

Ronaldo Leal Carneiro

**ECOFISIOLOGIA DE *Cylindrospermopsis raciborskii*
(CYANOBACTERIA): INFLUÊNCIAS DA INTENSIDADE E
QUALIDADE DA LUZ E DA DUREZA DA ÁGUA SOBRE O
CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS**

**Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009**

**ECOFISIOLOGIA DE *Cylindrospermopsis raciborskii*
(CYANOBACTERIA): influências da intensidade e qualidade da luz e
da dureza da água sobre o crescimento e a produção de
saxitoxinas**

Ronaldo Leal Carneiro

**Tese submetida à Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da
Saúde, Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
Doutor em Ciências**

**Orientadora:
Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo.**

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Ronaldo Leal

Ecofisiologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria):
Influências da intensidade e qualidade da luz e da dureza da água
sobre o crescimento e a produção saxitoxinas / Ronaldo Leal
Carneiro - Rio de Janeiro, 2009.

i-xii, 133pág, 21 ilustrações, 11 tabelas, 5 anexos

Tese (Doutorado em Ciências Bilógicas – Biofísica) Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
2009.

Orientadora: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

1. *Cylindrospermopsis raciborskii*. 2. Ecofisiologia. 3. Saxitoxinas.
4. Águas de reservatórios brasileiros – Tese.
I. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo.
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF^o
III. Doutora em Ciências

“Sonhar quando o sonho é impossível,

Lutar quando é fácil ceder,

Vencer o inimigo invencível,

Negar quando a regra é vender,

Sofrer a tortura implacável,

Romper a incabível prisão,

Voar num limite improvável,

“Tocar o inacessível chão...” (Chico Buarque)

“Não são as respostas que movem o mundo, mas sim as perguntas...” (Canal Futura...)

**ECOFISIOLOGIA DE *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA):
INFLUÊNCIAS DA INTENSIDADE E QUALIDADE DA LUZ E DA DUREZA DA
ÁGUA SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS**
Ronaldo Leal Carneiro

Orientadora: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

**Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências
da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências**

Aprovada por:

Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo
(Presidente e Orientadora)

Dr. Celso Luis Salgueiro Lage

Dr. Marcelo Manzi Marinho

Dr. Vera Lúcia de Moraes Huszar

Dr. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco (Revisora)

Rio de janeiro, 02 de Outubro de 2009.

Agradecimentos

Agradecer sempre é uma parte muito difícil. Nunca em palavras é possível expressar a gratidão sentida.

Toda minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aqui. Cada gesto, cada conversa, cada discussão ficarão guardados em meu coração. Trabalhar com pessoas incríveis foi um privilégio.

Para não citar nomes me resguardo o direito de dizer que todos, companheiros do trabalho, de casa, de vida foram e são importantes.

À minha família pelo apoio incondicional que me dão todos os dias de minha vida!

Obrigado!

RESUMO

ECOFISIOLOGIA DE *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA): INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE E QUALIDADE DA LUZ E DA DUREZA DA ÁGUA SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS

A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* vem sendo citada como uma espécie invasora, associada ao aumento da temperatura global e com uma alta capacidade de competição em relação a outras espécies. Nos últimos 10 anos foi crescente o número de trabalhos que abordaram algumas dessas variáveis ambientais os quais as relacionaram com a ocorrência de *C. raciborskii* em ecossistemas aquáticos brasileiros, onde o sucesso pode estar relacionado a altos valores de condutividade, valores altos de alcalinidade, elevado pH e elevada temperatura das águas e a variação de intensidade luminosa. As linhagens brasileiras toxigênicas já isoladas, mostraram-se produtoras de variantes de saxitoxina. Este estudo foi desenvolvido com objetivo de avaliar os efeitos do aumento da intensidade luminosa, variação da qualidade da luz e da condutividade (dureza da água) sobre o crescimento e produção de saxitoxinas por uma linhagem de *C. raciborskii* T3. Culturas desta linhagem foram submetidas às intensidades luminosas de 50, 100 ou 150 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e à luz branca, azul ou vermelha, amostradas durante 36h para avaliação da produção de saxitoxinas. O efeito da condutividade sobre o crescimento e síntese de saxitoxinas foi testado através da adição de alguns sais ao meio de cultivo ASM-1, buscando obter concentrações de 5 ou 10 mM dos íons CO_3^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Na^+ . Em todas as condições testadas, o crescimento celular foi acompanhado por contagens de células em hemocitômetro, com auxílio de microscópio ótico. As concentrações intracelulares e extracelulares de saxitoxinas (saxitoxina + neosaxitoxina) foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Para avaliar a inibição do metabolismo das células da linhagem T3 em presença de Ca^{2+} (10 mM), mudanças na expressão de proteínas foram investigadas por análise proteômica, usando eletroforese de duas dimensões (2DE) e espectrometria de massas. O crescimento celular de *C. raciborskii* T3 foi estimulado pelo aumento da intensidade luminosa. Da mesma forma o crescimento celular foi estimulado na maioria dos tratamentos, mostrando uma relação positiva entre o aumento da condutividade e o aumento do número de células. A inibição do crescimento celular foi observada nos tratamentos com CaCO_3 ou CaCl_2 (10 mM). A maior concentração de saxitoxinas por células foi quantificada em intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A produção de saxitoxinas obedece a um ritmo circadiano de produção. A exposição à luz azul ou vermelha ocasionou a perda do ritmo circadiano de produção de saxitoxinas por células. Houve uma relação positiva entre o aumento da condutividade e a produção de saxitoxinas na maioria dos tratamentos. A presença de carbonatos na água tanto inibiu como estimulou a síntese de saxitoxinas por células. O mesmo foi observado quando se utilizou sais de cloro. O crescimento e a síntese de saxitoxina inibidos na presença de Ca^{2+} em alta concentração (10 mM), após a exposição por 12 dias, estavam associados à inibição do metabolismo basal das células. Enquanto que extrapolações de estudos de laboratório para o ambiente devem ser tomadas com cautela, este estudo permitiu mostrar que o aumento da condutividade ou diferentes concentrações e tipo de íons encontrados nas águas, podem ocasionar modificações no crescimento e produção de saxitoxinas por uma cianobactéria. Por tanto, as florações poderiam estar associadas à presença desses íons na água. Isto mostra pela primeira vez que

a dinâmica de florações de algumas espécies de cianobactérias pode estar associada a outros parâmetros além da eutrofização (proporção N:P). Recomenda-se o estabelecimento de uma rotina de análise dos diferentes íons e da intensidade luminosa em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em ambientes com florações. A partir do estabelecimento dessas rotinas, será possível o aumento da compreensão das dinâmicas de ocorrência de florações tóxicas, o que pode contribuir para facilitar o manejo e recuperação da qualidade do ambiente aquático.

