$ 0,9)	3,4-5,4 (4,2 $\pm$ 0,7)	1,0-1,4 (1,2 $\pm$ 0,1)	7,0-11,7 (9,0 $\pm$ 1,2)	4,7-8,9 (6,7 $\pm$ 0,8)	Esférico a elíptico	
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Salina da Ponta	0,5-3,0 (1,1 $\pm$ 0,5)	3-15 (7 $\pm$ 2,6)	11-22 (16 $\pm$ 2,7)	4,6-8,2 (6,3 $\pm$ 0,9)	5,1-10,2 (7,2 $\pm$ 1,1)	2,7-5,9 (4,3 $\pm$ 0,7)	1,2-2,8 (1,7 $\pm$ 0,4)	3,2-5,8 (4,0 $\pm$ 0,6)	3,0-4,3 (3,7 $\pm$ 0,3)	1,0-1,5 (1,1 $\pm$ 0,1)	6,2-10,0 (7,4 $\pm$ 1,0)	5,5-6,6 (6,0 $\pm$ 0,3)	Esférico a elíptico	
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Salina Pedra do Sol	0,8-4,0 (2,1 $\pm$ 0,5)	5-28 (7 $\pm$ 2,6)	13-27 (20 $\pm$ 2,7)	4,2-8,3 (7,1 $\pm$ 0,8)	5,1-10,8 (6,9 $\pm$ 1,2)	2,8-5,9 (4,4 $\pm$ 0,7)	1,2-2,9 (1,7 $\pm$ 0,4)	3,2-5,8 (3,8 $\pm$ 0,6)	3,0-4,3 (3,7 $\pm$ 0,3)	1,0-1,5 (1,1 $\pm$ 0,1)	6,2-10,0 (7,4 $\pm$ 1,0)	5,5-6,6 (6,0 $\pm$ 0,3)	Esférico a elíptico	
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Material tipo da Rússia (Miller 1923)	0,75-2,5	-	-	-	-	4,6-5,7	1,25-2	-	4,6-6,7	-	9,3-12	8,3-10,7	Esférico ou elíptico	
<i>A. elenkinii</i> AB2006/20 Texcoco – México (Ballot et al. 2008)	-	<18	-	-	3,2-9,6 (6,1)	3,2-4,8 (4,1)	-	3,6-5,6 (4,6)	3,6-5,2 (4,3)	-	5,6-12,0 (8,7)	5,6-10,0 (6,5)	Esférico a elíptico	

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

	Características do tricoma				Células vegetativas			Heterocitos			Acinetos			Ilustração típica
	Nº de espiras por tricoma	Nº de células por tricoma	Altura do tricoma (µm)	Distância entre espiras (µm)	Comp. (µm)	Largura (µm)	Razão comp./larg.	Comp. (µm)	Largura (µm)	Razão comp./larg.	Comp. (µm)	Largura (µm)	Forma	
<i>A. hungarica</i> Material tipo da Hungria (Halász 1939)		(2)4(6)	-	-	±7,5	2,5	-	±2,5-3,0	±2,5-3,0	1,0	5,5-9,5	2,6-4,2	Amplamente oval, levemente assimétrico	
<i>Anabaenopsis arnoldii</i> Lago Texcoco, México Coleta 27/02/2012 (col. Eberto Novelo, medidas A. Ballot)	0,5-2,0 (1,5 ±0,5)	10-23 (18 ±4)	26-46 (36 ±6,9)	-	2,9-8,8 (5,6 ±1,4)	5,0-8,4 (6,7 ±0,8)	0,5-1,4 (0,8 ±0,2)	6,0-8,1 (6,8 ±0,5)	6,3-8,3 (7,0 ±0,6)	0,9-1,1 (1,0 ±0,1)	-	-	-	

CAPÍTULO 3 – *Anabaenopsis*

4.3. Caracterização filogenética de *Anabaenopsis elenkinii*

Pela primeira vez linhagens de *Anabaenopsis* isoladas do território brasileiro foram estudadas do ponto de vista filogenético. Na **Tabela 14** são listadas as cepas de *Anabaenopsis elenkinii* isoladas e os genes sequenciados no presente estudo. Na **Tabela 15** são listadas as cepas de *Anabaenopsis* utilizadas nas análises filogenéticas das árvores do RNAr 16S e *cpcBA*-IGS obtidas do NCBI (GenBank), e algumas características ambientais do local de origem das cepas (quando disponível em literatura) também são apresentadas. Foi incluído nessas análises o sequenciamento da cepa *Anabaenopsis arnoldii* EN201201 coletada no Lago Texcoco, México (**Tabela 15**) para comparação.

Tabela 14. Lista de cepas de *Anabaenopsis* e genes sequenciados no presente estudo.

Espécie	ID Cepa	Lagoa - Data da coleta	ID Herbário	Origem	16S RNAr	<i>cpcBA</i> -IGS (ficocianina)
<i>A. elenkinii</i>	CCIBt1059	Salina do Meio 19/08/2009	SP400654	Pantanal, MS, Brasil	X	X
<i>A. elenkinii</i>	CCIBt3461	Salina da Reserva 19/08/2009	SP401692	Pantanal, MS, Brasil	X	X
<i>A. elenkinii</i>	CCIBt3462	Salina Pantanal 16/08/2009	SP427747	Pantanal, MS, Brasil	X	X
<i>A. arnoldii</i> *	EN201201	Lago Texcoco 27/02/2012	-	México	X	X

*Sequenciamento cedido pelo Dr. Andreas Ballot (coletor Dr. Eberto Novelo)

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Tabela 15. Lista de cepas de *Anabaenopsis* incluídas nas análises filogenéticas: em negrito as cepas sequenciadas no presente estudo; as demais sequências foram obtidas do NCBI (GenBank). Os dados de condutividade em *itálico* foram estimados a partir da salinidade, de acordo com a equação da reta extraída da tabela de conversão de Weyl (1964).

Identificação da cepa na coleção cultura	Número da cepa	Origem	pH	Sal. (ups)	Cond. elétrica (μS/cm)	ID GenBank RNAr 16S	ID GenBank <i>cpcBA</i> -IGS (ficocianina)
<i>A. elenkinii</i>	CCIBt1059	Salina do Meio, Pantanal, Brasil	9,47	6,3	10600	X	X
<i>A. elenkinii</i>	CCIBt3461	Salina da Reserva, Pantanal, Brasil	9,68	6,6	11040	X	X
<i>A. elenkinii</i>	CCIBt3462	Salina Pantanal, Pantanal, Brasil	-	-	-	X	X
<i>A. arnoldii</i>*	EN201201	Lago Texcoco, México	9,84	5,9	9840	X	X
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/37	Lago Sonachi, Quênia	10-10,4'	ca. 10,0	ca. 16000	AM773306	AM773291
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/34	Lago Sonachi, Quênia	10-10,4'	ca. 10,0	ca. 16000	AM773303	AM773288
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/36	Lago Sonachi, Quênia	10-10,4'	ca. 10,0	ca. 16000	AM773305	AM773290
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/35	Lago Sonachi, Quênia	10-10,4'	ca. 10,0	ca. 16000	AM773304	AM773289
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/17	Lago Nakuru, Quênia	9,8-10,4''	ca. 30,0	ca. 48000	AM773300	AM773285
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/16	Lago Elmenteita, Quênia	9,8-10,5''	ca. 30,0	ca. 48000	AM773299	AM773284
<i>A. elenkinii</i>	AB2002/20	Lago Texcoco (Nabor Carillo), México	-	-	-	AM773307	AM773292
<i>A. nadsonii</i>	2LT27S11	Lago Trasimeno (Umbria), Itália	-	-	-	FM177481	-
<i>A. nadsonii</i>	2LT27S06	Lago Trasimeno (Umbria), Itália	-	-	-	FM177482	-
<i>Anabaenopsis</i> sp.	PCC 9215	Lagoa costeira (Valência), Espanha	-	-	-	AY038033	-
<i>A. circularis</i>	LMECYA 205	Lagoa, Nafarros (Sintra), Portugal	-	-	-	EU078528	-
<i>A. circularis</i>	LMECYA 206	Lagoa, Nafarros (Sintra), Portugal	-	-	-	EU078529	-
<i>A. elenkinii</i>	NIVA CYA494	Canal Kazinga, Uganda	-	-	-	AM773293	AM773293
<i>A. elenkinii</i>	NIVA CYA501	Canal Kazinga, Uganda	-	-	-	AM773309	AM773294
<i>A. elenkinii</i>	AB2008/61	Lago Langer, Alemanha	-	-	-	-	FN552382
<i>A. (Cyanospira) abijatae</i>	AB2002/08	Lago Simbi, Quênia	-	-	-	AM773295	AM773280

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Identificação da cepa na coleção cultura	Número da cepa	Origem	pH	Sal. (ups)	Cond. elétrica (μS/cm)	ID GenBank RNAr 16S	ID GenBank <i>cpcBA</i> -IGS (ficocianina)
<i>A. (Cyanospira) abijatae</i>	AB2002/15	Lago Nakuru, Quênia	-	-	-	AM773298	AM773283
<i>Cyanospira capsulate</i>	CC87E	Lago Magadi, Quênia	-	-	-	FR774775	-
<i>Cyanospira capsulate</i>	CCAX	Lago Magadi, Quênia	-	-	-	FR774777	-
<i>Cyanospira rippkae</i>	CR86F5	Lago Magadi, Quênia	-	-	-	FR774773	-
<i>Cyanospira rippkae</i>	5NR8	Lago Chade (margem leste), Chade	-	-	-	FR774769	-

*coletor Dr. Eberto Novelo; *de acordo com Ballot *et al.* (2005); **de acordo com Ballot *et al.* (2004).

As árvores filogenéticas geradas com as sequências dos genes RNAr 16S (**Figura 6**) e *cpcBA*-IGS (**Figura 7**) apresentaram clados relacionados com a origem geográfica das cepas e tipo de ambiente, ambas as árvores indicam que as cepas de *Anabaenopsis* do Pantanal representam uma mesma espécie, claramente relacionada com linhagens de *A. elenkinii* provenientes de lagoas alcalinas e salobras do México (Lago Texcoco) e do continente africano (Quênia).

Apesar da clara delimitação dos clados Ia e Ib, a similaridade entre as linhagens desses clados foi >99,5% para o RNAr 16S e >97,2% para *cpcBA*-IGS (**Tabelas 16 e 17**, respectivamente), o que mostra que as linhagens do Pantanal/México e da África são filogeneticamente relacionadas. A formação desses clados indica que linhagens do grupo Ia e Ib estão em processo de diferenciação evolutiva recente, que pode vir a ser uma espécie críptica, mas ainda representam uma mesma unidade taxonômica correspondente ao morfotipo de *A. elenkinii*. Além disso, morfologicamente as cepas do Pantanal e do México são muito semelhantes (**Tabela 13**), assim como as características limnológicas destas lagoas (**Tabela 12**), inclusive com as características ambientais dos isolados de lagos africanos, o que corrobora com os dados moleculares.

De acordo com Stackebrandt & Goebel (1994) valores de similaridade de RNAr 16S maiores que 97,5% devem indicar que duas cepas de bactérias pertencem a uma mesma espécie. No entanto, Oren (2004) documentou a existência de diferentes espécies de bactéria com idêntica similaridade do RNAr 16S. Do mesmo modo, Fox *et al.* (1992) demonstraram que a análise de sequências de RNAr 16S não é necessariamente um bom marcador molecular para garantir a identidade em nível de espécie e que, embora as sequências 16S rRNA possam ser usadas rotineiramente para distinguir e estabelecer relações entre gêneros e espécies bem-

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

delimitadas, espécies que divergiram muito recentemente não podem ser reconhecíveis unicamente através deste marcador.

Conduto, o sequenciamento do 16S é fundamental para distinguir gêneros e tendências evolutivas em cianobactérias (Nubel *et al.* 2000, Fiore *et al.* 2007, Ballot *et al.* 2008), e inclusive a ocorrência de espécie críptica (Casamatta *et al.* 2003, Kastovsky & Johansen 2008, Komárek & Marés 2012).

Considerando que o outro gene utilizado nessa pesquisa, *cpcBA*-IGS, é reconhecido pelo seu potencial em apresentar maior variabilidade, e ser útil na diferenciação de linhagens de cianobactérias em nível de espécie (Neilan *et al.* 1995, Bolch *et al.* 1996), nossos resultados mostraram que a topologia da árvore filogenética deste gene (**Figura 7**) foi praticamente idêntica à observada para o 16S (**Figura 6**) e ambas indicam que as linhagens do Pantanal/México estão em processo de diferenciação recente.

Caso semelhante de formação de clados por origem geográfica foi documentado para *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju no qual linhagens de diferentes regiões do mundo foram agrupadas em três grandes grupos, o primeiro das Américas, o segundo da Europa e o terceiro com cepas da Austrália, e ainda assim representa um caso típico de dispersão de uma mesma espécie e não necessariamente indica a formação de espécies crípticas (Neilan *et al.* 2003).

Vale destacar que nas árvores filogenéticas, as cepas de *A. elenkinii* do Quênia foram isoladas do Lago Sonachi - AB2002/34, AB2002/35, AB2002/36, AB2002/37 - (pH 10-10,4; condutividade elétrica ca. 16.000 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$), do Lago Elmenteita – AB2002/16 - (pH 9,8-10,5; cond. ca. 30.000 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$) e do Lago Nakuru - AB2002/17 - (pH 10,24; cond. 37.500 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$) (Ballot *et al.* 2004, 2005, 2008), lagos que apresentam características físico-químicas semelhantes às encontradas nas salinas do Pantanal, com exceção dos valores de condutividade dos Lagos Nakuru e Elmenteita, que são de 2 a 3 vezes maiores que o encontrado nas salinas do Pantanal (**Tabela 12**, **Tabela 15**). Tais semelhanças das condições ambientais evidenciam a tolerância de *A. elenkinii* às condições extremas de pH alcalino (9-10,4) e alta condutividade elétrica nesses lagos tropicais.

A hipótese dos clados Ia ou Ib (**Figuras 6 e 7**) representarem espécies crípticas relacionadas ao morfotipo *A. elenkinii* ainda não pode ser respondida, considerando as elevadas similaridades filogenéticas e a sobreposição de características ecológicas dos isolados, tanto do Pantanal/México, quanto da África. Assim, consideramos que apesar de haver variabilidade genética entre diferentes populações, esta variabilidade é pequena, e *A.*

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

elenkinii parece ser uma espécie “jovem”, nos primeiros estágios de evolução, onde a existência de espécies crípticas ainda é uma incógnita.

Considerações semelhantes foram levantadas recentemente por Dvorák *et al.* (2012), ao observarem sobreposição de caracteres morfológicos, origem geográfica e tipo de hábitat de diferentes linhagens de *Microcoleus vaginatus* provenientes de três continentes.

Kastovsky & Johansen (2008), ao estudarem as relações filogenéticas entre cepas de *Mastigocladus laminosus*, demonstraram a dificuldade em caracterizar uma espécie críptica. De acordo com esses autores, a baixa similaridade (97%) observada entre duas cepas morfológicamente indistinguíveis, indica que são duas espécies crípticas distintas, apesar dos autores ainda não possuírem dados suficientes para propor estes táxons como espécies distintas.

No presente estudo as seguintes hipóteses filogenéticas foram confirmadas: 1) A variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e *cpcBA*-IGS (ficocianina) corrobora com a variabilidade fenotípica das espécies de *Anabaenopsis*; e, 2) As populações de *Anabaenopsis elenkinii* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético na árvore do RNAr 16S. No entanto, a hipótese de haver espécies crípticas no gênero *Anabaenopsis* relacionadas ao morfotipo de *A. elenkinii* e diferenciadas quanto ao hábitat e origem geográfica, não pode ser confirmada conforme os argumentos apresentados acima. Portanto, estudos devem ser realizados para compreender a diversidade intraespecífica e o significado evolutivo deste importante gênero de cianobactéria de lagoas alcalinas tropicais.