ABSTRACT

***Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA) ECOFISIOLOGY: THE LIGHT INTENSITY, LIGHT QUALITY AND WATER HARDNESS EFFECTS ON GROWTH AND SAXITOXIN PRODUCTION.**

Cylindrospermopsis raciborskii has been described as an invasive species. This invasive capability has been associated to global temperature increase and high capacity for competition with other species. Over the past 10 years, the number of studies has been increasing on occurrence events of *C. raciborskii* in Brazilian aquatic systems where this species occurrence and success can be associated to high values of conductivity, alkalinity, pH, temperature and light intensity. The toxigenic strains already isolated from these environments are saxitoxin variants producers. This study was performed to evaluate the light intensity, light quality and conductivity (water hardness) effects on growth and saxitoxins production by *C. raciborskii* (T3 strain). To evaluate the effect of light intensity, this strain was exposed to 50 (control), 100 or 150 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, or to red or blue light. Saxitoxins concentration was determined during 36h, to evaluate the circadian rhythm of production. To evaluate the effect of conductivity on growth and production of saxitoxins, cultures were maintained at ASM-1 medium added with 5 or 10 mM of CO_3^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} or Na^+ ion. Cell counts were performed in a hemocytometer under optic microscopy to cellular growth determination. Saxitoxin analyses were performed by HPLC techniques. Changes in protein expression profiles of cells exposed to Ca^{2+} (10 mM) were investigated by proteomic analysis using 2D gel electrophoresis and mass spectrometry. Cell growth was stimulated by the increase in light intensity. The highest concentration of saxitoxins per cell was found in cells at 100 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Saxitoxin production is controlled by an endogenous clock. Exposure to blue and red wavelengths caused the loss of saxitoxins circadian rhythm of production. In general, cell growth was direct related with the increase of conductivity of water. However, CaCO_3 CaCl_2 or Ca^{2+} 10 mM condition cellular growth was inhibited. The presence of carbonate or chloride salts in the medium could either inhibit or stimulate the saxitoxins production by cells. Among differently expressed proteins, those related to primary metabolism (energy and carbohydrate metabolism) were less abundant in cells exposed to the high calcium concentration which is reasonable with the growth inhibition observed under this condition. While extrapolations of laboratory data to the environment should be taken with caution, this study could allow that conductivity increase and different ion concentration in water could modify the dynamic of growth and saxitoxin production by Cyanobacteria. The bloom occurrence could be associated to the presence of different ions in addition to eutrophication by N:P. It is recommended a routine to evaluation of the ion concentration in water with bloom occurrence. This study contributes to increase of comprehension of dynamic of toxic bloom occurrence e could be contributing to facilitate the management of water quality.

Sumário	página
Resumo	- vii -
Abstract.....	- ix -
Apresentação da Tese.....	- 15 -
1- Introdução.....	- 6 -
1.1- Cianobactérias e cianotoxinas.....	- 6 -
1.2- Saxitoxinas	- 11 -
1.3- Cianobactérias, relógio biológico e ritmos circadianos.....	- 16 -
1.4- Cianobactéria e proteoma	- 20 -
1.5- Ecofisiologia, toxicologia e estudos moleculares sobre <i>C.raciborskii</i> -	23 -
2- Justificativa e objetivos da tese	- 31 -
2.1- Justificativa.....	- 31 -
2.2- Objetivos	- 38 -
3- Material e métodos comuns a todos os capítulos.....	- 39 -
3.1- Manutenção da linhagem	- 39 -
3.2- Determinação do crescimento celular	- 40 -
3.3- Extração e análise de saxitoxinas	- 40 -
3.4- Análises estatísticas dos dados	- 43 -
4- Resumos de material e métodos, resultados e discussão do artigo já publicado e dos manuscritos submetidos	- 44 -
4.1- Capítulo primeiro - Efeitos da intensidade luminosa e da qualidade da luz sobre o crescimento e o ritmo circadiano de produção de saxitoxinas por <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Cyanobacteria).....	- 44 -
4.1.1- Resumo de material e métodos.....	- 44 -
4.1.1.1- Efeito da intensidade luminosa sobre crescimento e produção de saxitoxinas por <i>C. raciborskii</i>	- 44 -
4.1.1.2- Efeito da qualidade da luz sobre produção de saxitoxinas por <i>C. raciborskii</i>	- 47 -
4.1.2- Resumo dos resultados e discussão.....	- 49 -
4.2- Capítulo segundo - A dureza da água afeta o crescimento e produção de saxitoxinas por <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Cyanobacteria).....	- 62 -
4.2.1- Resumo de material e métodos.....	- 62 -
4.2.2- Resumo dos resultados e discussão.....	- 66 -
4.3- Capítulo terceiro - Efeito inibitório do cálcio sobre o metabolismo de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Cyanobacteria).....	- 84 -
4.3.1 - Resumo de material e métodos.....	- 84 -
4.3.1.1- Experimentação com CaCl ₂	- 84 -
4.3.1.3- Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	- 86 -
4.3.1.4- Identificação das proteínas por Espectrometria de Massas	- 88 -
4.3.1.5- Análises estatísticas dos dados.....	- 89 -
4.3.2- Resumo dos resultados e discussão.....	- 90 -
5- Discussão Geral	- 101 -
6- Conclusões.....	- 112 -
8- Referências Bibliográficas	- 116 -

Lista de figuras	página
1- Figura 1.1 - Estruturas químicas das principais cianotoxinas.....	- 11 -
2- Figura 1.2 - Síntese hipotética de saxitoxina (STX) como proposto por Shimizu (1993).	- 13 -
3- Figura 1.3 - Representações gráficas dos tipos de ritmos circadianos de um processo metabólico.....	- 17 -
4- Figura 1.4 - Tipos de estudos proteômicos e suas aplicações.....	- 22 -
5- Figura 1.5 - <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (linhagem T3).....	- 24 -
6- Figura 1.6 - <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (linhagem ITEP A3).....	- 24 -
7- Figura 4.1.1 - Esquema dos experimentos para avaliação do efeito da intensidade luminosa sobre crescimento e produção de saxitoxinas por <i>C. raciborskii</i> T3.-	46 -
8- Figura 4.1.2 - Esquema dos experimentos sobre o efeito da luz azul ou vermelha sobre a produção de saxitoxinas por <i>C. raciborskii</i> T3.	- 48 -
9- Figura 4.1.3 - Curvas de crescimento das células de <i>C. raciborskii</i> T3 expostas a três diferentes intensidades luminosas. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).....	- 50 -
10- Figura 4.1.4 - Variação da concentração de STX e NSTX em células de <i>C. raciborskii</i> T3 entre as diferentes fases de crescimento.	- 51 -
11- Figura 4.1.5 - Variação das concentrações de STX durante 36h, em células de <i>C. raciborskii</i> T3 submetidas a três intensidades luminosas.....	- 53 -
12- Figura 4.1.6 - Variação das concentrações de NSTX em células de <i>C. raciborskii</i> T3 submetidas a três intensidades luminosas.	- 54 -
13- Figura 4.1.7 - Variação das concentrações de STX em células de <i>C. raciborskii</i> T3 submetidas durante 36h a três comprimentos de onda (fluxo de fótons de 100 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	- 59 -
14- Figura 4.1.8 - Variação das concentrações de NSTX em células de <i>C. raciborskii</i> T3 submetidas durante 36h a três comprimentos de onda (fluxo de fótons de 100 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	- 60 -
15- Figura 4.2.1 – Esquema dos experimentos sobre o efeito da condutividade (dureza da água) sobre o crescimento e produção de STXs por células de <i>C. raciborskii</i> T3.	- 64 -
16- Figura 4.2.2 - Curvas de crescimento das células de <i>C. raciborskii</i> T3 cultivadas na presença de carbonato de cálcio, magnésio ou sódio (CO_3^{-2} 5 mM).	- 69 -
17- Figura 4.2.3 - Curvas de crescimento das células de <i>C. raciborskii</i> T3 cultivadas na presença de sais de cálcio, magnésio ou sódio, em concentrações de 5 ou 10 mM do cátion.....	- 70 -
18 - Figura 4.2.4 - Variação na concentração de STXs totais (STX + NSTX) no 6º dia do cultivo de células de <i>C. raciborskii</i> T3 cultivadas na presença de sais de cálcio, magnésio ou sódio.....	- 71 -
19- Figura 4.2.5 - Variação na concentração de STXs totais (STX + NSTX) no 12º dia do cultivo de células de <i>C. raciborskii</i> T3 cultivadas na presença de sais de cálcio, magnésio ou sódio.....	- 72 -

20- Figura 4.3.1 - Curvas de crescimento de células de *C. raciborskii* T3 cultivadas em meio ASM-1 e ASM-1 acrescido de Ca^{2+} 10 mM..... - 91 -

21- Figura 4.3.2 – Padrões protéicos (géis 2D) de células de *C. raciborskii* T3 cultivadas em meio ASM-1 (A) ou em meio ASM-1 com Ca^{2+} 10 mM (B) durante 12 dias..... - 94 -

Lista de tabelas	página
1- Tabela 1.1 - Saxitoxinas identificadas por Oshima (1995). Fórmula estrutural de Yoshida <i>et al.</i> (1996).....	- 12 -
2- Tabela 2.1 - Condutividades e intensidades luminosas associadas à ocorrência e dominância de florações de <i>C. raciborskii</i> encontradas em alguns ecossistemas brasileiros.	- 33 -
3- Tabela 3.1 - Sistema HPLC utilizado (Shimadzu).....	- 42 -
4- Tabela 3.2 - Condições cromatográficas utilizadas (Oshima, 1995).....	- 42 -
5- Tabela 4.1.1 - Taxas de crescimento de células de <i>C. raciborskii</i> T3 expostas a três diferentes intensidades luminosas.....	- 50 -
6- Tabela 4.1.2 - Concentrações máximas de NSTX e STX em células de <i>C. raciborskii</i> em fase estacionária do crescimento submetidas a três intensidades luminosas e três qualidades de luz.....	- 55 -
7- Tabela 4.1.3 - Razão entre as maiores e menores concentrações de NSTX e STX em células de <i>C. raciborskii</i> quantificadas durante as fases luminosa e escura, em culturas submetidas a três intensidades luminosas.....	- 56 -
8- Tabela 4.2.1 – Concentrações iniciais dos diferentes íons adicionados ao meio de cultivo ASM-1.....	- 63 -
9- Tabela 4.2.2 – Condutividade do meio de cultura, taxa de crescimento celular, razão celular, duração da fase exponencial do crescimento e concentração intracelular de STXs em células de <i>C. raciborskii</i> T3 expostas a diferentes tratamentos, com diferentes íons.....	- 67 -
10- Tabela 4.3.1 – Parâmetros de crescimento e produção de STX por células de <i>C. raciborskii</i> T3 cultivada em meio ASM-1 ou ASM-1 com Ca ²⁺ (10 mM), após 12 dias de exposição.....	- 91 -
11- Tabela 4.3.1 - Proteínas diferencialmente expressas por <i>C. raciborskii</i> (T3) na fase estacionária (12 dias) quando cultivada em meio ASM-1 ou ASM-1 adicionado de Ca ²⁺ 10 mM.....	- 95 -

Lista de Anexos

1- Carneiro, RL, Santos, MEV, Pacheco, ABF, Azevedo, SMFO. Effects of Light Intensity and Light Quality on Growth and Circadian Rhythm of Saxitoxins Production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research** **31(5)**, 481-488, 2009.

2- Carneiro, RL, Pacheco, ABF, Azevedo, SMFO. The water hardness affects growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). Manuscrito será submetido ao periódico **Journal of Plankton Research**.

3- Carneiro, RL, Alípio, ACN, Bisch, PM, Azevedo, SMFO, Pacheco, ABF. The Inhibitory Effect of Calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA) Metabolism. Submetido ao periodic **Applied and Environmental Microbiology** - MS# AEM01786-09, em fase de revisão.

4- Carneiro, RL, Magalhães, VF, Azevedo, SMFO. Is growth and cylindrospermopsin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) affected by high light intensity? Manuscrito será submetido ao periódico **Phycologia**.