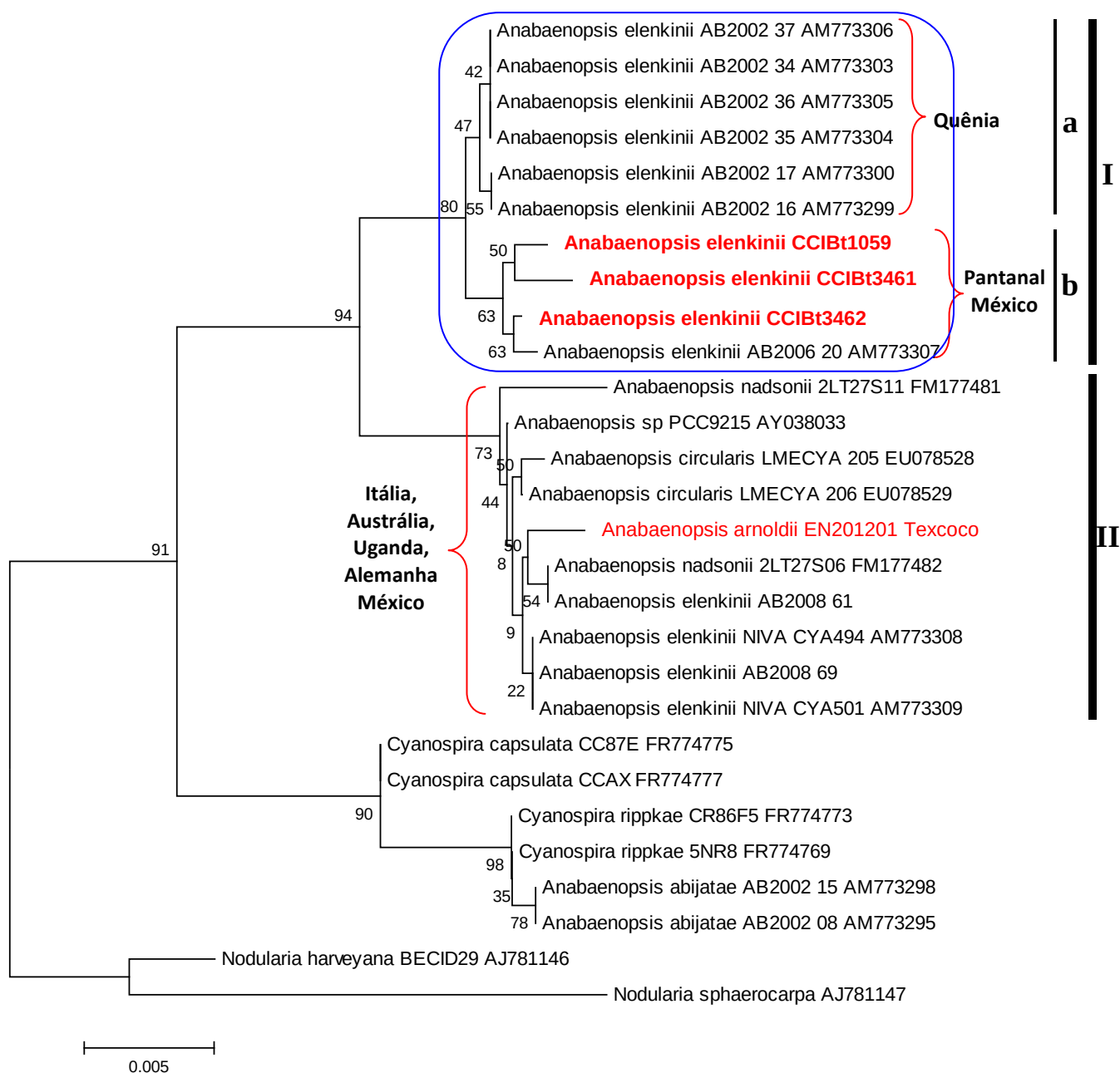


Figura 6. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do gene do gene RNAr 16S (1200 pb). Em vermelho as cepas de *Anabaenopsis* estudadas. Valores de porcentagem de reamostragem (1000x) são apresentados na base dos clados.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

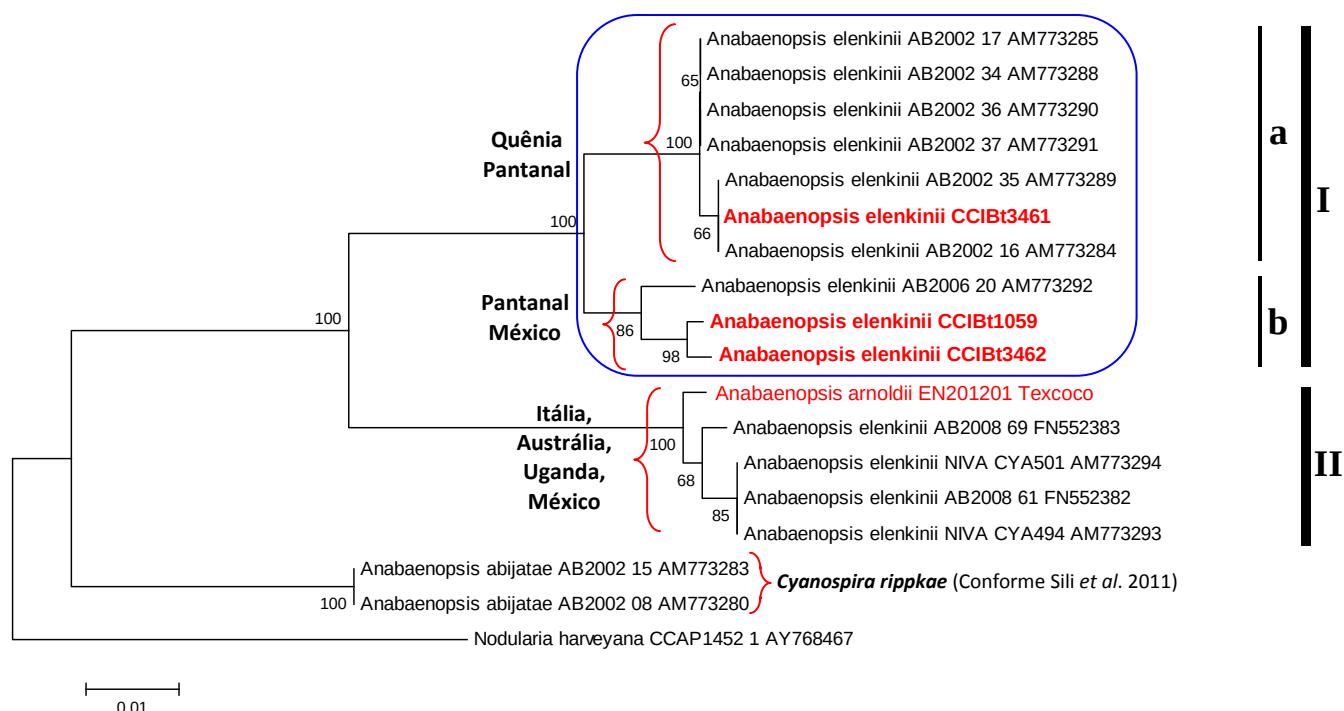


Figura 7. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do operon da ficocianina – *cpcBA-IGS* (473 pb). Em vermelho as cepas de *Anabaenopsis* estudadas. Valores de porcentagem de reamostragem (1000x) são apresentados na base dos clados.

Tabela 16. Similaridade (%) *p*-distans entre o clado I a,b e o clado II do gene **RNAr 16S** (ver Figura 6).

Clados	Clado I a	Clado I b	Clado II
Clado I a	99,9-100,0		
Clado I b	99,5-99,7	99,6-99,8	
Clado II	92,2-92,7	97,8-98,9	99,4-100,0

Tabela 17. Similaridade (%) *p*-distans entre o clado I a,b e o clado II do operon da ficocianina - *cpcBA-IGS* (ver Figura 7).

Clados	Clado I a	Clado I b	Clado II
Clado I a	99,9-100,0		
Clado I b	97,2-97,6	98,7-99,6	
Clado II	91,7-92,4	92,2-92,7	99,2-100,0

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

4.4. Estudos ecofisiológicos com *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059

Na **Figura 8** são apresentadas as curvas de crescimentos de todos os tratamentos para *A. elenkinii* e na figura 9 são apresentadas as curvas de crescimento e a razão densidade de heterocito/célula vegetativa (= frequência de heterocitos) para cada tratamento: concentração de nitrato (T.1 e T.2), temperatura (T.3 e T.4) e pH (T.5 e T.6) comparados à condição controle. As curvas de crescimento em biovolume apresentaram o mesmo comportamento que a de densidade de células, portanto, optamos em apresentar as curvas em densidade de células.mL⁻¹ para permitir comparação com os dados de frequência de heterocitos (**Figura 9**).

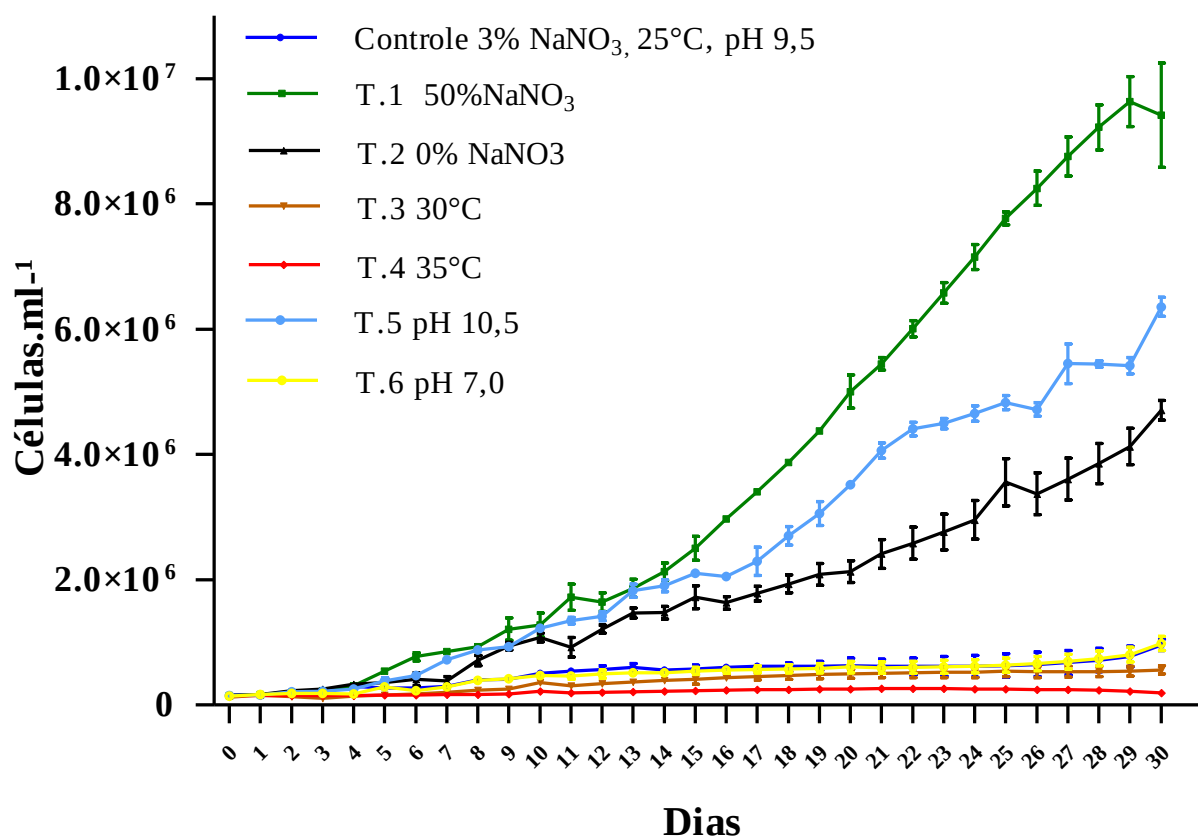


Figura 8. Curvas de crescimento de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 nos diferentes tratamentos testados. Meio BG11 modificado, fotoperíodo 12-12h luz-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n = 3$).

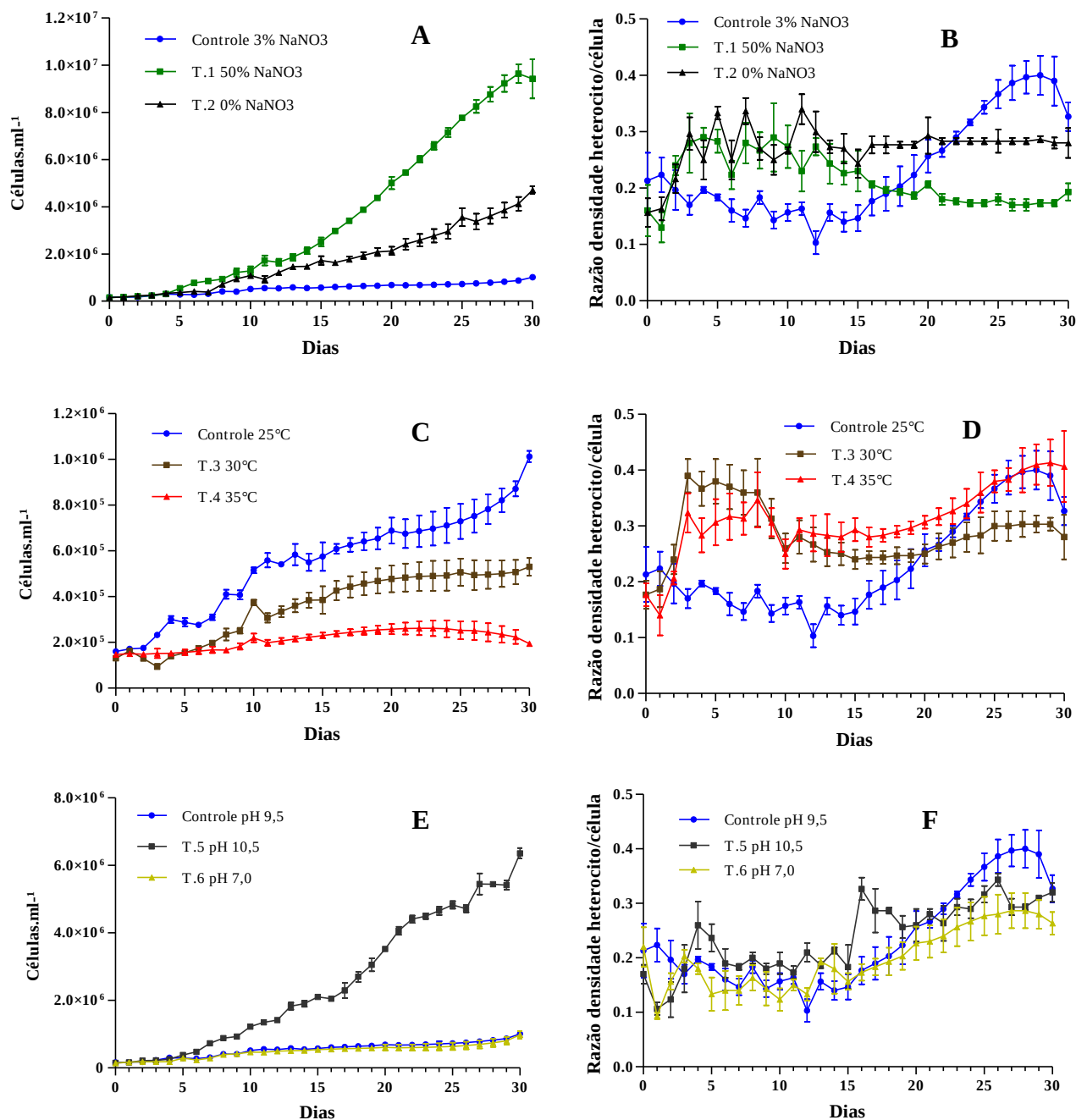


Figura 9. Curvas de crescimento (gráficos da esquerda) e razão densidade de heterocito/célula vegetativa (gráficos da direita) de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 nos diferentes tratamentos comparados à condição controle (BG-11 3% NaNO₃, pH 9,5, temperatura 25°C). **A-B.** Efeito da concentração de nitrato; **C-D.** Efeito da temperatura; **E-F.** Efeito do pH.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

4.5. Efeitos da disponibilidade de nitrogênio (Nitrato de Sódio- NaNO_3) sobre o desenvolvimento de *A. elenkinii*

Na **Tabela 18** e **Figura 10** estão apresentadas as taxas de crescimento calculadas para a fase exponencial de cada tratamento e também o rendimento celular obtido ao final do experimento (30 dias).

Tabela 18. Fase de crescimento exponencial, taxa máxima de crescimento, tempo de duplicação e rendimento celular de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 nos diferentes tratamentos. Meio BG-11 modificado, fotoperíodo 12-12h luz-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Médias ($n=3$) seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$).

Tratamentos	Fase exponencial (dias)	Taxa máxima de crescimento (μ ; dia^{-1})	Tempo de duplicação (dias)	Rendimento celular 30 dias (cells.ml^{-1})
Controle* (3% NaNO_3 , pH 9,5, 25°C)	3 – 10	0,11 ^a	6,26 ^a	800.833 ^a
T.1 (50% NaNO_3)	3 – 14	0,19 ^{bd}	3,67 ^{bd}	9.265000 ^b
T.2 (0% NaNO_3)	7 – 10	0,31 ^c	2,01 ^c	4.549166 ^c
T.3 (30°C)	3 – 10	0,15 ^{abd}	4,61 ^{abd}	431.250 ^d
T.4 (35°C)	8 – 10	0,13 ^{ab}	5,28 ^{ab}	46.666 ^e
T.5 (pH 10,5)*	4 – 12	0,21 ^d	4,56 ^d	6.210833 ^f
T.6 (pH 7,0)*	6 – 10	0,17 ^{abd}	2,67 ^{abd}	839.166 ^a

*Dados recalculados de Santos *et al.* (2011)

A maior taxa máxima de crescimento ocorreu no tratamento com ausência da fonte de nitrogênio (T.2), que diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao controle (3% de NaNO_3) e ao tratamento com maior disponibilidade de nitrogênio no meio (T.1). A elevada taxa de crescimento de *A. elenkinii* CCIBt1059 na ausência de nitrogênio (T.2), pode ser explicada pelo aumento na frequência de heterocitos (**Figura 9**, A-B). A frequência dessas células especializadas na fixação de nitrogênio atmosférico passou de 15% no início do experimento para 33% no sétimo dia de cultivo no T.2 (**Figura 9**, B), o que deve ter contribuído com a disponibilidade de nitrogênio para as células vegetativas, favorecendo o crescimento exponencial do sétimo ao décimo dia (**Tabela 18**, **Figura 9**, A). Por outro lado, durante o crescimento exponencial a frequência de heterocitos diminuiu de 33% (7º dia) para 27% (10º dia), o que deve ter provocado déficit de nitrogênio e redução na multiplicação celular,

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

culminando com o fim do crescimento exponencial. Coincidentemente com a redução na multiplicação celular (10° para 11° dia – **Figura 9, A**) houve aumento significativo na frequência de heterocitos, 27% (10° dia) para 34% (11° dia – **Figura 9, B**) neste tratamento (T.2). Esta relação inversamente proporcional entre frequência de heterocito e multiplicação celular, indica que há um balanço entre a demanda por nitrogênio para permitir aumento da multiplicação celular e a capacidade de diferenciação de heterocitos para suprir esta demanda em meio limitado por nitrogênio. A mesma tendência de redução na frequência de heterocito durante o crescimento exponencial foi observada para condição controle (**Figura 9, A-B**).

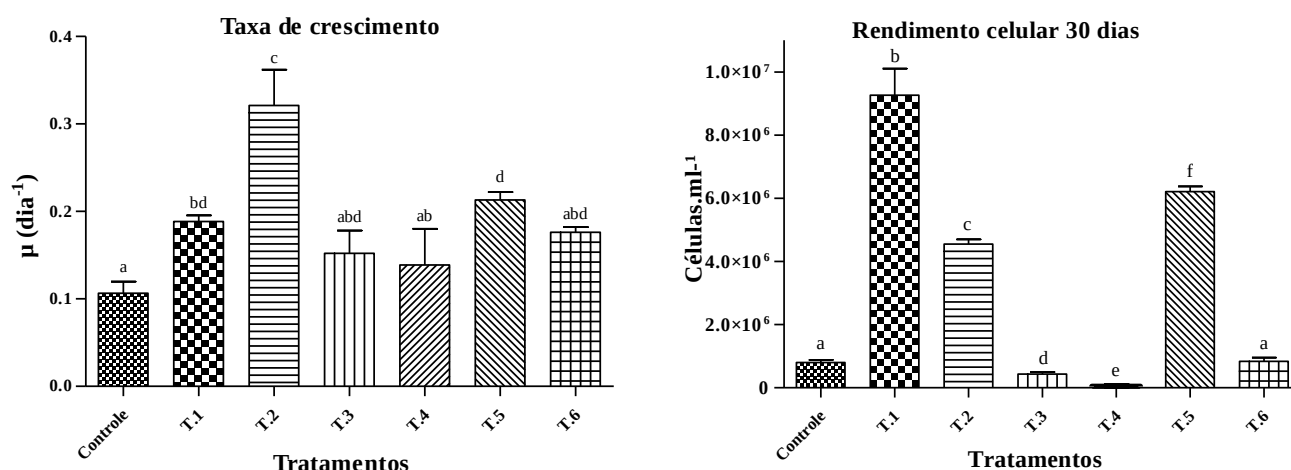


Figura 10. Taxa máxima de crescimento e rendimento celular (30° dia) de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 nos diferentes tratamentos (meio BG-11 modificado, fotoperíodo 12-12h luz-escuro, irradiância 80-100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

No tratamento com maior disponibilidade de nitrogênio (T.1), a frequência de heterocitos durante a fase exponencial de crescimento foi semelhante ao observado para o tratamento com ausência de nitrogênio e, portanto, maior que o observado para a condição controle (**Figura 9, A-B**). No entanto, a partir do 15° dia a frequência de heterocito no T.1 foi significativamente menor que no T.2, e a partir do 19° dia menor que na condição controle, evidenciando que a disponibilidade de nitrogênio no meio e as fases de crescimento influenciaram a frequência de heterocitos em *A. elenkinii*. Assim, a seguinte relação pode ser estabelecida: quanto maior a disponibilidade de nitrogênio, menor a frequência de heterocitos (evidenciada de forma mais clara a partir do 15° dia de cultivo) e, quanto menor a

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

disponibilidade de nitrogênio, maior a frequência de heterocitos desde os primeiros dias de cultivo (**Figura 9, A-B**).

Aumento na frequência de heterocitos em resposta a redução na concentração de nitrogênio foi documentada, por exemplo, para oito cianobactérias estudadas por Zapomelová *et al.* (2008): *Anabaena planctonica* Brunnthaler, *Anabaena sphaerica* f. *conoidea* Elenkin, *Anabaena spiroides* Klebahn, *Aphanizomenon gracile* (Lemmermann) Lemmermann, *Nostoc* sp., *Scytonema* sp. e *Tolypothrix* sp; para *Anabaena planctonica* Brunnthaler por Wood *et al.* (2010); para *Anabaena cylindrica* Lemmermann por Adams & Carr (1981, 1989), para *Cylindrospermopsis raciborskii* por (Padisák 1997) entre outros. Devido à importância da fixação biológica de nitrogênio e a eficiente capacidade dos heterocitos fixarem nitrogênio atmosférico, diversos autores realizaram estudos de revisão sobre a formação de heterocitos em cianobactérias (Wolk 1996, Adams & Duggan 1999, Adams 2000). Contudo, para *A. elenkinii* os dados do presente estudo são inéditos.

Fazendo um paralelo com o ambiente marinho, onde a produtividade primária do fitoplâncton é predominantemente controlada pela disponibilidade de nitrogênio (limitado por nitrogênio), a fixação biológica de nitrogênio atmosférico poderia suprir esse déficit (Karl *et al.* 2002) e, portanto, poderíamos esperar que cianobactérias heterocitadas dominassem neste ambiente. No entanto, sabe-se que na região pelágica dos oceanos tropicais as cianobactérias heterocitadas são muito raras e dominam espécies do gênero não heterocitado *Trichodesmium*, que é capaz de fixar nitrogênio atmosférico através de mecanismos fisiológicos que não os heterocitos e podem ainda formar florações (Staal *et al.* 2003). De acordo com Staal *et al.* (2003) e Stal (2009), as cianobactérias heterocitadas são as formas dominantes em lagoas de água doce e salobra com déficit de nitrogênio em todas as regiões climáticas do mundo.

Como nas lagoas salinas do Pantanal o déficit de nitrogênio é considerado o fator limitante para o fitoplâncton (Mourão 1989, Medina-Júnior & Rietzler 2005), espera-se que cianobactérias heterocitadas sejam dominantes nestes sistemas, como de fato ocorre com a dominância de *A. elenkinii* nessas lagoas alcalinas (Santos & Sant'Anna 2010). No entanto, nossos resultados mostram que com abundância de nitrogênio no meio (T.1) esta espécie pode se multiplicar em maior profusão que na condição de déficit de nitrogênio (**Tabela 18, Figura 9, A**). Do ponto de vista ecofisiológico, é provável que esta resposta do crescimento de *A. elenkinii* às condições extremas de presença elevada (T.1) ou total ausência de nitrogênio (T.2) também ocorra nas condições da natureza. De acordo com Mourão (1989) e Medina-Júnior & Rietzler (2005), a concentração de nitrogênio total na lagoa Salina do Meio durante

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

o período de seca é de 2 a 3 vezes maior que no período de cheia e, conforme relatado por Santos & Sant'Anna (2010) e no presente estudo, florações de *A. elenkinii* foram observadas nesta mesma lagoa principalmente nos períodos de seca, o que evidencia a capacidade de aclimação desta espécie às variações sazonais que ocorrem nas lagoas salinas do Pantanal, justificando sua dominância tanto no período de seca como de cheia.

Recentemente, Dolman *et al.* (2012), ao realizarem um estudo em 102 lagos do norte da Alemanha, encontraram *A. elenkinii* em apenas 33 lagos que apresentavam maior enriquecimento de nutrientes, e demonstraram ainda que a maior dominância da espécie ocorreu nos lagos com baixa concentração de nitrogênio e elevada concentração de fósforo. Estas condições limnológicas são semelhantes às que ocorrem nas lagoas salinas do Pantanal (Mourão 1989, Medina-Júnior & Rietzler 2005) e corroboram com a especificidade ecológica que *A. elenkinii* apresenta.

Em relação aos parâmetros morfométricos, selecionamos a largura das células vegetativas e heterocitos (caracteres taxonômicos mais utilizados para diferenciar as espécies de *Anabaenopsis*) para ilustrar o efeito dos tratamentos sobre estas características. Conforme observado na **Figura 11**, existe clara tendência de aumento da largura celular durante a fase exponencial de crescimento e redução significativa durante a fase estacionária. Comparado ao material da natureza (Salina do Meio, coleta 19/08/2009), a largura das células vegetativas foi significativamente maior durante a fase de crescimento exponencial no controle, T.1 e T.2 (**Figura 11**, A-B), e durante a fase estacionária houve redução na largura celular em todos os tratamentos, aproximando-se dos valores observados na amostra da natureza. Esta observação parece indicar que a população de *A. elenkinii* encontrava-se na fase estacionária de crescimento na ocasião da coleta na lagoa Salina do Meio. No entanto, Santos *et al.* (2011) ao estudarem o efeito do pH nesta mesma espécie, encontraram diferenças significativas na largura celular tanto na fase exponencial quanto estacionária ao comparar com o material da natureza, e os maiores valores de largura celular também foram observados na fase exponencial de crescimento. Apesar da ampla variação na largura das células e heterocitos na condição de cultura, esta variabilidade permanece dentro do documentado para a espécie (ca. 4-6 µm larg. células e ca. 3-5 µm larg. heterocitos), portanto considerada como parte da variabilidade morfológica de *A. elenkinii* (**Figuras 11 e 12**).

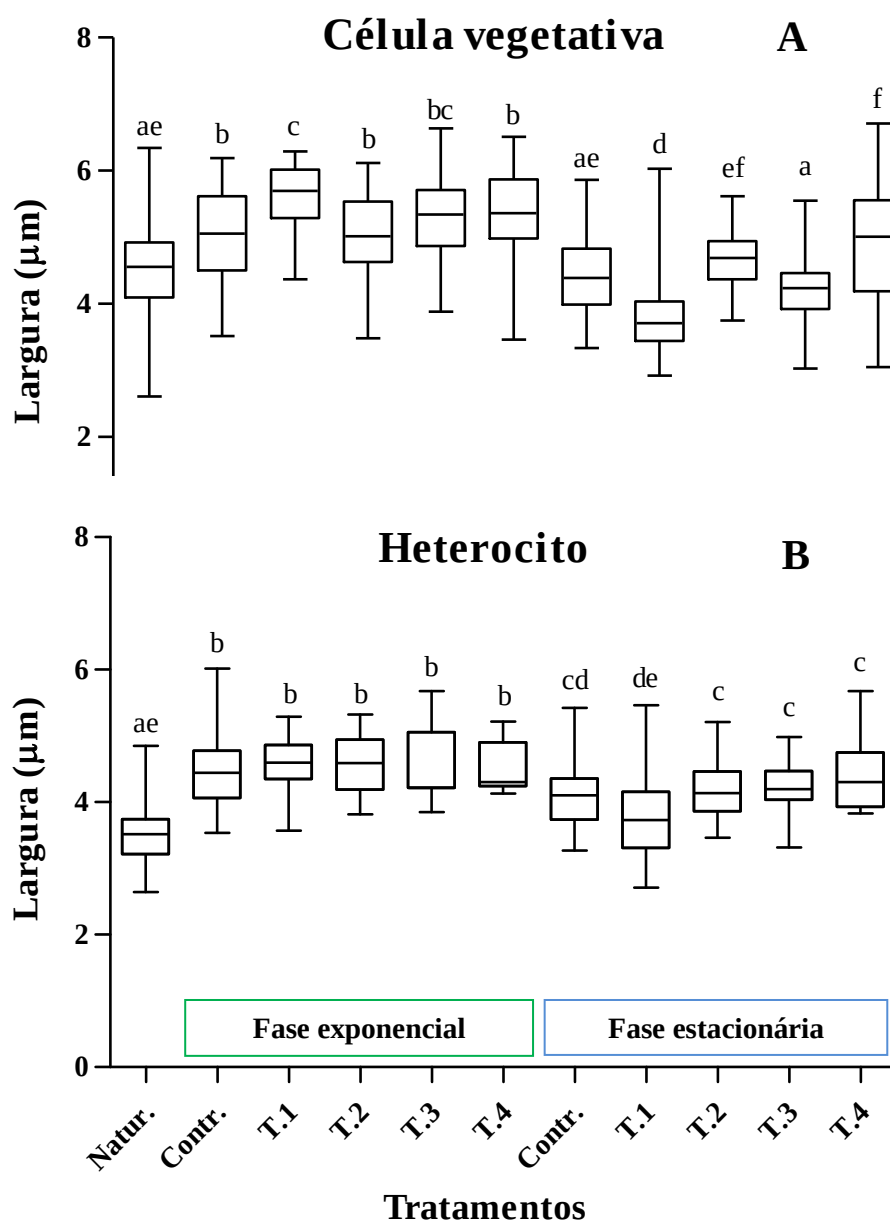


Figura 11. Variabilidade da largura das células vegetativas (A) e heterocitos (B) de *Anabaenopsis elenkinii* em amostra da natureza (Salina do Meio) e em diferentes tratamentos nas fases de crescimento exponencial e estacionária. Caixas simbolizam médias e desvio padrão (95% de ocorrência), linha no interior das caixas representa a média dos valores, e as barras verticais indicam valores mínimo e máximo observados. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

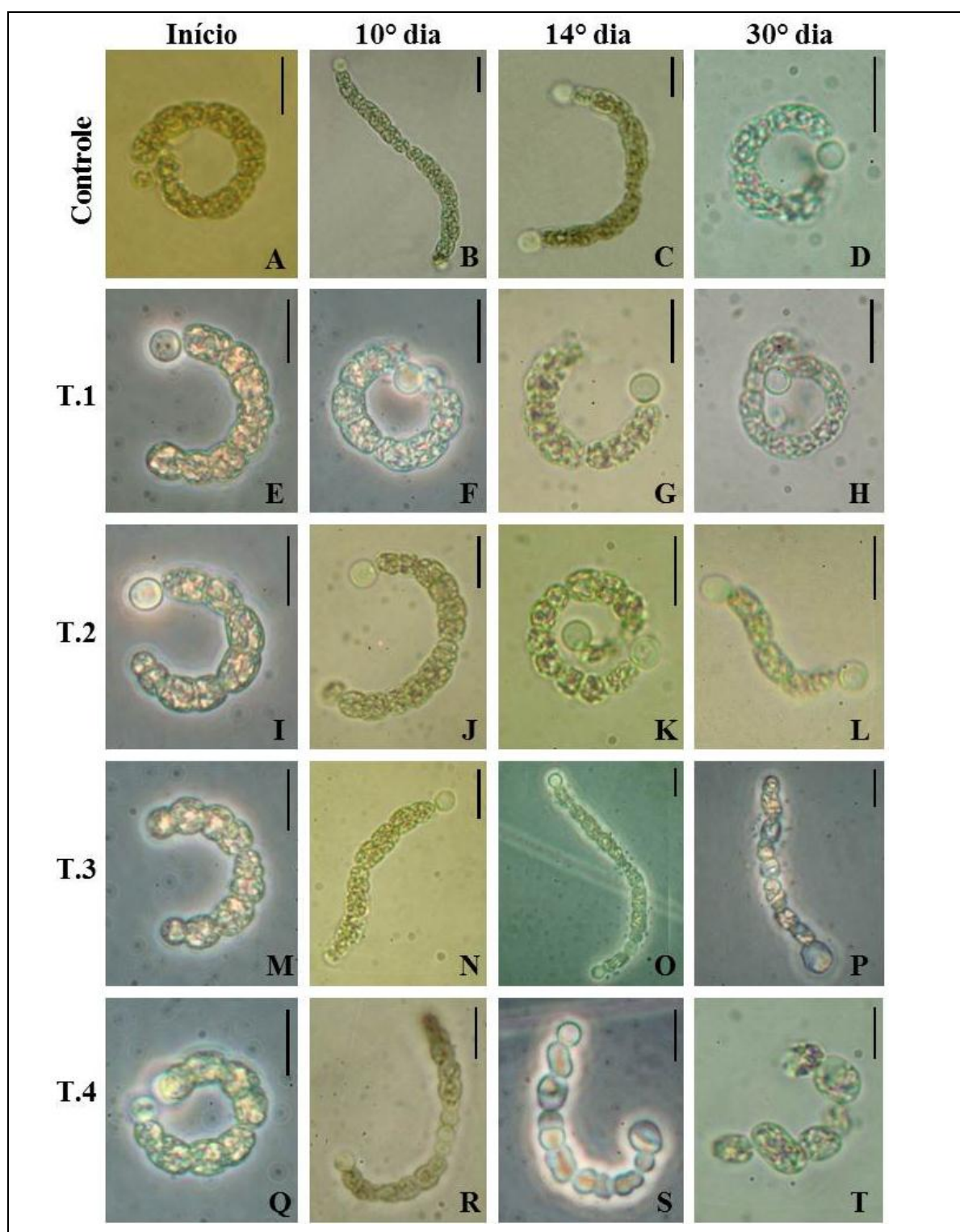


Figura 12. Aspecto geral dos tricomas de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 em diferentes condições de cultura e dias de crescimento. **A-D.** Condição controle, meio BG-11 3% NaNO₃, pH 9,5, temperatura 25°C; **E-H.** Tratamento 1, BG-11 50% NaNO₃; **I-L.** Tratamento 2, BG-11 0% NaNO₃; **M-P.** Tratamento 3, temperatura 30°C; **Q-T.** Tratamento 4, temperatura 35°C. Escalas = 10µm.

4.6. Efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento de *A. elenkinii*

Em relação à temperatura, apesar das taxas de crescimento não apresentarem diferenças estatísticas entre os tratamentos controle (25°C), T.1 (30°C) e T.4 (35°C), o rendimento celular foi claramente distinto entre as diferentes temperaturas testadas (**Tabela 18, Figura 9**). O maior rendimento celular foi observado na temperatura de 25°C, que foi cerca de 2 vezes superior ao observado à 30°C e cerca de 17 vezes maior que o observado à 35°C (**Tabela 18, Figura 9**). Esses resultados mostram que a temperatura ótima para o crescimento de *A. elenkinii* é de 25°C e as temperaturas de 30 e 35°C limitam o seu crescimento.

Considerando que nossos resultados mostram efeito negativo do aumento da temperatura sobre o crescimento de *A. elenkinii*, um provável aquecimento global da ordem de 1,4 a 5,8°C nos próximos 100 anos (IPCC 2007) poderia ocasionar redução do crescimento de *A. elenkinii* nas lagoas salinas do Pantanal e até mesmo permitir a substituição de espécies. Este fato poderá trazer importantes modificações para os processos biológicos e biogeoquímicos destas lagoas alcalinas tropicais e, ainda, poderá favorecer a dispersão de *A. elenkinii* para regiões com temperaturas mais amenas, como os países de regiões temperadas (Wiedner *et al.* 2007).

Apesar do consenso científico de que o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias pode estar relacionado com as mudanças climáticas globais (Paer & Huisman 2008), temperaturas elevadas também podem impedir a formação de florações. Contudo, devemos ser cautelosos nessas considerações, visto que em condições naturais, além da temperatura, diversos outros fatores podem interferir no crescimento das espécies, como luz, nutrientes, pH, entre outros.