5- Azevedo, SMFO, Carneiro, RL. As 10 perguntas mais frequentes sobre a água que usamos: o que você não pode deixar de saber. Folder. Espaço Ciência Viva, 2008.

Abreviações:

7-epi-CYN – variante de cilindrospermopsina.

BMAA - β -methilamino-*L*-alanina.

CYN – cilindrospermopsina.

CTX – ciguatoxinas.

deoxiCYN – variante de cilindrospermopsina.

dcGTX, dcSTX, dcNSTX – variantes decarbamoil de saxitoxinas.

GTX – goniautoxina.

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography” – cromatografia líquida de alta eficiência.

LPS – lipopolissacarídeos.

MS – “mass spectrometry” - espectrometria de massas

MM – massa molecular

NSTX – neosaxitoina.

PST – toxinas paralisantes de moluscos. Mesmo que saxitoxinas (STXs).

pI – ponto isoelétrico

STXs – saxitoxinas.

STX – saxitoxina.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* vem sendo citada na literatura mundial como uma espécie invasora com alta capacidade ecológica de competição em relação a outras espécies. Essa espécie apresenta linhagens capazes de produzir as seguintes variantes de cianotoxinas já caracterizadas: cilindrospermopsina, deoxicilindrospermopsina e 7-epi-cilindrospermopsina. Mundialmente, o interesse por essa espécie tem crescido também devido ao

aumento da ocorrência de florações tóxicas em vários ambientes. Em agosto de 2009, observou-se que foram publicados 254 artigos sobre a espécie, nos últimos dez anos, ao ser digitada a palavra-chave "*Cylindrospermopsis raciborskii*" em um site de consulta de artigos científicos em periódicos especializados (www.isiknowledge.com). Vinte e dois desses artigos (aproximadamente 10%) foram publicados no corrente ano de 2009, demonstrando uma continuada investigação sobre os aspectos da espécie. Porém, o conhecimento sobre a fisiologia e toxicologia da espécie parece ser pouco se comparado ao conhecimento sobre outras cianobactérias.

Desde o primeiro isolamento e caracterização de toxinas produzidas por linhagens de *C. raciborskii* isoladas de corpos d'água brasileiros (primeiras observações publicadas por Lagos *et al.*, 1999), sempre que foi identificada alguma linhagem toxigênica, constatou-se a produção de variantes das toxinas conhecidas como PST. PST vem do inglês "*Paralytic Shellfish Toxins*". Estas são neurotoxinas, conhecidas também pelo nome generalizado de saxitoxinas (STXs). Na "*VII International Conference on Toxic Cyanobacteria*" realizada no Rio de Janeiro, no ano de 2007, foi apresentada pela primeira vez evidência de produção de cilindrospermopsinas em linhagens brasileiras da espécie. Análises realizadas por técnicas de LC/ESI ("*Liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry*") confirmaram a produção de cilindrospermopsina em amostras de séston e culturas de *C. raciborskii* isoladas no estado de Minas Gerais (Moreira e Bizi, 2007). Porém, não encontramos esses resultados publicados em periódicos indexados até o momento.

A linhagem brasileira de *C. raciborskii* estudada nesta tese T3 pode ser considerada como linhagem referência de *C. raciborskii* produtora de STXs. Alguns

estudos foram publicados com essa linhagem por alguns grupos de pesquisa, principalmente por um grupo australiano, mas também por grupos na Espanha e na América Latina. Entretanto, apenas dois trabalhos buscaram investigar fatores que possam controlar, ou pelo menos, influenciar a produção de toxinas pela espécie (Pomati *et al.*, 2004 e Kellman e Neilan, 2007).

A partir de observações acerca de condições ambientais descritas em ecossistemas aquáticos continentais onde comumente tem havido ocorrência de florações de *C. raciborskii*, o estudo desta tese tem enfoque em parâmetros ecofisiológicos de *C. raciborskii* (linhagem T3, produtora de STXs) através da investigação dos efeitos de três variáveis ambientais: (i) intensidade luminosa, (ii) qualidade da luz e (iii) concentração de diferentes íons dissolvidos.

Nesta tese é apresentado o conjunto de trabalhos publicados ou em processo de publicação, gerados durante o desenvolvimento das investigações, assim como uma descrição resumida de resultados e discussão.

Durante a elaboração desta tese foram gerados três trabalhos para publicação a partir dos resultados obtidos. Um desses já está publicado e dois estão submetidos. Outro trabalho foi escrito durante o desenvolvimento desta tese e trata da produção de cilindrospermopsina por duas linhagens da espécie. O manuscrito trata do efeito da intensidade luminosa sobre a produção de cilindrospermopsina por duas linhagens australianas de *C. raciborskii*. Como o estudo que possibilitou a redação desse último manuscrito foi iniciado durante a obtenção do título de mestre, optamos por não contá-lo como parte integrante da tese, mas apenas como produção científica durante esse período. O manuscrito está incluído entre anexos desta tese e será submetido ao periódico **Phycologia**. Por conseguinte, a tese está dividida em três capítulos.

Em cada capítulo é feito um resumo da metodologia, resultados e discussão. Ao final da tese, há ainda a apresentação de uma discussão geral do estudo, definição das conclusões e delineamento de perspectivas que este trabalho permitiu estabelecer através do levantamento de novas perguntas que surgiram durante o estudo.

No capítulo primeiro, investigamos os efeitos da intensidade e qualidade da luz sobre o crescimento e produção de STXs por *C. raciborskii* T3. Foi gerado um trabalho, já publicado no periódico **Journal of Plankton Research**, **31(5)**, **2009**, que mostra pela primeira vez a ocorrência de um ritmo circadiano de produção de STXs nessa espécie.

Nos ambientes aquáticos brasileiros com florações de *C. raciborskii* frequentes, a condutividade, a salinidade, a alcalinidade ou a dureza da água geralmente é alta. Essas variáveis são medidas indiretas da quantidade de íons dissolvidos na água, muitos deles presentes em altas concentrações. No capítulo segundo, investigamos então os efeitos da adição de diferentes sais, proporcionando diversos íons, em diferentes concentrações, sobre o crescimento e produção de STXs. Dessa etapa, foi gerado mais um trabalho que está submetido ao periódico **Journal of Plankton Research**.