A frequência de heterocitos durante a fase de crescimento exponencial (até 10º dia) nas temperaturas 30°C e 35°C foi estatisticamente semelhante. Em ambas as temperaturas ocorreram maior proporção de heterocitos que na condição controle (25°C) (**Figura 9, C-D**). Estes resultados mostram que o aumento da temperatura influenciou a diferenciação de heterocitos e a formação dessas células especializadas na fixação de nitrogênio deve contribuir com algum mecanismo fisiológico que sinaliza aumento na demanda de nitrogênio para reduzir o estresse de temperatura (considerando que essas temperaturas elevadas reduziram o crescimento da espécie – **Figura 9, C**).

O efeito da temperatura sobre a diferenciação de heterocito é algo mencionado na literatura apenas recentemente. De acordo com Zapomelová *et al.* (2008), a correlação entre a

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

frequência de heterocito e temperatura parece ter sido relatada pela primeira vez por estes autores. Tradicionalmente é sabido que a disponibilidade de nitrogênio influencia na formação de heterocitos (conforme discutido acima), mas o efeito da temperatura sobre a frequência de heterocitos ainda é uma novidade que precisa ser mais bem estudada.

O efeito da temperatura ainda não foi estudado para outros isolados de *Anabaenopsis elenkinii*, o que impossibilita comparação com nossos resultados. No entanto, diversos estudos foram realizados com outras espécies de cianobactérias, por exemplo, Saker & Griffiths (2000) estudaram o efeito da temperatura (de 20 a 35°C) sobre o crescimento de sete cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas do norte da Austrália e as maiores taxas de crescimento, para todas as cepas, foram observadas entre 25 e 30°C. O estudo realizado por Castro *et al.* (2004) nas temperaturas de 19 e 25°C sobre o crescimento de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada da Represa Billings (São Paulo, Brasil) documentou crescimento três vezes maior na temperatura de 25°C comparada ao cultivo em 19°C. Ainda em relação a *C. raciborskii*, o estudo recente de Bittencourt-Oliveira *et al.* (2012) com cepas espiraladas e retas isoladas do Brasil nas temperaturas de 21 e 31°C, mostrou que ambos os morfotipos apresentaram maiores taxas de crescimento na temperatura 31°C.

Efeitos do pH sobre o desenvolvimento de *A. elenkinii*

Os efeitos de diferentes valores de pH - 7, 9,5 e 10,5 - correspondentes aos tratamentos T.6, controle e T.5 respectivamente, sobre o desenvolvimento de *A. elenkinii* CCIBt1059 foi recentemente publicado por Santos *et al.* (2011) e fazem parte dos resultados obtidos no presente estudo (Anexo 1).

Neste trabalho, os autores apresentaram a primeira evidência experimental do efeito do pH no desenvolvimento e na morfologia de *A. elenkinii*, e comprovaram a dependência de pH altamente alcalino (10,5) para o desenvolvimento ótimo da espécie, mostrando que em valores de pH mais baixos (7 e 9,5), a limitação do crescimento pode ocorrer em termos de densidade celular e biomassa (**Tabela 18**). Quanto aos aspectos morfológicos, Santos *et al.* (2011) mostraram que ocorre ampla variação no comprimento e largura das células vegetativas e heterocitos, mas esta variação ainda encontra-se dentro da amplitude aceitável para *A. elenkinii*.

Santos *et al.* (2011) não encontraram acinetos em nenhum tratamento de pH estudado, e argumentaram que o pH não deve influenciar a diferenciação desta célula de resistência em *A. elenkinii*. No entanto, o efeito do pH influenciou na germinação de acinetos na espécie

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Anabaenopsis arnoldii (Reddy 1984), o que indica que a resposta a este parâmetro varia dependendo da espécie.

Semelhante ao observado nos tratamentos de pH (Santos *et al.* 2011), em nenhum dos demais tratamentos testados ocorreram acinetos. Estes resultados indicam que a formação de acinetos em *A. elenkinii* parece não estar ligada a mudanças no pH, disponibilidade de nitrogênio e temperatura, pelo menos nas amplitudes de variação testadas.

Considerando que os acinetos são formados sob condições de estresse ou quando as culturas se aproximam da fase estacionária (Moore *et al.* 2005, Everson *et al.* 2011), realizamos dois experimentos pilotos na tentativa de forçar condições de estresse em *A. elenkinii* CCIBt1059. No primeiro experimento, mantivemos a cepa sob luz contínua (80-100 $\mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$) durante 60 dias, e no segundo, a cepa foi mantida no escuro durante 40 dias. Para ambas as condições (luz contínua e escuro) a cepa foi mantida em meio BG-11 3% nitrogênio, temperatura 25°C, pH 10,5 (conforme T5) e observada a cada três dias. Para nossa surpresa, em nenhuma dessas condições testadas a cepa apresentou acinetos. Desta forma, a pergunta “quais fatores influenciam a formação de acinetos em *A. elenkinii*?”, permanece em aberto.

Vale destacar que nas amostras das lagoas salinas do Pantanal, tricomas com acinetos são comuns e ocorrem tanto em amostras em floração (principalmente nos períodos de seca) quanto em amostras com menor dominância desta espécie (períodos de cheia). Nas condições da natureza, deve haver algum fator sinalizador para a formação de acinetos e este fator parece estar relacionado com a competição entre outras espécies do fitoplâncton, principalmente a diatomácea dominante, *Craticula* cf. *buderi* (Hustedt) Lange-Bertalot e a cianobactéria não heterocitada *Arthrospira platensis*. Contudo, outros estudos precisam ser realizados para responder estas possibilidades.

4.7. Prospeção de substâncias bioativas

4.7.1. Estudos biológicos

a) Ensaios toxicológicos – Bioensaios em camundongos

1) Floração da lagoa Salina do Meio

As respostas fisiológicas aos extratos em ácido acético e metanólico da floração da lagoa Salina do Meio, observadas nos animais-teste, estão discriminadas na **Tabela 19**.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Tabela 19. Sinais de intoxicação e alterações macroscópicas apresentadas pelos camundongos após administração por via intraperitoneal de extratos em ácido acético e metanólico da floração da lagoa Salina do Meio (19/08/2009) formada pelas cianobactérias *Anabaenopsis elenkinii* (49% da densidade celular total) e *Arthrospira platensis* (17%), e pela diatomácea *Craticula cf. buderi* (34%).

Extrato	Sinais de intoxicação*	Tempo de observação	Principais achados <i>post-mortem</i>
Metanólico	Contração abdominal, dificuldade de locomoção (arrastar de patas traseiras) e piloereção (n=3), e, dispneia (n=2)	Eutanásia após 7 dias de observação	Nenhuma anormalidade aparente nos órgãos
Ácido acético	Agitação, coceira, piloereção, contração abdominal e dispneia (n=3), diarreia (n=2), e, dificuldade de locomoção (arrastar de patas traseiras) (n=1)	Eutanásia após 7 dias de observação	Hemorragia leve no fígado (n=1) do animal que apresentou arrastar de patas traseiras, os demais não apresentaram nenhuma anormalidade aparente nos órgãos

* Os sinais de intoxicação cessaram após 2 horas da administração.

2) *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059

As respostas fisiológicas ao extrato em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 observadas nos animais-teste, estão discriminadas na **Tabela 20**.

Tabela 20. Sinais de intoxicação e alterações macroscópicas apresentadas pelos camundongos após administração por via intraperitoneal do extrato em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059, no final do crescimento exponencial (12 dias) cultivado nas condições do T.5.

Extrato	Sinais de intoxicação*	Tempo decorrido até a morte	Principais achados <i>post-mortem</i>
<i>A. elenkinii</i> CCIBt1059 em ácido acético	Dispneia, piloereção, contrações abdominais, diarreia, dificuldade de locomoção (arrastar de patas traseiras), perda de reflexos	Eutanásia após 7 dias de observação	Pulmões hemorrágicos, fígado com bolhas

* Os sinais de intoxicação cessaram após 2 horas da administração.

Estes resultados mostraram que o extrato bruto da lagoa Salina do Meio não apresenta toxicidade letal para camundongos. No entanto, o arrastar de patas traseiras, observada no

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

extrato metanólico e a diarreia observada no extrato ácido acético, indicam que substâncias com diferentes atividades estão presentes na lagoa e podem ser provenientes da cianobactéria dominante *Anabaenopsis elenkinii* ou ainda do sinergismo desta espécie com a diatomácea *Craticula cf. buderi*, também abundante na amostra da lagoa Salina do Meio.

Conforme observado no bioensaio (**Tabela 20**), o extrato em ácido acético da cepa *A. elenkinii* CCIBt1059 também não foi tóxico (letal) para camundongos, considerando que não houve morte dos animais durante o período de observação padrão de sete dias (Harada *et al.* 1999). Apesar de não ocorrer morte dos animais-teste, a ocorrência de pulmões hemorrágicos e fígado com bolhas, indicam que o extrato em ácido acético de *A. elenkinii* CCIBt1059 apresenta algum metabólito que merece ser mais bem investigado.

Respostas semelhantes às observadas nos animais tratados com os extratos da floração da lagoa Salina do Meio e da cepa *A. elenkinii* CCIBt1059, foram também observadas nos estudos sobre drogas anticolinesterásicas com camundongos (McGleenon *et al.* 1999, Xavier 2008), e de acordo com esses autores, tais respostas estão relacionadas com ações muscarínicas e nicotínicas, bem como sobre o sistema nervoso central.

Entre as manifestações muscarínicas ocorrem dispnéia, cólicas abdominais e diarreia, entre as resultantes da hiperestimulação dos receptores nicotínicos destacam-se câibras musculares, fraqueza motora, taquicardia, paralisia e piloereção, e, entre aquelas devido ao sistema nervoso central, são tremores, ataxia e dificuldade em andar. O grau, a progressão e a persistência de observações clínicas dependem da via de administração, da estrutura do composto bioativo e da magnitude da exposição (Andrade Filho & Romano 2001).

A estrutura do composto define a natureza da ligação para a enzima acetilcolinesterase, que pode ser reversível ou irreversível, sendo que o composto intermediário de ação curta ou média apresenta efeito reversível, enquanto o de ação prolongada é irreversível. Esses compostos de ação prolongada são considerados tóxicos (Nair *et al.* 2004).

Os sinais clínicos de regressão completa ocorreram após duas horas nos três grupos de camundongos testados (**Tabela 19 e 20**). Os resultados do ensaio de atividade anticolinesterásica para a cepa *A. elenkinii* CCIBt1059 (que serão apresentados abaixo) e observações clínicas do bioensaio com esta mesma cepa, indicam que o extrato em ácido acético contém os compostos que inibem a enzima acetilcolinesterase, de forma temporária ou reversível.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Além de permitir uma observação detalhada das respostas biológicas aos compostos ativos, uma consequência importante do bioensaio em camundongos é a possibilidade de determinar a natureza e extensão dos efeitos adversos de uma dose única ou uma dose excessiva de um tóxico ou um composto terapêutico (Xavier 2008). Portanto, nossos resultados indicam que os extratos tanto da floração quanto da cepa isolada não são letais e causaram respostas fisiológicas associadas com as ações farmacológicas de compostos anticolinesterásicos, o que abre caminho para uma interessante linha de pesquisa a ser desenvolvida com esta espécie.

b) Ensaios bioautográficos para atividade inibidora da acetilcolinesterase

O resultado para o teste realizado com material reunido dos sete tratamentos extraído em ácido acético foi fortemente positivo (**Figura 13, B**) e as em metanol (**Figura 13, A**), não continham substâncias ativas.

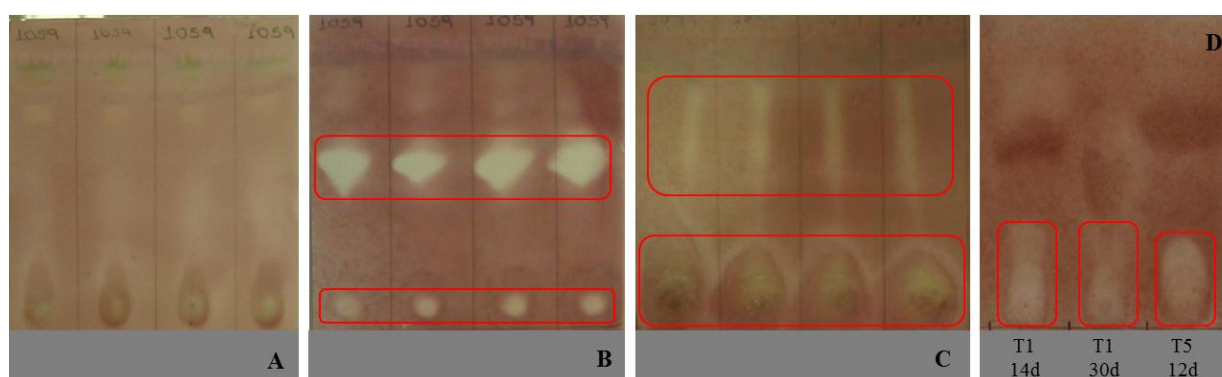


Figura 13. Cromatograma do extrato de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 revelado para detecção de atividade anticolinesterásica. O aparecimento de mancha branca sobre o fundo de coloração roxa indica inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Assinalado em vermelho destacam-se as regiões onde ocorreu inibição. **A.** Extrato metanólico e, **B.** Extrato ácido acético dos sete tratamentos integrados na fase estacionária; **C.** Extrato ácido acético no tratamento 5 (pH 10,5) na fase estacionária; **D.** Extrato em ácido acético no tratamento 1 nas fases exponencial (T1 14d) e estacionária (T1 30d), e, do tratamento 5 na fase exponencial (T5 12d).

As amostras em ácido acético dos tratamentos 1 e 5, analisadas separadamente, apresentaram atividade positiva fraca (**Figura 13, C e D**). Em ambos os tratamentos a atividade anticolinesterásica foi levemente mais pronunciada no extrato da fase exponencial de crescimento (comparar **Figura 13, C e D-T5**). Apesar da atividade nos extratos analisados

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

em separado ser mais fraca que o observado no extrato integrado, os halos de inibição próximos ao ponto de partida da amostra foram correspondentes em todas as condições.

Conforme demonstrado para os bioensaios em camundongo com extrato em ácido acético da cepa na condição do tratamento 5, há uma relação entre os sintomas apresentados pelos animais-teste e a presença de substância com atividade anticolinesterásica de caráter reversível.

c) Ensaios bioautográficos para atividade antifúngica (frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penz. SPC 491)

Os ensaios antifúngicos realizados com amostras dos tratamentos a que foi submetida a cepa *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 apresentaram resultados positivos apenas na condição controle, tratamento 4 (temp. 35°C) e tratamento 5 (pH 10,5) (**Figura 14**).

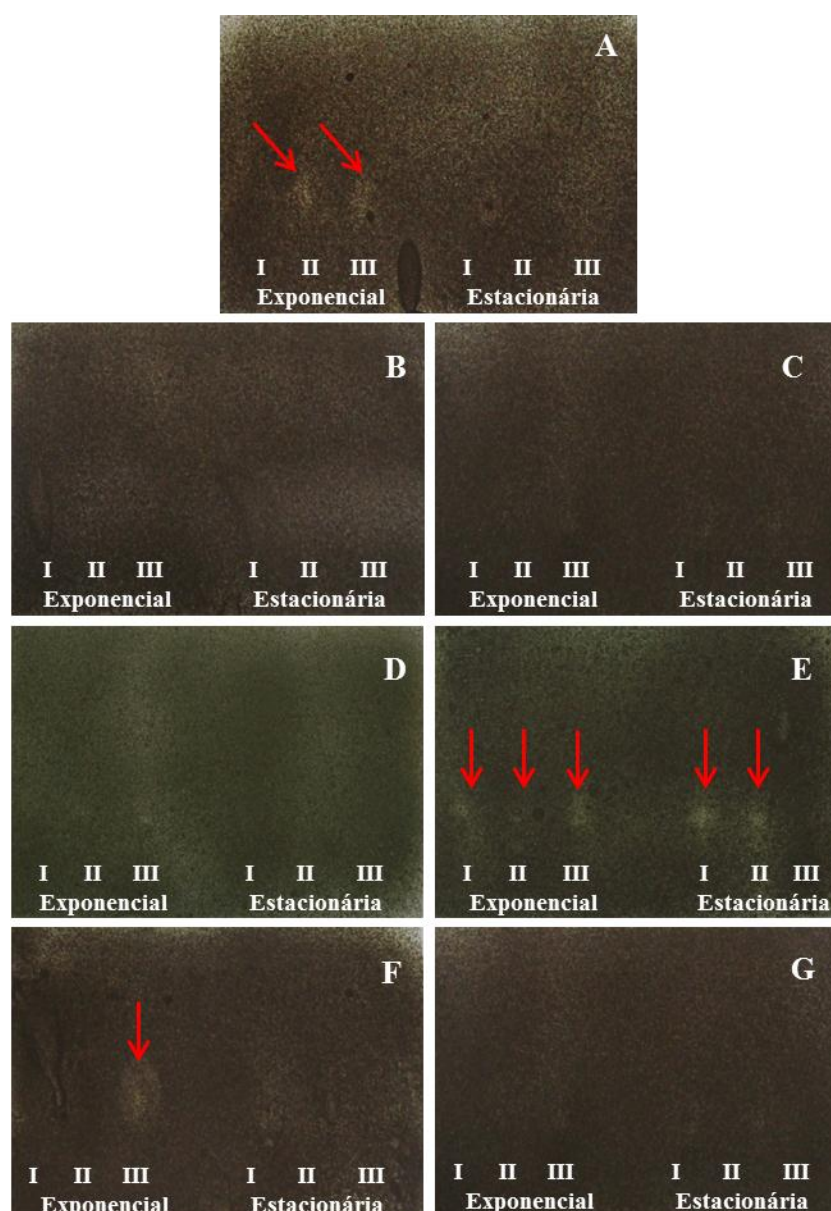


Figura 14. Atividade antifúngica (contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*) de extratos em ácido acético de diferentes tratamentos nas fases exponencial e estacionária de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059. **A.** Controle (BG-11 3% NaNO₃, temperatura 25°C, pH 9,5); **B.** Tratamento 1 (BG-1 50% NaNO₃); **C.** Tratamento 2 (BG-11 0% NaNO₃); **D.** Tratamento 3 (temperatura 30°C); **E.** Tratamento 4 (temperatura 35°C); **F.** Tratamento 5 (pH 10,5); **G.** Tratamento 6 (pH 7,0). Setas indicam região de ocorrência da atividade antifúngica (halos de inibição).

Na condição controle e no tratamento 5, a atividade antifúngica ocorreu somente com os extratos da fase exponencial de crescimento (**Figura 14, A, F**). No tratamento 4, a atividade antifúngica foi observada para os extratos tanto da fase exponencial como estacionária.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

De acordo com os experimentos de desenvolvimento da cepa *A. elenkinii* CCIBt1059, o menor rendimento celular foi observado no tratamento 4 (35°C), portanto, considerado uma condição limitante para o crescimento da espécie em cultura. A produção de metabólitos com atividade antifúngica observada nesta condição indica que o stress de temperatura causou alterações no metabolismo da espécie levando a produção de compostos antifúngicos.

d) Teste de ação hemolítica (Rangel *et al.* 1997)

Teste de ação hemolítica

No presente estudo, os extratos em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 nos sete tratamentos testados apresentaram resultados negativos para atividade hemolítica em sangue de camundongo (**Tabela 21**).

O teste de ação hemolítica é útil como indicador da toxicidade de cianobactérias em causar hemólise sanguínea. A hemólise ocorre devido aos danos causados nas membranas de eritrócitos através de um mecanismo de formação de poros, uma ação detergente ou uma atividade de lipase (Bi *et al.* 2011). Estudar a ocorrência de hemólise causada por cianobactérias pode facilitar a avaliação do seu impacto sobre a qualidade da água, sobre a morte de peixes (por afetar as brânquias), e abrir caminho sobre a pesquisa do impacto biológico e ecológico da hemolisina de cianobactérias na natureza (Liu *et al.* 2008).

Tabela 21. Teste de ação hemolítica com extratos em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 cultivada em diferentes tratamentos.

	Tratamentos e dias de retirada do extrato (fase exponencial e estacionária)													
	Controle		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	10	30	14	30	10	30	10	30	10	30	12	30	10	30
Ação hemolítica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Até o presente não há dados na literatura sobre atividade hemolítica produzida por espécies de *Anabaenopsis*. No entanto, para a cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 foi encontrada a produção da proteína hemolisina com potente atividade hemolítica em eritrócitos de coelho e ovelha (Liu *et al.* 2008). De acordo com Bi *et al.* (2011), a hemolisina produzida pela cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 também causou hemólise aos eritrócitos de ratos, mas não aos eritrócitos de humanos e peixe. Os referidos autores afirmam que são necessários

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

mais estudos para determinar de forma mais precisa o processo empregado por esta hemolisina nos danos causados aos eritrócitos.

e) Ensaio de atividade antibacteriana [frente às bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)]

Os extratos em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 nos sete tratamentos testados apresentaram resultados negativos para atividade antibacteriana frente as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva) (**Tabela 22**).

Tabela 22. Ensaio de atividade antibacteriana (contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva)) dos extratos em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 cultivada em diferentes tratamentos.

Presença de halo inibitório para:	Tratamentos e dias de retirada do extrato (fase exponencial e estacionária)													
	Controle		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	10	30	14	30	10	30	10	30	10	30	12	30	10	30
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De acordo com Noaman *et al.* (2004), a produção de metabólitos com atividade antibacteriana é um fator que depende de diversas variáveis, como temperatura, pH, tempo de incubação e meio de cultura utilizados durante o cultivo de cianobactérias. Assim, uma possível explicação para a ausência de atividade antibacteriana poderia estar relacionada às condições adotadas no cultivo de *A. elenkinii*. No entanto, os tratamentos testados são bastante amplos e foram utilizados extratos tanto da fase exponencial (onde geralmente ocorre maior produção de metabólitos) quanto da fase estacionária, o que nos permite inferir seguramente que nas condições testadas *A. elenkinii* CCIBt1059 não produz metabólitos com atividade antibacteriana frente as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.7.2. Estudos químicos

a) Prospecção de metabólitos com atividade antioxidante

Os testes com as amostras dos sete tratamentos a que foi submetida a cepa *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 apresentaram resultados negativos para atividade antioxidante (**Figuras 15 e 16**).

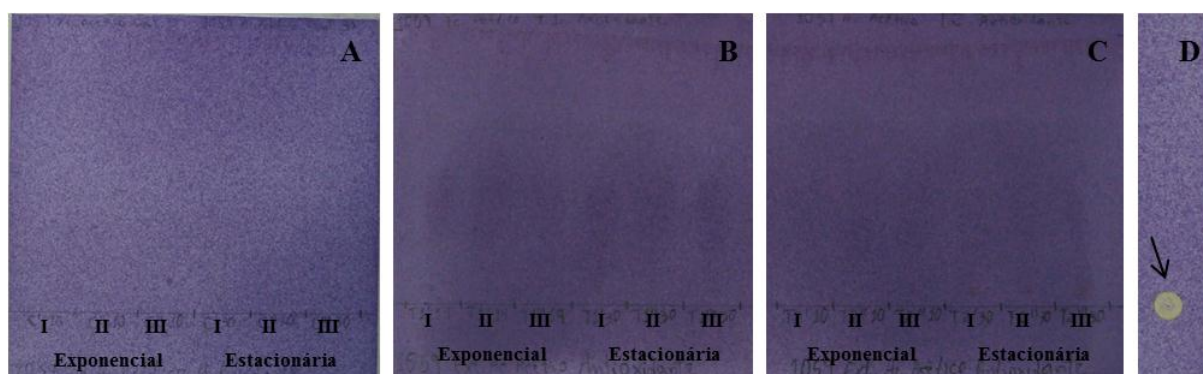


Figura 15. Cromatograma do extrato ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 de placas reveladas com solução de DPPH. **A.** Controle (BG-11 3% NaNO₃, temperatura 25°C, pH 9,5) no 10° e 30° dia de cultivo; **B.** Tratamento 1 (BG-1 50% NaNO₃), no 14° e 30° dia de cultivo; **C.** Tratamento 2 (BG-11 0% NaNO₃), no 10° e 30° dia de cultivo; **D.** Cataquina usada como controle positivo. Seta indica região da atividade antioxidante.

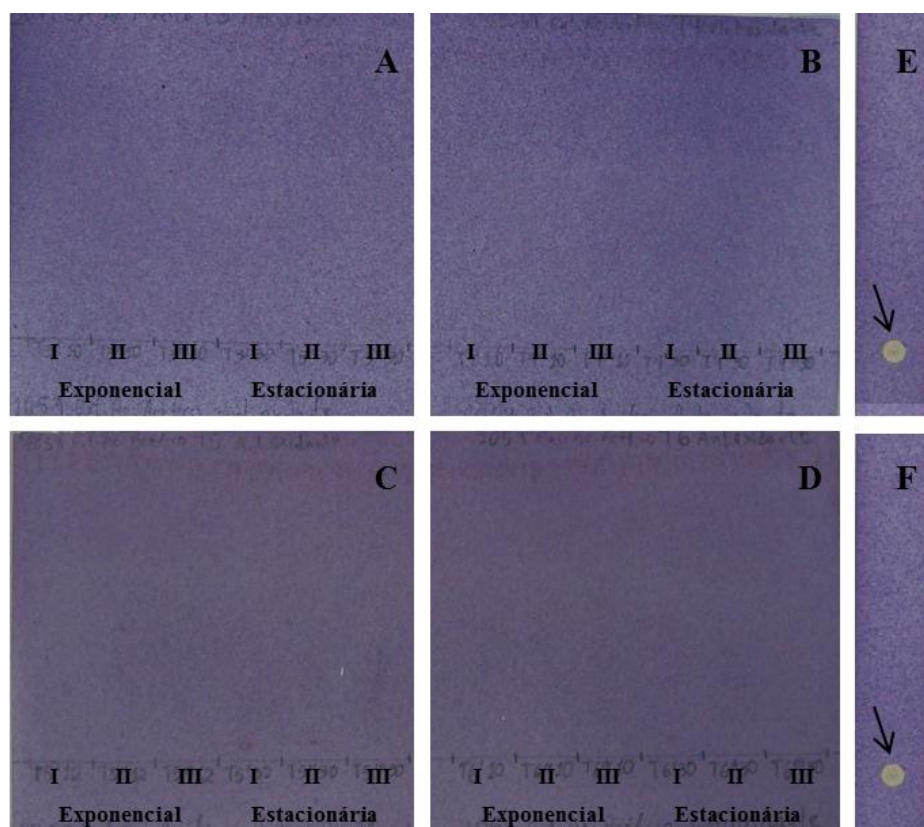


Figura 16. Cromatograma do extrato ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 de placas reveladas com solução de DPPH. **A.** Tratamento 3 (temperatura 30°C), no 10° e 30° dia de cultivo; **B.** Tratamento 4 (35°C) no 10° e 30° dia de cultivo; **C.** Tratamento 5 (pH 10,5), no 12° e 30° dia de cultivo; **D.** Tratamento 6 (pH 7,0), no 10° e 30° dia de cultivo; **E,F.** Cataquina usada como controle positivo. Seta indica região da atividade antioxidante.

b) Análises qualitativa e quantitativa das microcistinas LR, RR, YR e LA, do L-BMAA e da saxitoxina utilizando a técnica de LC-MS/MS

Os extratos em ácido acético de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 apresentaram resultados negativos para a presença das microcistinas LR, RR, YR e LA, para o L-BMAA e para saxitoxina, como mostrado na **Tabela 23** e **Figuras 17, 18 e 19**, onde estão mostrados os cromatogramas de todos os tratamentos e dos padrões.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Tabela 23. Resultado das análises em LC-MS/MS dos extratos em ácido acético 0,1 M de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 em diferentes tratamentos. ND: Analito não detectado; -: Abaixo do limite de detecção do método; TR: Tempo de retenção (minutos). Microc.: Microcistina.

Composto analisado	TR (min.)	Tratamentos e dias de retirada do extrato (fase exponencial e estacionária)													
		Cont.		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
		10	30	14	30	10	30	10	30	10	30	12	30	10	30
Microc. RR	4,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microc. LA	5,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microc. LR	4,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microc. YR	4,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-BMAA	0,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saxitoxina	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

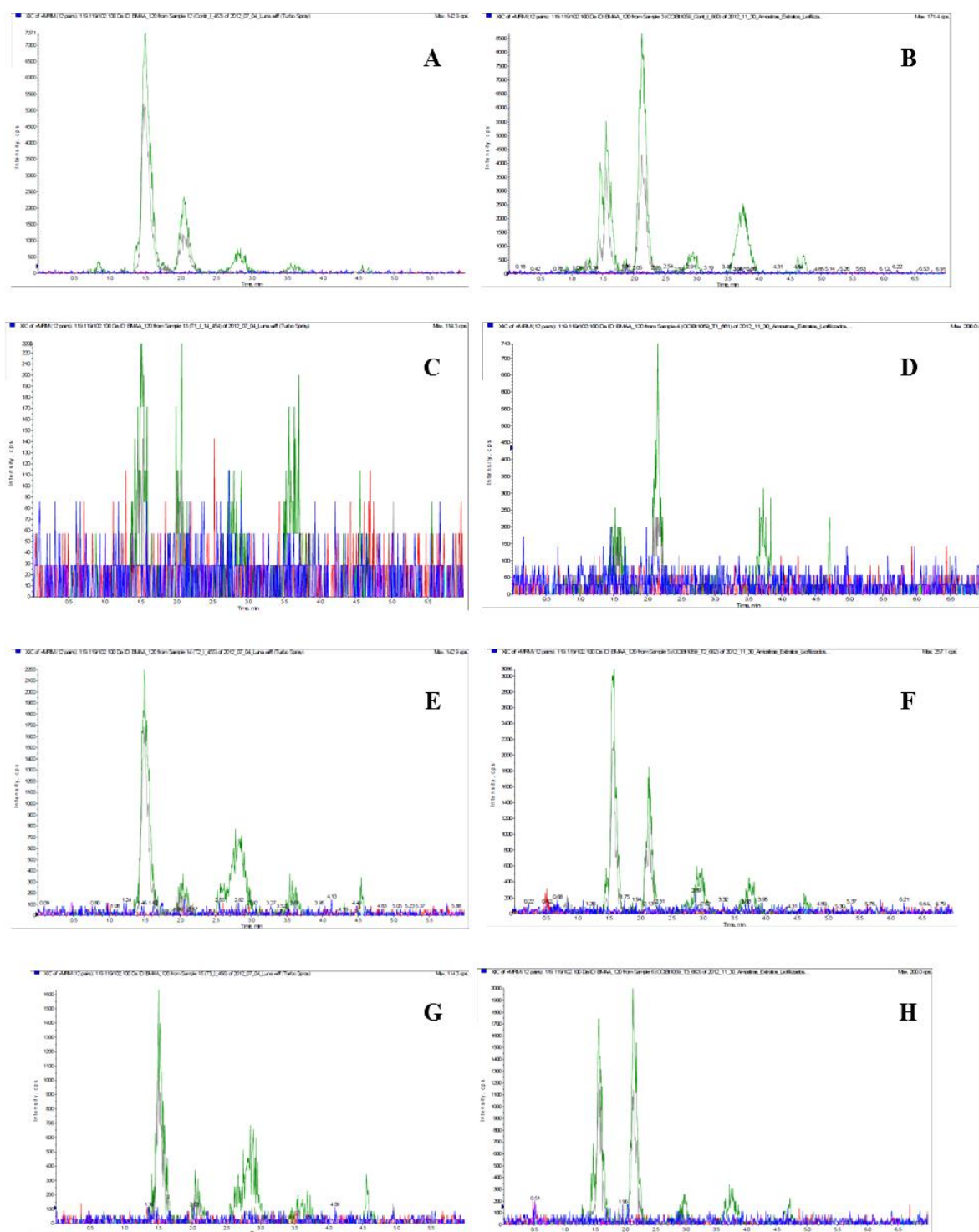
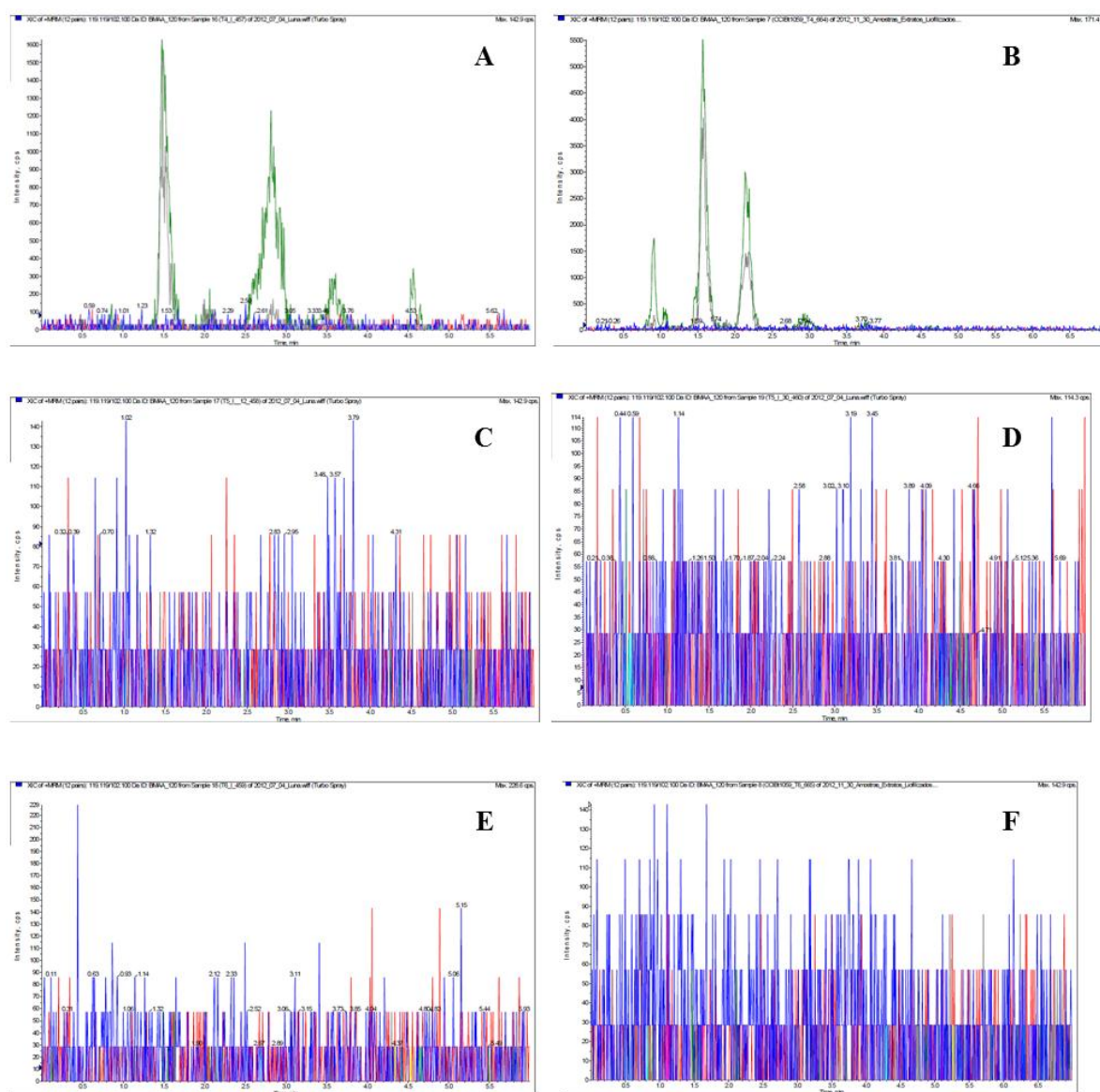