A partir das hipóteses que levantamos, foi pertinente pensar que a adaptação às características da água poderia ser traduzida na síntese protéica das células dessa espécie. Para avaliar essa hipótese, a pretensão era estudar o proteoma das células de *C. raciborskii* sob os diferentes tratamentos. Entretanto, a fase de desenvolvimento da metodologia persistiu durante, praticamente, os quatro anos de elaboração desta tese. Metodologias pré-existentes de análise de proteínas solúveis em bactérias necessitaram de adequações para serem usadas com a cianobactéria

em questão. Os projetos proteomas em cianobactérias são relativamente recentes, fato refletido no número de trabalhos publicados nos últimos dez anos (apenas 37 registros de outubro de 1999 até abril de 2009 são verificados no www.isiknowledge.com, quando se procura a combinação cianobactéria e proteoma). No capítulo terceiro, verificamos mudanças no padrão protéico de células de *C. raciborskii* T3 submetidas ao estresse por cálcio. Um manuscrito foi gerado e está submetido ao periódico **Applied and Environmental Microbiology**.

Todos os manuscritos e o trabalho já publicado estão nos anexos da tese (formatados de acordo com as diferentes regras dos periódicos aos quais foram submetidos). Nos anexos também consta uma atividade de extensão e divulgação científica realizada durante o período da tese (Folder para distribuição à população sobre a qualidade da água, produzido em parceria com o “Espaço Ciência Viva” - RJ).

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Cianobactérias e cianotoxinas

As cianobactérias são procariotos fotoautotróficos, pertencentes ao domínio Bacteria. Esses micro-organismos são considerados descendentes modernos dos primeiros organismos fotossintetizantes (com existência estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos). Esses primeiros organismos desenvolveram pigmentos capazes de captar a luz visível (e Cox, 2002). Esse foi um evento evolutivo que possibilitou o desenvolvimento do processo fotossintético, atualmente semelhante ao de algas e vegetais superiores, em que há síntese de clorofila-*a* como principal pigmento de captação da luz e a participação da água como doador de elétrons. Da água também ocorre liberação de oxigênio molecular (O₂) para a atmosfera. O aparecimento de um aparato fotossintético, capaz de transformar água em oxigênio, prótons e elétrons, proporcionou uma inovação evolutiva que permitiu a existência de organismos aeróbios, a partir de anaeróbios ancestrais (Dismukes *et al.*, 2001).

As cianobactérias sintetizam uma gama de pigmentos acessórios, predominantemente ficobiliproteínas (ficoeritrina - vermelho e ficocianina - azul), além de alguns carotenóides (alaranjados) que auxiliam tanto na captação de luz como na proteção contra foto-oxidação da clorofila-*a* (Nelson e Cox, 2002). A composição desses pigmentos confere variações de coloração em espécies do grupo - verde-azuladas, verde-acinzentadas, amarelo-amarronzadas ou variando do violeta ao vermelho (Bryant *et al.*, 1979). Em resposta a mudanças ambientais, principalmente à qualidade da luz, a síntese de alguns desses pigmentos pode variar, em particular a das ficobiliproteínas (Bryant *et al.*, 1979).

Ecologicamente, cianobactérias são microrganismos que estão inseridos no fitoplâncton de águas marinhas e continentais. Participam como produtores

primários desses ecossistemas, juntamente com outros organismos como as microalgas. A diversidade do fitoplâncton e sua distribuição nos sistemas aquáticos dependem de fatores bióticos e abióticos complexos. Alguns fatores principais podem governar a dinâmica da comunidade fitoplanctônica como: (i) a disponibilidade de recursos, principalmente luz e nutrientes, (ii) a extensão e frequência de alguns fatores físicos, como turbulência e (iii) outros como competição e herbivoria (Reynolds, 2006). Em resposta às flutuações de um ou outro fator, ou de vários desses em sinergismo, uma distribuição diferenciada de espécies do fitoplâncton pode ocorrer, principalmente em função da temperatura, da salinidade, da disponibilidade dos nutrientes inorgânicos e do pH (Straskaba et. al, 1993; Henry, 1999; Codd, 2000).

As cianobactérias possuem alta plasticidade morfológica, indo desde formas unicelulares cocóides a tricomas (fileira de células), filamentos (tricoma envolto em bainha de mucilagem) ou colônias (de células cocóides ou de tricomas). Esses microrganismos são encontrados nos mais variados ambientes, dentre os quais: geleiras, solos de deserto, fontes termais e mesmo em locais com baixas concentrações de oxigênio ou altas incidências de radiação ultravioleta (Weber et al., 1996; Caztenholz, 1973 revisto por Molica, 2003). Alguns fatores são considerados responsáveis pela dominância de algumas cianobactérias sobre outros grupos do fitoplâncton. Por exemplo, adaptações morfológicas, como vesículas gasosas (aerótopos), que possibilitam a migração na coluna d'água (considerada uma adaptação a diferentes intensidades luminosas), a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e de assimilação de fósforo, estão entre esses fatores (Paerl, 1988; Reynolds, 2006).

O sucesso das cianobactérias em diferentes ambientes também tem sido relacionado principalmente à estabilidade física da coluna d'água, temperaturas elevadas e valores de pH entre 7 e 9 (Paerl, 1988; Padisák, 1997; Shapiro, 1990). As cianobactérias podem se tornar dominantes em condições da água com pH neutro-alkalino, altas concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e temperaturas entre 15 a 30°C, crescendo exageradamente e formando o que é conhecido como floração. As florações são facilmente reconhecidas pela formação de uma densa camada de células, muitas vezes vista a olho nu. Todavia, uma floração é também considerada como tal a partir do momento em que há a observação de um aumento significativo de biomassa fitoplanctônica em um ambiente, além do comumente observado (Whitton e Potts, 2000).

O fator mais fortemente apontado como responsável pela dominância das cianobactérias é a eutrofização antrópica de corpos d'água (gerada pelo grande aporte de N e P, oriundos principalmente de esgotos doméstico e industrial e da agricultura). Nessa condição (água eutrofizada), as cianobactérias apresentam vantagem competitiva, adquirindo mais rapidamente os nutrientes disponíveis. Alguns dos problemas que as florações de cianobactérias podem causar na água são: aumento de turbidez; diminuição de oxigênio dissolvido; deterioração da qualidade da água; perdas de qualidades cênicas, morte extensiva de peixes e produção de odores desagradáveis (Funasa, 2003; Hudnell, 2008; Smith *et al.*, 2008).