Figura 17. Cromatograma obtido para as amostras do extrato em ácido acético 0,1 M de *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059. **A,B.** Controle (BG-11 3% NaNO₃, temperatura 25°C, pH 9,5) no 10° e 30° dia de cultivo; **C,D.** Tratamento 1 (BG-1 50% NaNO₃), no 14° e 30° dia de cultivo; **E,F.** Tratamento 2 (BG-11 0% NaNO₃), no 10° e 30° dia de cultivo; **G,H.** Tratamento 3 (Temperatura 30°C), no 10° e 30° dia de cultivo.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*



CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

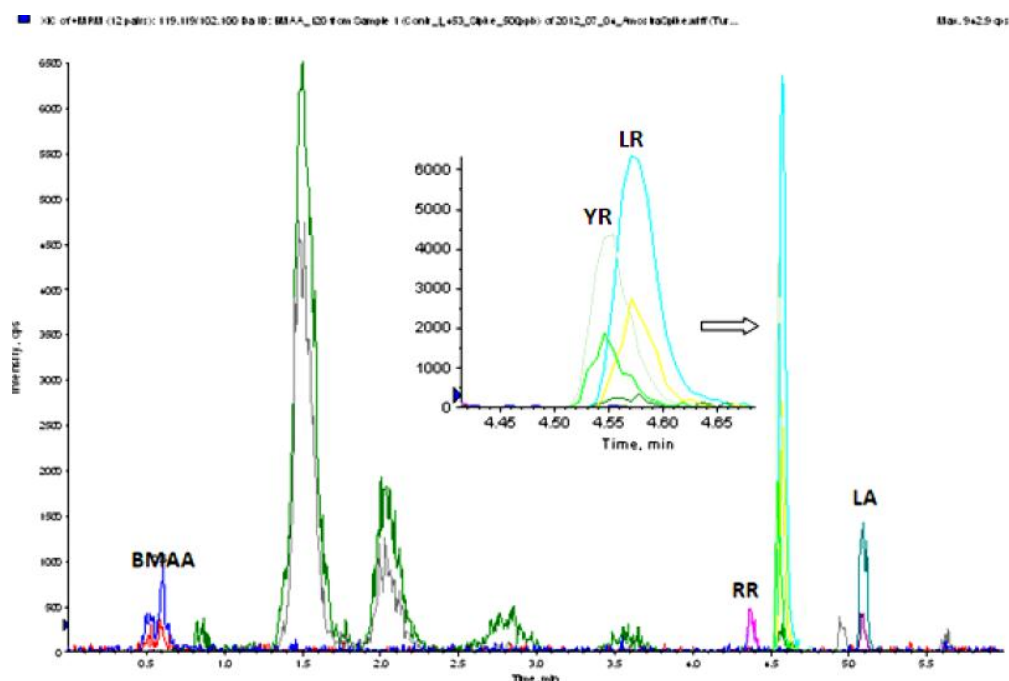


Figura 19. Cromatograma obtido para os padrões analíticos das microcistinas (LR, RR, YR e LA), do L-BMAA.

Apesar da produção de cianotoxinas ter sido documentada para *Anabaenopsis milleri* (Lanaras & Cook 1994) e para *Anabaenopsis arnoldii* (Mohamed & Shehri 2009), Ballot *et al.* (2010) não detectaram produção de cianotoxinas para *Anabaenopsis elenkinii* isolado de um lago da Alemanha. Nossos estudos corroboram os resultados obtidos por Ballot *et al.* (2010) ao demonstrar que a cepa de *A. elenkinii* do Pantanal também não é produtora de cianotoxinas. De acordo com esses resultados negativos para a produção de cianotoxinas, podemos concluir que a hipótese ecofisiológica III foi confirmada, ou seja, não há produção de cianotoxinas por *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 e esta cepa apresenta grande potencial de uso futuro em aplicações biotecnológicas.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

Referências Bibliográficas

- Adams, D. G. & Carr, N. G. 1981.** The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*: 9: 45-100.
- Adams, D. G., and N. G. Carr. 1989.** Heterocyst differentiation and cell division in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: effect of high light intensity. *Journal of Cell Science* 49:341-352.
- Adams, D.G. & Duggan, P.S. 1999.** Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* 144: 3-33.
- Adams, D.G. 2000.** Heterocyst formation in cyanobacteria. *Current Opinion in Microbiology* 3: 618-624.
- Almeida, T.I.R., Calijuri, M.C., Falco, P.B., Casali, S.P., Kupriyanova, E., Paranhos Filho, A.C., Sigolo, J.B. & Bertolo, R.A. 2011.** Biogeochemical processes and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83: 391-407.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410
- Andrade Filho A. & Romano C. 2001.** Anticolinesterásicos. *In*: Andrade Filho A, Campolina D, Dias M.B. (eds.) *Toxicologia na Prática Clínica*. Belo Horizonte: Editora Folium, p 53-60.
- Ballot A., Fastner J., Lentz, M. & Wiedner, C. 2010.** First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon* 56: 964-971.
- Ballot, A., Dadheech, P.K. & Krienitz, L. 2004b.** Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies. *Arch Hydrobiol Suppl/Algological Studies* 113: 37-56.
- Ballot, A., Dadheech, P.K., Haande, S. & Krienitz, L. 2008.** Morphological and Phylogenetic Analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Tropical Inland Water Bodies. *Microbial Ecology* 55(4): 608-618.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S. Codd, G.A. & Pflugmacher, S. 2004a.** Cyanobacteria and Cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya – Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research* 26: 925-935.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2005.** Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4: 139-150.
- Barbiéro, L., Queiroz-Neto, J.P., Ciornei, G., Sakamoto, A.Y., Capellari, B., Fernandes, E. & Valles, V. 2002.** Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. *Wetland* 22: 528-540.
- Barbiero, L., Rezende-Filho, A.T., Furquim, S., Furian, S., Sakamoto, A., Valles, V., Graham, R., Fort, M., Ferreira, R. & Quiroz-Neto, J.P. 2008.** Soil morphological

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- control on saline and freshwater lake hydrogeochemistry in the Pantanal of Nhecolândia, Brazil. *Geoderma* 148: 91-106.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M. & Sherris J.C. 1996.** Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* 451: 493- 496.
- Bi, S., Wang, W., Zhao, Y., Ru, S. & Liu, Y. 2011.** Studies on hemolysis of hemolysin produced by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Ocean University of China* 10(4): 362-368.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22(3):148-155.
- Birnboim H. C. & Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6):1513-23.
- Bolch, C.J.S., Blackburn, S.I., Neilan, B.A. & Grewe, P.M. 1996.** Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* Intergenic Spacer and flanking regions. *Journal of Phycology* 32: 445-451.
- Boyer, S.L., Johansen, J.R., Howard, G.L. 2002.** Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology* 38: 1222–1225.
- Broady, P.A. & Merican, F. 2012.** Phylum Cyanobacteria: blue-green bacteria, blue-green algae. In: Gordon, D.P. (Eds.) *New Zealand inventory of biodiversity. Volume Three. Kingdoms Bacteria, Protozoa, Chromista, Plantae, Fungi.* p. 50-69. Christchurch: Canterbury University Press.
- Callegari-Jacques, S. M. 2003.** Bioestatística princípios e aplicações. Porto Alegre: ArtMed.
- Caraus, I. 2012.** Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae. Version 2.3 third revision. . Bacau: Univ. Bacau.
- Carvalho, L. R., Pipole, F., Werner, V.R., Laughinghouse, H.D., Camargo, A.C.M., Rangel, M., Konno, K. & Sant'Anna, C.L. 2008.** A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 761-769.
- Casamatta, D.A., Vis, M.L. & Sheath R.G. 2003.** Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular marker. *Aquatic Botany* 77: 295–309.
- Castenholz, R. W. & Norris, T. B. 2005.** Revisionary concepts of species in the Cyanobacteria and their applications. *Algological Studies* 117: 53–69.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., Garcia, C., Vásquez, M. 2004.** The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Toxicon* 44: 483-489.
- Day, S.A., Wickham, R.P., Entwisle, T.J. & Tyler, P.A. 1995.** Bibliographic check-list of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series* 4: 1-276.
- Dedusenko-Shchegoleva, N.T. 1959.** Species novae algarum e stagnis regionis Charcoviensis. (R) (incl. novelties in *Phacus* & *Anabaenopsis*). *Bot. Mater., Spor. Rast., Bot. Inst. Akad. Nauk SSSR* 12: 44-46.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U. & Wiedner, C. 2012.** Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. PLoS ONE 7(6): e38757.
- Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U. & Wiedner, C. 2012.** Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. PLoS ONE 7(6): e38757.
- Dvorák, P., Hašler, P. & Pouličková, A. 2012.** Phylogeography of the *Microcoleus vaginatus* (Cyanobacteria) from Three Continents – A Spatial and Temporal Characterization. PLoS ONE 7(6): e40153.
- Ewing, B. & Green, P. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II, Error probabilities. Genome Research, Woodbury 8: 186 -194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Research 8 (3): 175–185.
- Fiore, M.F., Sant’Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Komárek, J., Kaštovský, J., Sulek, J. & Lorenzi, A. S. 2007.** The cyanobacterial genus *Brasilonema* – molecular and phenotype evaluation. Journal of Phycology 43: 789–798.
- Fogg, G. E. & Thake, B. 1987.** Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. Winsconsin: University of Wisconsin Press. 269 p.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtshuk, P, Jr. 1992.** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 166–170.
- Furquim, S.A.C., Graham, R.C., Barbiero, L., Queiroz Neto, J.P. & Vallès, V. 2008.** Mineralogy and genesis of smectites in an alkaline-saline environment of Pantanal wetland, Brazil. Clays and Clay Minerals 56: 580–596.
- Furquim, S.A.C., Graham, R.C., Barbiero, L., Queiroz Neto, J.P., Vidal-Torrado, P. 2010.** Soil mineral genesis and distribution in a saline lake landscape of the Pantanal Wetland, Brazil. Geoderma 154: 518–528.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. 1998.** Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Research 8: 195-202.
- Hamilton, S., Sippel, S.S.J., Calheiros, D.F. & Melack, J. 1999.** Chemical Characteristics of Pantanal Waters. *In: Anais Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal 2*, Corumbá, MS. Manejo e Conservação. Embrapa Pantanal, Corumbá, pp. 89-100.
- Harada, K.I., F. Kondo & L. Lawton, 1999.** Laboratory Analysis of Cyanotoxins. *In: Chorus, I. and J. Bartram (Eds.). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* London, pp. 369-405.
- Homans, A.L., Fuchs, A. 1970.** Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. Journal of Chromatography 51(2): 327-329.
- Hostettmann, K., Queiroz, E. F. & Vieira, P. C. 2003.** Princípios ativos de plantas superiores. v. 4. EdUFSCar, São Carlos, 152p.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau, M.N. & Herdman, M. 2002.** rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members to the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. Microbiology 148: 481-496.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- Jeeji-Bai, N., Hegewald, E., Soeder, C.J. 1980.** Taxonomic studies on the genus *Anabaenopsis* (Wolosz.) Miller. In: Desikachary TV, Rajarao VN (Eds.) Taxonomy of Algae. Univ. Madras 115–145.
- Johnson, R.C.; Zhou, Y.; Statler, K.; Thomas, J.; Cox, F.; Hall, S.; Barr, J.R. 2009.** Quantification of saxitoxin and neosaxitoxin in human urine utilizing isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 33: 8-14.
- 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.
- Kaebernick, M., & Neilan, B.A. 2001.** Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1–9.
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T., Neilan, B.A. 2002.** Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 449-455
- Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D. & Stal, L. 2002.** Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry* 57/58: 47-98.
- Kastovsky, J. & Johansen, J.R. 2008.** *Mastigocladus laminosus* (Stigonematales, Cyanobacteria): phylogenetic relationship of strains from thermal springs to soil-inhabiting genera of the order and taxonomic implications for the genus. *Phycologia* 47: 307-320.
- Komárek & Komárková-Legnerová 2002.** Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia* 74: 207-233.
- Komárek J. & Hauer T. 2012.** CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>
- Komarék J. 2005.** Phenotypic diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*. *Czech Phycology Olomouc* 5: 1–35.
- Komarék J. 2005.** Phenotypic diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*. *Czech Phycology Olomouc* 5:1–35.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1989.** Modern approach to the classification system of cyanophytes. *Nostocales* 4. *Algological Studies* 56: 247-345.
- Komárek, J. & Mareš, J. 2012.** An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocytous cyanobacteria. *Hydrobiologia* 698(1): 327-351.
- Komárek, J., Zapomelova, E. & Hindak, F. 2010.** *Cronbergia* gen. nov., a new cyanobacterial genus (Cyanophyta) with a special strategy of heterocyte formation. *Cryptogamie Algologie* 31(3): 321-341.
- Lanaras, T. & Cook, C.M. 1994.** Toxin extraction from an *Anabaenopsis milleri* - dominated bloom. *Science of the Total Environment*, 142(3):163-9.
- Lehtimäki J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemela S I. 1994.** The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatoxin production by *Nodularia* strains. *Arch Hydrobiol* 130:269-282

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- Liu, Y., Wang, W., Ru, S. & Zhao, Y. 2008.** Evidence for the production of a proteinaceous hemolytic exotoxin by wild-type strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology* 20: 89-95.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K. 2002.** A rapid TLC bioautographic method for detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.
- Medina-Júnior, P.B. & Rietzler, A. C. 2005.** Limnological study of a Pantanal saline lake. *Brazilian Journal of Biology* 65(4): 651-659.
- Miller, V.V. 1923.** K sistematike roda *Anabaena* Bory [Zur Systematik der Gattung *Anabaena* Bory]. - *Arch. russk. Protistol. Obšč.* 2:116-126.
- Milne, I., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D. F. & Wright, F. 2008.** TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25:126–7.
- Mohamed, Z.A. & Al-Shehri, A.M. 2009.** Microcystin-producing blooms of *Anabaenopsis arnoldii* in a potable mountain lake in Saudi Arabia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69: 98-105.
- Montgomery, D.C. 1991.** *Introduction to Statistical Quality Control*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New Yourk, NY.
- Moore, D., O'Donohue, M., Garnett, C., Critchley, C. & Shaw, G. 2005.** Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). *Freshwater Biology* 50: 345–352.
- Mourão, G.M. 1989.** Limnologia comparativa de três lagoas (duas “Baías” e uma “Salina”) do Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
- Mourão, G.M., Ishii I.H. & Campos, Z.M.S. 1988.** Alguns fatores limnológicos relacionados com a ictiofauna de baías e salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Acta Limnologica Brasiliensia* 2: 181-198.
- Moustaka-Gouni, M. 2007.** The coincidence of an *Arthrospira* – *Anabaenopsis* bloom and the mass mortality of birds in Lake Koronia. The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, *Harmful Algae News* 35: 6-7.
- Neilan B A, M Saker L, Fastner J, Torokne A, Burns B P. 2003.** Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology* 12: 133–140.
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. & Goodman, A.E. 1997.** rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:693-697.
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Goodman, A.E., Cox, P.T., Hawkins, P., 1995.** Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphism within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3875–3583.
- Noaman, N., Fattah, A., Khaleafa, M., Zaky, S.H. 2004.** Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Microbiological Research* 159: 395-402.
- Nübel, U., Garcia Pichel, F. & Muyzer, G. 1997.** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327-3332.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- Nübel, U., Garcia Pichel, F. & Muyzer, G. 2000. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1265–1277.
- Oren, A. 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1895-1902.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Archiv für Hydrobiologie 107(4): 563–593.
- Paerl, H.W., Huisman, J. 2008. Blooms like it hot. Science 320: 57–58.
- Peixoto, J. A. & Huszar, V. L. M., 1983. Algumas espécies de algas da Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro. Nova sér., Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Botânica - UFRJ 67: 1-8.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Mono, M., Frenk, E. & Hostettmann, K. 1994. Antifungal test in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. Planta Medica 60: 41-44.
- Ramírez, J. J. 1994. Dinámica poblacional de dos especies de *Anabaenopsis* (Wolosz) V. Mill. 1923 en una laguna eutrófica tropical. Revue d'Hydrobiol. Trop., 27: 337-346.
- Rangel, M., Malpezzi, E.L.A., Usini, S.M.M. & Freitas, J.C. 1997. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. Toxicon 35(2): 305-309.
- Reddy, P.M. 1984. Influence of pH on sporulation, spore germination and germling survival in blue–green algae. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 12: 411–417.
- Sáez, A.G. & Lozano, E. 2005. Body doubles. Nature 433: 111.
- Saker, M.L. & Griffiths, D.J. 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. Phycologia 39: 349-354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos, K.R.S. & Sant'Anna, C.L. 2010. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 33: 61-83.
- Santos, K.R.S. 2008. Biodiversidade de algas e cianobactérias de três lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Santos, K.R.S., Jacinavicius, F.R. & Sant'Anna, C.L. 2011. Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal. Fottea 11(1): 119-126.
- Santos, K.R.S., Rocha, A.C.R. & Sant'Anna, C.L. 2012. Diatoms from shallow lakes in the Pantanal of Nhecolândia, Brazilian wetland. Oecologia Australis 16(4): 795-808.
- Santos, S.A., Soriano, B.M.A., Comastri-Filho, J.A. & Abreu, U.G.P. 2007. Cheia e seca no Pantanal: importância do manejo adaptativo das fazendas. Corumbá, MS: Embrapa

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- Pantanal, 2007. 3p. ADM – Artigo de Divulgação na Mídia, n.120. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM120>>. Acesso em: 26 jul. 2007.
- Seto, Y. & Kataoka, M.K. 2005.** Mass spectrometric strategy for the determination of natural and synthetic organic toxins. *Journal of Health Science* 51(5): 519-525.
- Siegesmund, M.A., Johansen, J.R., Karsten, U. & Friedl, T. 2008.** *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *Journal of Phycology* 44: 1572-1585.
- Smith, T.E. 2010.** Revised list of algae from Arkansas, U.S.A. and new additions. *International Journal on Algae* 12(3): 230-256.
- Souza, T.M., Severi, J.A., Silva, V.Y.A., Santos, E., Pietro, R.C.L.R. 2007.** Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28(2): 221-226.
- Staal, M., Meysman, F.J.R., & Stal, L.J. 2003.** Temperature excludes N₂-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. *Nature* 425: 504–507.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. 1994.** A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846–849.
- Stal, L.J. 2009.** Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environmental Microbiology* 11(7): 1632–1645.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. 1971.** Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35, 171-205.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor, R. W. 1932.** Notes on the genus *Anabaenopsis*. - *American Journal of Botany* 19: 454-463.
- UNESCO 2009.** Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (editora). Documento Técnico PHI-LAC, N° 16.
- Vinogradova, O.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. 2000.** Cyanoprocaryota. *In: Biodiversity of cyanoprocaryotes, algae and fungi of Israel. Cyanoprocaryotes and algae of continental Israel.* (Nevo, E. & Wasser, S.P. Eds), pp. 32-141. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.G.
- Vinogradova, O.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. 2000.** Cyanoprocaryota. *In: Biodiversity of cyanoprocaryotes, algae and fungi of Israel. Cyanoprocaryotes and algae of continental Israel.* (Nevo, E. & Wasser, S.P. Eds), pp. 32-141. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.G.
- West, G.S. 1907.** Report of the freshwater algae incl. phytoplankton of the Third Tanganyika Expedition. – *J. Linn. Soc. Bot.* 38: 81-197.