Dentre as características mais marcantes das cianobactérias está o fato de serem capazes de sintetizar diversos produtos metabólicos com ação tóxica (cianotoxinas) a diferentes organismos (Hudnell, 2008). Porém, o significado ecológico e ou ecofisiológico da produção de cianotoxinas ainda não foi devidamente estabelecido.

Inicialmente, as cianotoxinas foram classificadas como não essenciais para a sobrevivência desses microrganismos, sendo considerados como proteção contra herbivoria (Carmichael, 1992). Entretanto, evidências filogenéticas relataram a possibilidade do gene de produção de microcistinas estar presente em grande número de ancestrais de cianobactérias. Essa característica teria sido perdida e não adquirida durante a evolução de algumas cianobactérias e existiria mesmo antes do surgimento de metazoários como copépodos e cladóceros (Rantala *et al.*, 2004). Somando-se a essas observações, outras hipóteses têm sido levantadas acerca do papel de cianotoxinas, para a fisiologia do próprio grupo. Essas poderiam ser mediadoras, em interações interespecíficas com bactérias heterotróficas, fungos, protozoários e mesmo microalgas (Paerl e Millie, 1996). Outra linha de investigação postula que as cianotoxinas poderiam estar relacionadas à comunicação celular intraespecífica (Dittmann *et al.*, 2001; Koscheck, 2008; Santos, 2009). Recentemente, em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa ficou demonstrado que exudatos retirados de culturas de uma linhagem de *Microcystis aeruginosa*, em determinada fase do crescimento celular, são capazes de inibir o crescimento da própria linhagem (Santos, 2009). Além disso, o crescimento da linhagem estudada foi também inibido por microcistina purificada, uma cianotoxina produzida por *M. aeruginosa*. Os efeitos observados poderiam ser associados à participação de microcistinas em sistemas de comunicação celular, conhecidos como “*quorum sensing*” (Santos, 2009).

As cianotoxinas (Fig. 1.1) também têm sido comumente descritas como nocivas por se acumularem na rede trófica ou por afetarem diretamente organismos zooplanctônicos, peixes, mamíferos, aves e seres humanos (Christoffersen, 1996; Chorus e Bartram, 1999; Codd, 2000; Ferrão-Filho *et al.*, 2002; Carmichael *et al.*,

2001; Magalhães *et al.*, 2001 e 2003; Paerl *et al.*, 2001; Rocha, 2007; Silva, 2008; Soares, 2008). Quimicamente e farmacologicamente as cianotoxinas mais conhecidas são classificadas como peptídeos cíclicos hepatotóxicos (microcistinas e nodularinas), alcalóides neurotóxicos, citotóxicos ou alergênicos (anatoxina-a, anatoxina-a(s), aplisiatoxinas, cilindropermopsinas, lingbiatoxinas, saxitoxinas), lipopolissacarídeos irritantes ao contato e um aminoácido atípico, o BMAA, neurotóxico (Hudnell, 2008).