CAPÍTULO 3 - *Anabaenopsis*

- Whitton, B.A., John, D.M., Johnson, L.R., Boulton, P.N.G., Kelly, M.G. & Haworth, E.Y. 1998.** A coded list of freshwater algae of the British Isles. LOIS Publication number 222. pp. 1-274. Wallingford: Institute of Hydrology & NERC.
- Wiedner, C., Ruecker, J., Brueggemann, R. & Nixdorf, B. 2007.** Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152: 473-484.
- Wiedner, C., Ruecker, J., Brueggemann, R. & Nixdorf, B. 2007.** Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152: 473-484.
- Wolk CP. 1996.** Heterocyst formation. *Annual Review of Genetics* 30: 59-78.
- Wołoszyńska, J. 1912.** Das Phytoplankton einiger javanischer Seen, mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. – *Bull. Acad. Sci. Cracovie, mat.-nat. ser. B*, 1912: 649-709.
- Wood SA, Heath MW, Holland PT, Munday R, McGregor GB, Ryan KG. 2010.** Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon* 55(4): 897-903.
- Zapomělová, E., HroUZeK, P., ŘeháKová, K., ŠabacKá, M., StíBal, M., Caisová, I., Komárková, J. & Lukešová, A. 2008.** Morphological variability in selected heterocytous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. – *Folia Microbiologica* 53: 333–341.
- Zar, J.H.. 1999.** Biostatistical analysis. 4 ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zhenguang, S. & Yushu, W. 1994.** Growth of *Anabaenopsis* sp. and its main nutrient components. *Chinese Journal of Applied Ecology* 5(2): 172-176.

Considerações Finais

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na análise taxonômica crítica das duas espécies de cianobactérias mais comuns e abundantes nas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia e os estudos morfológicos, filogenéticos, ecofisiológicos, de bioatividade e químicos das cepas *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 e *Arthrospira platensis* CCIBt3335, as seguintes considerações finais podem ser destacadas:

1) Apesar da ocorrência de *Anabaenopsis elenkinii* e *Arthrospira platensis* ser comum nas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, foi a primeira vez que cepas destas espécies foram isoladas do território brasileiro e caracterizadas por abordagem polifásica, que abrange morfologia, filogenia e aspectos ecofisiológicos, biológicos e químicos.

2) As cepas *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 e *Arthrospira platensis* CCIBt3335 não produzem as microcistinas LR, RR, YR e LA, L-BMAA e saxitoxina, portanto, apresentam grande potencial para serem cultivadas para produção de biomassa, livre de toxinas. Estes resultados são particularmente relevantes para a *Arthrospira platensis*, que é reconhecida e comercializada mundialmente, devido ao seu alto teor de proteína e valor nutricional.

3) O tratamento com maior disponibilidade de nitrogênio (T1: BG-11 50% NaNO₃ 750 mg.L⁻¹), pH 9,5, temperatura 25°C, fotoperíodo 12-12h luz-escuro, irradiância 80-100 μmol.fótons.m⁻².s⁻¹ proporciona a melhor condição para o crescimento das duas espécies estudadas, e recomenda-se o seu uso para estudos futuros. Além desta condição, o único tratamento em que a cepa *Arthrospira platensis* também cresceu, foi no tratamento 5, pH 10,5, BG-11 3% NaNO₃ 45 mg.L⁻¹ (demais condições igual ao anterior), indicando a forte dependência desta espécie tanto da elevada disponibilidade de nitrogênio, quanto do elevado pH.

4) O crescimento de *Anabaenopsis elenkinii* está correlacionado positivamente com o aumento do pH e a condição ótima para o seu crescimento foi pH 10,5, demonstrando o caráter alcalífico desta espécie.

5) Foi confirmado, através da análise do ciclo de desenvolvimento em cultura e também em material da natureza, que a presença de aerótopos é facultativa nas duas espécies e o hábito é planctônico.

6) A ausência de caliptra nas células apicais, tanto em material da natureza quanto de cultura, é uma característica morfológica estável de *Arthrospira platensis* e a presença de

Considerações Finais

tricomas regularmente espiralados e hormogônios retos ou curvos são características inerentes ao seu ciclo de desenvolvimento.

7) A variabilidade filogenética dos genes RNAr 16S e ITS (16S-23S) não expressa a variabilidade fenotípica das espécies de *Arthrospira*; no entanto, as populações de *A. platensis* de uma mesma região geográfica compartilham o mesmo clado filogenético, agrupando as cepas do Pantanal com as do México e Peru, principalmente, formando um “clado das Américas”.

8) A temperatura influencia a frequência de formação de heterocitos em *A. elenkinii*. Ao que tudo indica, esse é o segundo relato na literatura que mostra que além da disponibilidade de nitrogênio, a temperatura também interfere na frequência dessas células especializadas na fixação de nitrogênio (N₂), em cianobactérias. Nas temperaturas elevadas (30 e 35°C) a frequência de heterocitos foi maior que a 25°C durante a fase exponencial de crescimento, indicando que o aumento na formação de heterocitos é uma estratégia em resposta ao stress de temperatura.

9) Não foi possível confirmar a hipótese de existir espécies crípticas no gênero *Anabaenopsis* relacionadas ao morfotipo de *A. elenkinii*. No entanto, as árvores filogenéticas do RNAr 16S e ITS (16S-23S) indicam que as cepas de *A. elenkinii* do Pantanal e México estão em processo de evolução recente, intimamente relacionadas com as cepas africanas. Esta interessante linha de pesquisa poderá no futuro demonstrar se os táxons das Américas estariam ou não se diferenciando em uma nova espécie.

10) O extrato em ácido acético da cepa *A. elenkinii* CCIBt1059 no tratamento 5 (pH 10,5) apresentou atividade anticolinesterásica e os bioensaios em camundongos com este mesmo extrato, apresentaram respostas fisiológicas associadas com ações farmacológicas de substâncias que inibem a enzima acetilcolinesterase, de forma temporária ou reversível, o que abre caminho para novas e promissoras investigações a serem desenvolvidas com esta espécie, para o isolamento de potenciais agentes terapêuticos. Também, no tratamento 4 (35°C), a cepa apresentou atividade contra o fungo fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum* Penz. SPC 491, possibilitando o desenvolvimento de estudos para o isolamento de bioativos.

11) Os extratos em ácido acético e metanólico de *Arthrospira platensis* CCIBt3335 na fase exponencial de crescimento, no tratamento com maior disponibilidade de nitrogênio (T1), apresentaram forte atividade contra o fungo fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum* Penz. SPC 491, o que demonstra o potencial desta cepa para pesquisa de compostos

Considerações Finais

antifúngicos. Além desta atividade, os extratos em ácido acético, tanto no tratamento 1 (mais nitrogênio) quanto no tratamento 5 (pH 10,5), apresentaram atividade antioxidante, outra possibilidade a ser explorada, visto que substâncias antioxidantes são consideradas muito importantes por serem capazes de sequestrar as espécies reativas de oxigênio e diminuir os processos inflamatórios, sendo úteis inclusive no tratamento da Doença de Alzheimer.

12) Por fim, consideramos que o isolamento e o estudo polifásico das cepas *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt1059 e *Arthrospira platensis* CCIBt3335 representam um importante passo para estudos futuros e abrem caminho para o potencial uso biotecnológico de linhagens de cianobactérias isoladas do Pantanal brasileiro.

Anexo

ANEXO 1 – Artigo Santos *et al.* (2011): Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal

Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* MILLER (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal

Kleber Renan de Souza SANTOS, Fernanda Rios JACINAVICIUS & Célia Leite SANT'ANNA

Laboratory of Phycology, Institute of Botany, Av. Miguel Estéfano 3687, CEP 04301–902, São Paulo–SP, Brazil;
e-mail: santoskrs@gmail.com

Abstract: *Anabaenopsis elenkinii* MILLER forms bloom in the alkaline shallow lakes of the Brazilian Pantanal. The *A. elenkinii* CCIBT1059 strain was isolated from one of these alkaline lakes and the experiments were made in growth chamber during 30 days, under modified medium BG–11 (3 % NaNO₃), temperature 25 °C, photoperiod 12–12 light–dark cycle and irradiance of 80–100 μmol photons m^{–2} s^{–1} at three different pH values: 7.0, 9.5 and 10.5. In relation to growth rate and cell yield the higher values were observed at pH 10.5. Morphologically, the longest trichomes were found at pH 7 (maximum 45 cells) in comparison with pH 9.5 (maximum 32 cells) and pH 10.5 (maximum 23 cells). The occurrence of heterocytes was observed in all treatments, but akinetes were never formed. The morphometric variability within each treatment between exponential and stationary growth was clearly higher than the variability among different treatments in most cases. Our results indicate that *A. elenkinii* is typical of alkaline systems and also that in lower pH values the growth limitation can occur in terms of number of cells and biomass. This study represents the first experimental evidence of the effects of pH on growth rate, cell yield and morphometric variability of *A. elenkinii*.

Key words: alkaline lakes, *Anabaenopsis elenkinii*, Brazilian Pantanal, Cyanobacteria, pH, wetland

Introduction

The Pantanal is a large wetland of about 160,000 km² located in the center of the South American continent (JUNK et al. 2006). The Brazilian Pantanal is divided into eleven sub–regions that are characterized by the relief, soil, vegetation and flood pulse (SILVA & ABDON 1998). The studied sub–region, Pantanal of Nhecolândia, displays hundreds of typical and exclusive shallow lakes with high pH values (>9). Therefore, these lakes can be considered as extreme environments for most life forms (KRISTJÁNSSON & HREGGVIDSSON 1995). These alkaline lakes were isolated from rivers or streams and the main source of water is rainfall and groundwater (BARBIÉRO et al. 2002). In the alkaline lakes there are no macrophytes or fish and the dominant organisms are cyanobacteria (SANTOS & SANT'ANNA 2010).

The high values of pH, electric conducti-

vity, nutrients concentrations, cyanobacteria density and the lack of fish in the alkaline lakes from Pantanal of Nhecolândia are comparable to those of shallow lakes from arid regions of Australia (HART et al. 1991), Nigeria (EGBORGE 1994), Ethiopia (TUDORANCEA & HARRINSON 1988) and Africa (BALLOT et al. 2008).

In these Brazilian extreme lakes, *Anabaenopsis elenkinii* Miller is the dominant organism and forms blooms (Fig. 1 a,b), mainly in the dry season (SANTOS & SANT'ANNA 2010).

In spite of being the dominant species in the alkaline lakes from the Pantanal and potentially toxic (CARVALHO et al. 2008), *A. elenkinii* is still little known in terms of development. Thus, our objective is to investigate the effects of pH on growth and morphology of *A. elenkinii* CCIBT1059, isolated from Brazilian Pantanal.

Table 1. Growth rate, duplication time and cell yield of the *Anabaenopsis elenkinii* strain CCIBT1059, in the exponential growth at different treatment of pH. The cultures were incubated at 25°C, irradiance of 80–100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ on a 12–12 hr light–dark cycle on modified medium BG–11 (3% NaNO_3). Different letters after the date indicate significant differences at $p < 0.05$ ($n = 3$).

	Exponential growth (day)	Growth rate (μ ; day^{-1})	Duplication time (G; day^{-1})	Cell yield (R; cells.ml^{-1})
pH 7.0	6 to 8	0,259 ^a	2,68 ^a	839166 ^a
pH 9.5	2 to 4	0,261 ^a	2,67 ^a	800833 ^a
pH 10.5	4 to 7	0,349 ^b	1,99 ^b	6210833 ^b

Materials and Methods

The studied nonaxenic strain CCIBT1059 is kept in modified liquid medium BG–11 (3% NaNO_3 , indicated as BG–11m), pH 9.5, temperature $23 \pm 1^\circ\text{C}$, photoperiod 14–10 light–dark cycle and irradiance of 40–50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (provided by common day light fluorescent lamps and measured with a quanta meter sensor Li–COR model LI–250 spherical) in the Cyanobacteria Culture Collection of Institute of Botany, São Paulo, Brazil. It was isolated from the alkaline shallow lake named “Salina do Meio” ($18^\circ 58' 29''$ S and $56^\circ 38' 47''$ W), State of Mato Grosso do Sul, Brazilian Pantanal.

The morphological and metric ($n = 200$) characterization of material from nature and from culture were done under light microscope (Zeiss Axioplan 2). The classification system of HOFFMANN et al. (2005) and taxonomic review of KOMÁREK (2005) were adopted.

At the end of the exponential phase, one aliquot of the strain CCIBT1059 was taken and incubated over ten days in the growth chamber under the following conditions: BG–11m, pH 9.5, temperature 25°C , photoperiod 12–12 light–dark cycle and irradiance of 80–100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. This adapted culture was used as inoculums for the pH treatments, initiated with 1.5×10^4 cells.ml^{-1} . Cells were inoculated into 11 glass balloons with 500 ml of medium BG–11m. The pH was adjusted varying the amount of NaOH 0.1M and HCl 0.1M in the medium. The treatments ($n = 3$) were the following: pH 7.0, 9.5 and 10.5.

During 30 days, daily analyses in Fuchs–Rosenthal counting chamber were performed for determining the growth (cells.ml^{-1}) and biovolume ($\text{mm}^3.\text{l}^{-1}$) for every treatment. Growth rates were calculated during the exponential phase and are presented as relative growth rate (μ , day^{-1}). Mean doubling time represents the time period necessary to duplicate the cell population (G, day^{-1}), both estimated according to FOGG & THAKE (1987). The cell yield (R; cells.ml^{-1}), corresponding the maximum number of cells subtracted of the cell number of the inoculums, was also calculated.

All treatments were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test (Program GraphPad Prism version 5.0). Results of all tests were considered significant at 95% confidence if $p < 0.05$ for a given F statistic test value.

Results

Morphological characteristics of *A. elenkinii*

The following morphometric parameters, observed during the exponential growth of all treatments (Fig. 2, Supplementary Table 1. – electronic version only at fottea.czechphycology.cz), showed significant differences when compared with nature material: lower values of cell length in the treatments, higher values of cell width in the treatments, lower values of cell length/width ratio in the treatments, and higher values of length and width of heterocytes and number of cells in trichomes were also observed in the treatments ($p < 0.0001$). Regarding the number of coils, more tightly coiled trichomes were observed only at pH 10.5 in comparison with nature material ($p < 0.0001$).

During the stationary growth (Fig. 2), significant differences were observed in all treatments when compared with nature material in the following parameters: lower values of length and width of cells were observed in all treatments ($p < 0.0001$) and number of cells in trichome as well as length and width of heterocytes showed higher values in treatments ($p < 0.0001$). Regarding the length/width ratio of cells, significant difference were observed at pH 9.5 ($p < 0.0001$) and 10.5 ($p < 0.003$) and lower values were observed in these treatments. Furthermore, the length/width ratio of heterocytes higher values were observed at pH 7.0 ($p < 0.003$) and 9.5 ($p < 0.0001$). As with the exponential growth, more tightly coiled trichomes



Fig. 1. Aspects of alkaline lake and species studied: (a) general view of the lake “Salina do Meio” – photo A. Pott; (b) occurrence of bloom of the *Anabaenopsis elenkinii* in lake; (c–z’’) *A. elenkinii*; (c–j) nature material; (k–z’’) strain CCIBT1059; (k–p) pH 10.5 on day 0, 7, 10, 14, 20 and 30 respectively; (q–v) pH 9.5 on day 0, 4, 10, 14, 20 and 30 respectively; (w–z’’) pH 7.0 on day 0, 8, 10, 14, 20 and 30 respectively. Scale bar 10μm.

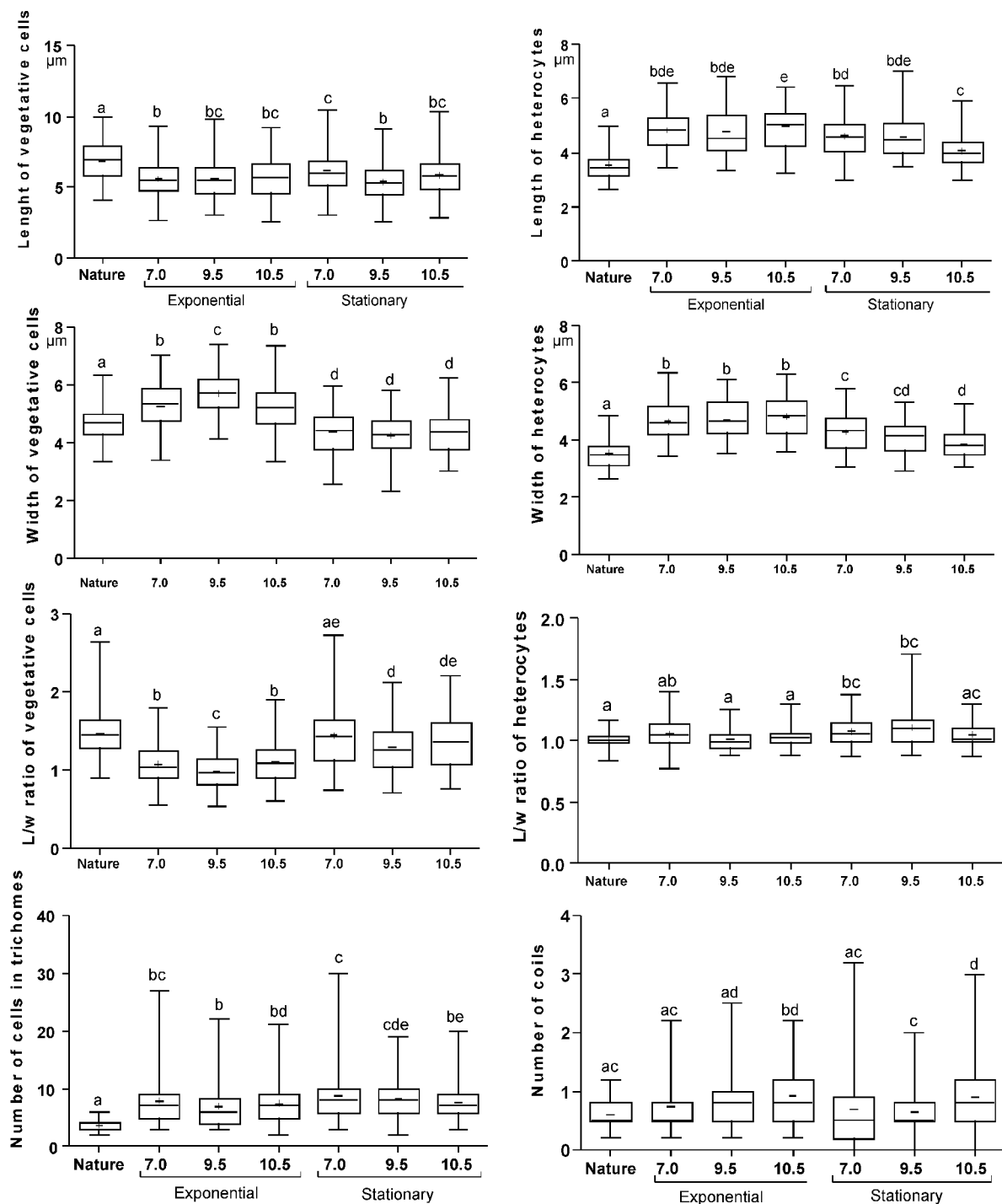


Fig. 2. Box and whisker plots of morphological characteristics of *Anabaenopsis elenkinii* strain CCIBT1059 in the nature material and exponential and stationary growth at different treatment of pH. Whiskers represent minimum and maximum values, boxes symbolize $\pm$ standard deviation, and "+" inside boxes are mean values. L/w = length/width.

($p < 0.0001$) were observed only at pH 10.5 on stationary growth in comparison with nature material (Fig. 2).

According to figure 2, the variability within each treatment between exponential and stationary growth was clearly higher than the variability

among different treatments in most cases. Regarding the length of cells, statistical differences were observed only at pH 7.0, in which higher values were encountered at stationary growth. The length of heterocytes showed statistical difference only at pH 10.5 and lower values were observed at

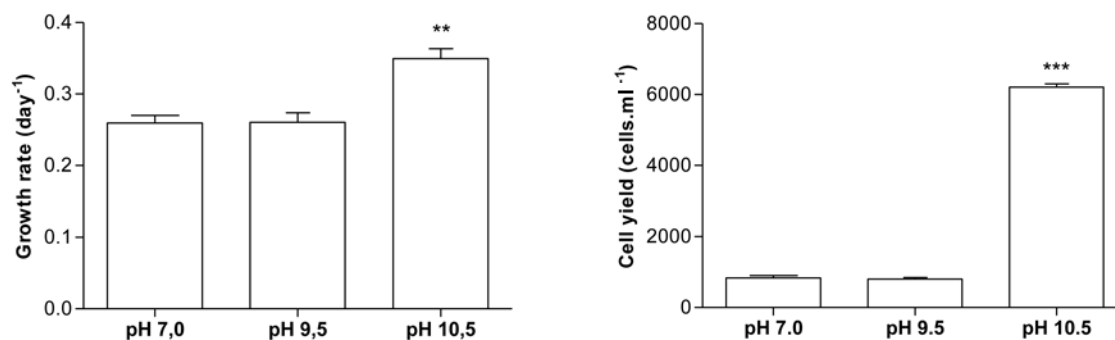


Fig. 3. Growth rate and cell yield of *Anabaenopsis elenkinii* strain CCIBT1059 on exponential growth at different treatment of pH. The cultures were incubated at 25°C, irradiance of 80–100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ on a 12–12 hr light–dark cycle on modified medium BG–11 (3% NaNO_3). Error bars denote the standard deviation ($n = 3$). Asterisks above the bars indicate significant differences at $p < 0.05$.

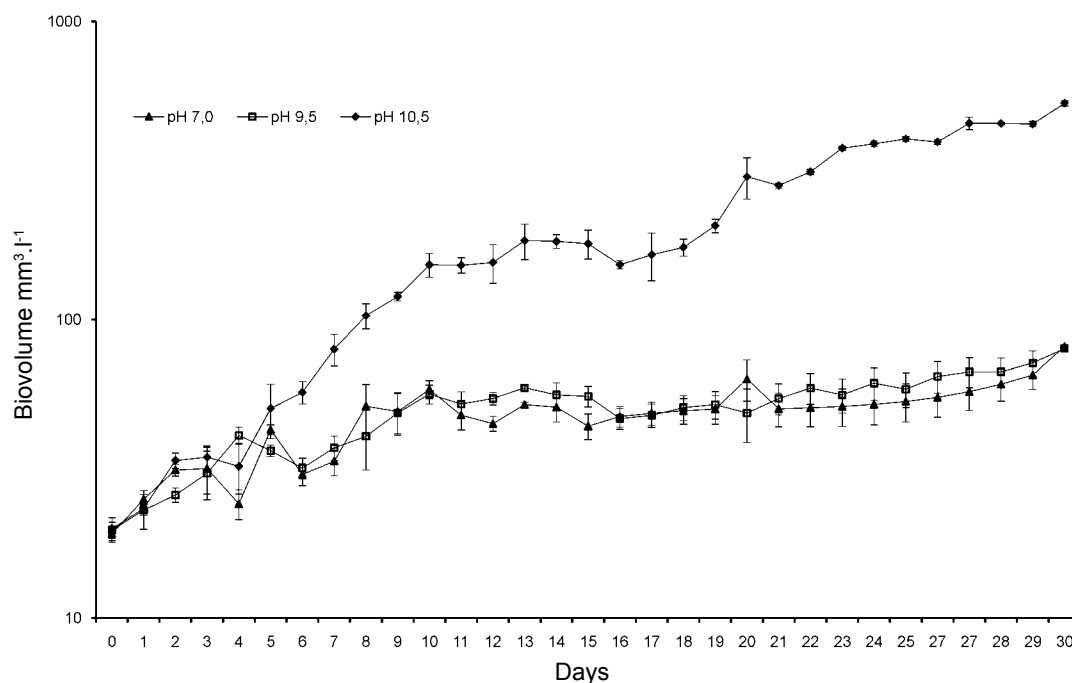


Fig. 4. The growth curves (Biovolume mm³.l⁻¹) of *Anabaenopsis elenkinii* strain CCIBT1059 at different pH treatments. The cultures were incubated at 25°C, irradiance of 90 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ on a 12–12 hr light–dark cycle on modified medium BG–11 (3% NaNO_3). Error bars indicate the standard deviation ($n = 3$).

stationary growth ($p < 0.05$). However, the width of cells and heterocytes showed lower values at stationary growth in comparison with exponential growth at pH 7.0, 9.5 and 10.5. The number of cells and coils per trichomes and the length/width ratio of heterocytes showed statistical difference between both phases of growth only at pH 9.5, in which slightly coiled trichomes were observed on exponential growth, whereas a higher number of cells per trichome and heterocytes slightly longer

were encountered on stationary growth (Fig. 2, Supplementary Table 2 – electronic version only at fottea.czechphycology.cz). In nature material and in all treatments, the coiled trichomes were the dominant form, but in each treatment a small percentage of straight trichomes were observed at stationary growth (Fig. 1 c–x).

The longest trichomes were found at pH 7 (maximum 45 cells on day 14) in comparison with pH 9.5 (maximum 32 cells on day 10) and

pH 10.5 (maximum 23 cells on day 8). Although statistical analyses showed significant difference in the number of cells per trichomes, the real difference in the mean values was slight (ca. 1 cell). Moreover, the average during the cultivation time (30 days) was approximately 8 cells per trichome in all treatments (Suppl. Tables 1, 2).

Growth of *A. elenkinii*

The effect of different pH on growth rate (μ ; day⁻¹), cell yield (R; cells.ml⁻¹) and duplication time (G; day⁻¹) of the *A. elenkinii* strain CCIBT1059 are shown in Fig. 3 and Table 1. Higher values of growth rate and cell yield were observed at pH 10.5 and were statistically different from pH 7 ($p_{[\mu]} < 0.05$; $p_{[R]} < 0.0001$) and 9.5 ($p_{[\mu]} < 0.05$; $p_{[R]} < 0.0001$). Consequently, the duplication time of cells was lower at pH 10.5 and higher at pH 7 and 9.5 (Table 1). In pH 7 and in pH 9.5 were not observed statistically difference in relation to growth rate, cell yield and duplication time of cells.

Figure 4 shows the growth curves (biovolume mm³.l⁻¹) of *A. elenkinii* at different treatments of pH.

Discussion

Morphologically, the nature material of *A. elenkinii* is similar to that of *Anabaenopsis hungarica* Halász because of the small number of cells/trichome (average 4, varying from 2 to 6 cells) and by the cylindrical cells (Fig. 1, c–j). However, the Brazilian material frequently presents longer trichomes (up to 12 cells) and elliptical cells (SANTOS & SANT'ANNA 2010). Besides, the metric parameters are also very distinct: *A. hungarica* presents 2.5 μ m wide trichomes and the *A. elenkinii* trichomes are wider (4.5 μ m) (KOMÁREK 2005). According to morphometric parameters, the material from Pantanal (from nature and from culture) is similar to *A. elenkinii* and the variability observed was considered as part of the natural variability of this species (KOMÁREK 2005, SANTOS & SANT'ANNA 2010).

The occurrence of terminal and intercalary pairs of heterocytes was observed in all treatments (Fig. 1 k–z''), but akinetes were never formed during the cultivation time. Based on our results, the occurrence of heterocytes was proportionally equal to the density of trichomes in all treatments (not shown), indicating that the pH does not affect

the heterocyte formation.

Akinetes were found only in nature, where they appeared during the dry season of the years 2006 and 2009 (pH 9.5–9.9 and water temperature 25–32 °C) and on the rain season of 2006 (pH 10.2 and water temperature 33 °C) (SANTOS & SANT'ANNA 2010). The absence of akinetes in the analyzed treatments indicates that the tested culture conditions do not represent stress conditions that induce the production of resistance structures. For this reason, in spite of the lower growth rate at pH 7.0 and 9.5 (Table 1) compared with the literature (growth rates of 0.3–1.4, according to MUR et al. 1999), akinetes were never formed. Although the influence of pH on akinetes sporulation has been documented for *Anabaenopsis arnoldii* APTEKAR by REDDY (1984), our results indicate that pH does not seem to be directly involved in akinetes formation of *A. elenkinii* from the alkaline lakes of Pantanal. Environmental features such as temperature (SHAFIK et al. 2003; MOORE et al. 2004), phosphorus concentration (MOORE et al. 2004) and light intensity (MOORE et al. 2005) showed great influence on akinetes formation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOŁOSZYŃSKA) SEENAYYA et SUBBA RAJU. However, ZAPOMĚLOVÁ et al. (2008) studied the effects of the temperature, light intensity and nutrient composition on morphological traits of Nostocaceae (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Scytonema* and *Tolypothrix*), but did not manage to prove the influence of these parameters on the akinetes formation.

In all treatments, *A. elenkinii* strain CCIBT1059 showed tendency to decrease the cell width at the stationary growth compared with that at the exponential growth (Fig. 2). The same observation was documented to *C. raciborskii* (HAWKINS et al. 2001). The length/width ratio of cells tends to increase during the cultivation time because the cell width decreases independently of pH.

According to HARRIS (1986), phytoplanktonic cells with high growth rate tend to have a smaller cell volume. In spite of no significant difference on the growth of *A. elenkinii* between the treatment at pH 7 and that at pH 9.5, variability of the width and length/width ratio of cells was observed. Treatment at pH 9.5 presented shorter cells than that at pH 7.0, both in the exponential growth phase and at the stationary phase (Fig. 2). Another interesting aspect observed was the morphological similarity of the trichomes between the treatment at pH 7.0

and that at pH 10.5 during the exponential growth, except for the number of coils/trichome (Fig. 2).

The higher values of growth rate and cell yield observed at pH 10.5 indicate that *A. elenkinii* is typical of alkaline systems and also that in lower pH values the growth limitation can occur in terms of density and biomass (Table 1). Thus, the bloom formation of *A. elenkinii* in the alkaline lakes from Brazilian Pantanal is favored by the high pH values towards its high productivity.

Acknowledgements

The first author thanks the financial supports of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Process number 2009/51655–1). We also thank the Embrapa Pantanal for permission to collect phytoplankton samples in Nhumirim farm, and Dr. Arnaldo Yoso Sakamoto (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS Campus de Três Lagoas) for the logistics support for the collection expedition.

References

- BALLOT, A., DADHEECH, P.K., HAANDE, S. & KRIENITZ, L. (2008): Morphological and phylogenetic analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from tropical inland water bodies. – *Microb. Ecol.* 55: 608–618.
- BARBIÉRO, L., QUEIROZ-NETO, J.P., CIORNEI, G., SAKAMOTO, A.Y., CAPELLARI, B., FERNANDES, E. & VALLES, V. (2002): Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. – *Wetland* 22: 528–540.
- CARVALHO, L.R., PIPOLE, F., WERNER, V.R., LAUGHINGHOUSE IV, H.D., CAMARGO, A.C.M., RANGEL, M., KONNO, K. & SANT'ANNA, C.L. (2008): A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. – *Braz. J. Microbiol.* 39: 761–769.
- EGBORGE, A.B.M. (1994): Salinity and the distribution of rotifers in the Lagos Harbour – Badagry Creek system, Nigeria. – *Hydrobiologia* 272: 95–104.
- FOGG, G.E. & THAKE, B. (1987): *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd ed. – 269 pp., Wisconsin, University Wisconsin Press, Madison.
- HARRIS, G.P. (1986): *Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation*. – 384 pp., Chapman and Hall Press, London.
- HART, B.T., BAILEY, P., EDWARDS, R., HORTLE, K., JAMES, K., McMAHON, A., MEREDITH, C. & SWADLING, K. (1991): A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. – *Hydrobiologia* 210: 105–144.
- HAWKINS, P.R.; PUTT, E.; FALCONER, I.; HUMPAGE, A. (2001): Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. – *Environ. Toxicol.* 16: 460–467.
- HOFFMANN, L., KOMÁREK, J. & KAŠTOVSKÝ, J. (2005): System of cyanoprokaryotes cyanobacteria) – state in 2004. – *Algological Studies* 117: 95–115.
- JUNK, W.J., CUNHA, C.N., WANTZEN, K.M., PETERMANN, P., STRÜSSMANN, C., MARQUES, M.I. & ADIS, J. (2006): Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. – *Aquat. Sci.* 68: 278–309.
- KOMÁREK, J. (2005). Phenotypic diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*. – *Czech Phycology* 5: 1–35.
- KRISTJÁNSSON, J.K. & HREGGVIDSSON, G.O. (1995): Ecology and habitats of extremophiles. – *Word. J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 17–25.
- MOORE, D., MCGREGOR, G.B. & GLEN, S. (2004): Morphological changes during akinetes germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). – *J. Phycol.* 40: 1098–1105.
- MOORE, D., O'DONOHUE, M., GARNETT, C., CRITCHLEY, C. & SHAW, G. (2005): Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). – *Freshwater Biol.* 50: 345–352.
- MUR, L.R., SKULBERG, O.M. & UTKILEN, H. (1999): Cyanobacteria in the environment. – In: Chorus, I. & Bartram, J. (eds): *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. – 416 pp., E & FN Spon, London & New York.
- REDDY, P.M. (1984): Influence of pH on sporulation, spore germination and germling survival in blue-green algae. – *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 12: 411–417.
- SHAFIK, H.M., VÖRÖS, L., SPRÓBER, P., PRÉSING, M. & KOVÁCS, A.W. (2003): Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. – *Hydrobiologia* 506–509: 163–167.
- SANTOS, K.R.S. & SANT'ANNA, C.L. (2010): Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. – *Revista Brasil. Bot.* 33: 61–83.
- SILVA, J.S.V. & ABDON, M.M. (1998): Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. – *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33: 1703–1711.
- TUDORANCEA, C. & HARRINSON, A.D. (1988): The benthic communities of the saline lakes Abijata

- and Shala (Ethiopia). – *Hydrobiologia* 197: 91–97.
- ZAPOMĚLOVÁ, E., HROUZEK, P., ŘEHÁKOVÁ, K., ŠABACKÁ, M., STIBAL, M., CAISOVÁ, L., KOMÁRKOVÁ, J. & LUKEŠOVÁ, A. (2008): Morphological variability in selected heterocystous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. – *Folia Microbiol.* 53: 333–341.

© *Czech Phycological Society* (2011)

Received Sept 2010

Accepted Dec 2010