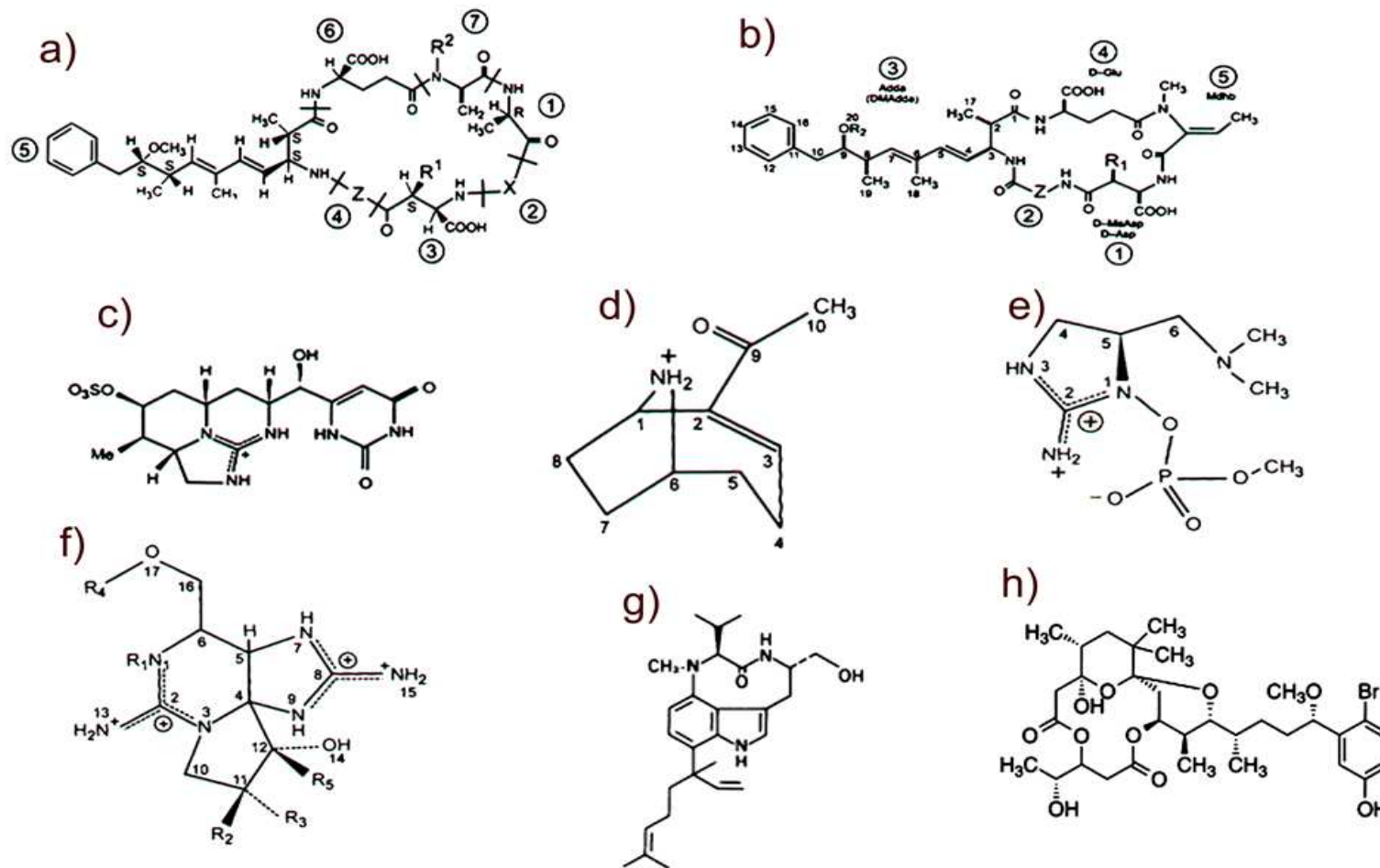


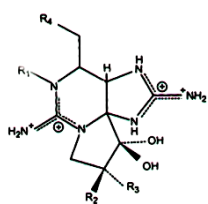
Figura 1.1 – Estruturas químicas das principais cianotoxinas. a) Microcistinas, alterações nas posições R1 e R2 proporcionam variantes desta toxina; b) Nodularina; c) Cylindrospermopsina; d) Anatoxina-a; e) Anatoxina-a(s); f) Saxitoxinas, alterações nas posições R1-R5 proporcionam variantes desta toxina; g) Lingbiatoxina; h) Aplysiatoxina.

1.2 - Saxitoxinas

Sommer *et al.* (1927, revisto por Ragelis, 1984) relacionaram pela primeira vez a intoxicação e a morte causada por consumo de mexilhões na Califórnia, EUA, com a presença de uma microalga na água do mar, *Alexandrium catenella*. As saxitoxinas receberam inicialmente o nome de PSP (*Paralytic shellfish poisoning – Veneno paralisante de moluscos*) devido à associação da intoxicação com a ingestão de mariscos, mexilhões e ostras, que acumulam a toxina ou a microalga em seus tecidos. O primeiro documento relatando a ocorrência de PSPs (ou atualmente também chamadas PSTs – T de “toxin”) ocorreu no Canadá em 1798 e descrevia o envenenamento por mexilhões de alguns tripulantes da expedição “*The British Columbia*” em 1793 (Lehane, 2000). Schantz *et al.* (1966, revisto por Ragelis, 1984) identificaram pela primeira vez a STX, uma PST do dinoflagelado *Gonyaulax (Alexandrium) catenella* e do molusco *Mytilus californianus*. Saxitoxinas (STXs), nome mais utilizado para essas PSTs, é um nome que agrega diversas toxinas, em torno de 20 análogos identificados entre dinoflagelados e cianobactérias como: saxitoxinas (STX, NSTX - neosaxitoxina, dcSTX – decarbamoil STX e dcNSTX – decarbamoil NSTX), ciguatoxinas (CTX), goniautoxinas (GTX) (Oshima, 1995; Chorus e Bartram, 1999).

As STXs de ocorrência mundial mais comum são: STX, NSTX, GTX I, II, III, IV e CTX (Lehane, 2000). A estrutura química básica de todas é um esqueleto de tetrahidropurina com dois grupos guanidínicos (Lehane, 2000). São alcalóides carbamatos, não sulfatados (STX e NSTX), sulfatados (GTX) ou duplamente sulfatados (CTX) além de variantes decarbamoil e deoxidecarbamoil dessas (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Saxitoxinas identificadas por Oshima (1995). Fórmula estrutural de Yoshida *et al.* (1996)^a.

Fórmula estrutural	R1	R2	R3	R4 -O ₂ CNH ₂	R4 -O ₂ CNHSO ₃	R4 -OH	R4 -OH
	H	H	H	STX ^b	GTX5(B1)	dcSTX ^f	doSTX ^g
	OH	H	H	NSTX ^c	GTX6(B2)	dcNSTX	-
	OH	-OSO ₃	H	GTX1 ^d	CTX3 ^e	dcGTX1	doGTX2
	H	-OSO ₃	H	GTX2	CTX1	dcGTX2	doGTX3
	H	H	-OSO ₃	GTX3	CTX2	dcGTX3	-
	OH	H	-OSO ₃	GTX4	CTX4	dcGTX4	-

^aModificado de Lehane (2000). ^bSTX=saxitoxina. ^cNSTX = neosaxitoxina. ^dGTX = goniautoxina. ^eCTX = ciguatoxina. ^fdc = variante decarbamoil. ^gdo = variante deoxidecarbamoil.

Alguns estudos propuseram a via de síntese química das STXs (Shimizu, 1993; Fleming e Dubois, 2006; Kellman e Neilan, 2007). A STX seria a primeira variante a ser sintetizada (Shimizu, 1993; Kellman e Neilan, 2007; Kellman *et al.*, 2008 a e b). A síntese seria iniciada a partir de arginina, S-adenosilmetionina e acetato, com catálise por uma policetídeo sintase. Essa enzima realizaria a metilação do acetato e uma condensação de Claisen entre o propionato e a arginina (Claisen é uma reação entre dois ésteres e uma cetona, na presença de base forte, formando uma ligação simples carbono-carbono) (Fig. 1.2). Outros passos envolveriam a catalisação de três reações de hetero-ciclizações e várias reações coordenadas resultariam nas numerosas variantes da toxina (Shimizu, 1993; Kellman e Neilan, 2007; Kellman *et al.*, 2008 a e b).

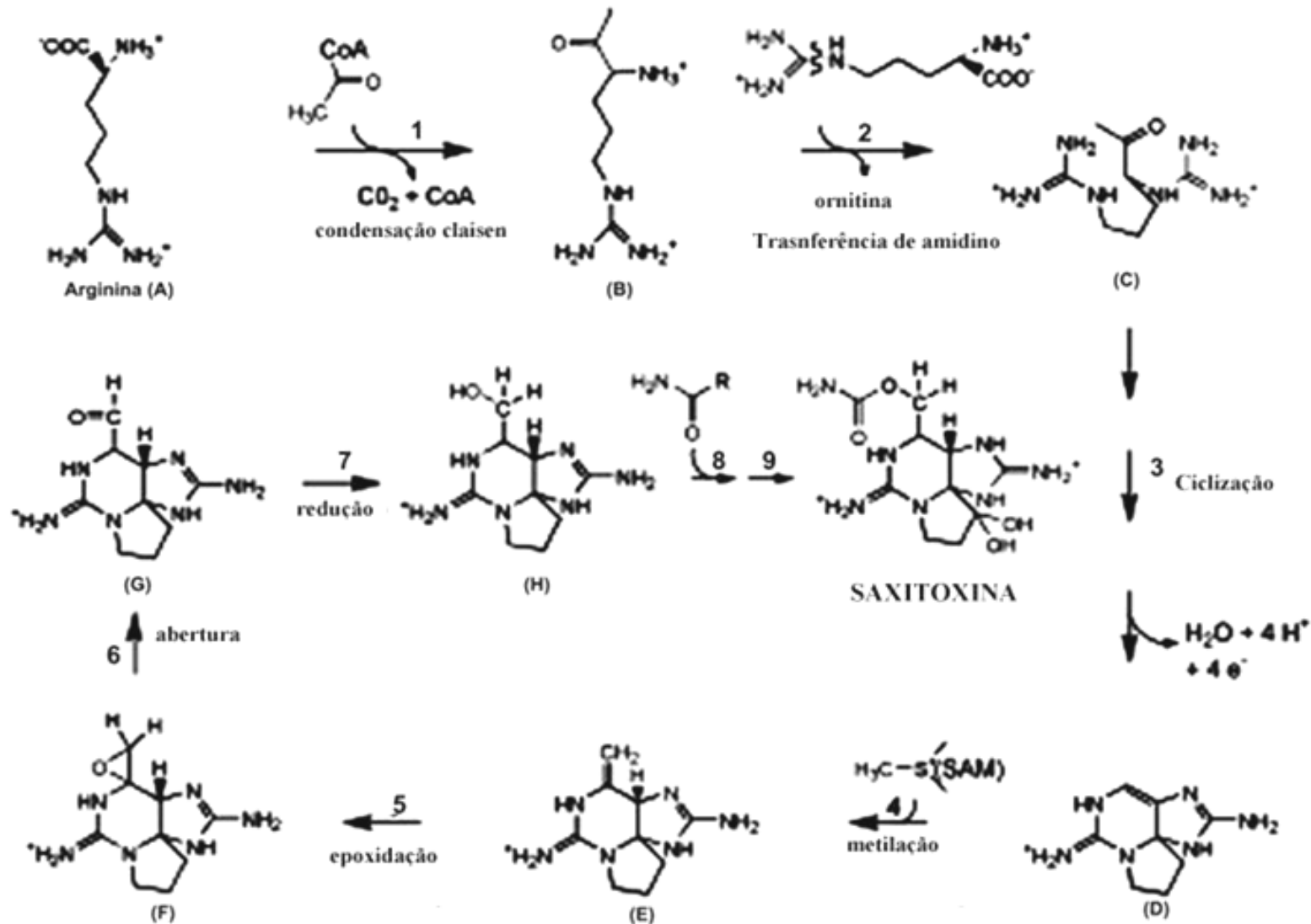


Figura 1.2 - Síntese hipotética de saxitoxina (STX) como proposto por Shimizu (1993). Os intermediários hipotéticos estão representados pelas letras entre parêntesis. Os números representam os intermediários da reação. SAM, S-adenosilmetionina. Fonte: Kellman *et al.* (2008).

Recentemente, o locus gênico responsável pela produção de STXs em *C. raciborskii* foi descrito por Kellman e Neilan (2007). Outros conjuntos de genes provavelmente responsáveis pela síntese de STXs em algumas cianobactérias como *A. circinallis*, *A. flos-aquae* e *L. wollei* foram revelados por homologia funcional e pela análise de um intermediário da biossíntese de STX (Kellman *et al.*, 2008 a). Kellman *et al.* (2008 b) sugeriram que os genes para produção de STXs teriam sido adquiridos de outros microrganismos por transferência gênica horizontal. A metade dos genes, nomeados *stx*, apresentou homologia com outras bactérias como proteobactérias e actinomicetes. Contudo, a maior evidência para transferência horizontal seria a organização estrutural dos genes *stx* que inclui pequenas sequências móveis, fagos e transposons (Kellman *et al.*, 2008 b).

Algumas citações bibliográficas sobre cianobactérias produtoras de STXs são antigas. Os primeiros relatos ocorreram na década de 1960, sendo descritos em *Aphanizomenon flos-aquae* (Jachim e Gentile, 1968 e Sawyer *et al.*, 1968 revisto por Lagos *et al.*, 1999). Atualmente, a produção de STXs também já foi confirmada em outras cianobactérias como *C. raciborskii*, *C. phillipinensis*, *Aphanizomenon lemmermannii*, *Anabaena circinalis*, *A. lemmermannii*, *Lyngbya wollei*, *Phormidium sp* e *Trichodesmium thiebautii* (Hudnell, 2008).

Evans (1965) e Kao e Nishiyama (1965, revistos por Lehane 2000) relataram pela primeira vez que a morte causada por envenenamento por STXs era devida ao bloqueio de canais de sódio em membranas de células nervosas e musculares. Os sinais clínicos de intoxicação humana incluem tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia. Alguns autores relataram a morte de animais em decorrência da intoxicação por STXs por consumo de águas com florações de cianobactérias. Negri *et al.* (1995) associaram

a morte de carneiros e ovelhas a florações de *Anabaena circinalis* em reservatórios na Austrália. Esses autores identificaram como causa das mortes dos animais a exposição a toxinas do tipo CTX e GTX.

STXs apresentam variação em sua estabilidade em função das condições do meio. Alfonso *et al.* (1994) realizaram um estudo sobre a estabilidade de STXs em função da temperatura, mostrando que a STX é relativamente estável por até dois anos, tanto em solução ácida, como seca por liofilização, em temperaturas de -80°C, -20°C e 4°C. Jones e Negri (1997) demonstraram que STXs persistem por até três meses em rios, águas de irrigação e por longo período em água destilada, a 25°C. A meia-vida calculada para as toxinas, estudadas dissolvidas em água destilada foi: CTX1 + CTX2, vinte e um dias; dcGTX2 + dcGTX3, vinte e sete dias e GTX2 + GTX3, 46 dias. Em água de rio não esterilizada (usada na irrigação) a meia-vida calculada foi: CTX1 + CTX2, nove dias; dcGTX2 + GTX3, dezessete dias e GTX2 + GTX3, vinte e oito dias. Hoeger *et al.* (2004) destacaram que métodos utilizados no tratamento de água para remoção de cianobactérias são pouco eficazes na remoção de STXs. A floculação de 99% do total de células não foi capaz de remover STXs, persistiu dissolvido em torno de 60% do total quantificado antes do procedimento. No mesmo sentido, a floculação e posterior filtração da água deixaram de eliminar em torno de 40% do total de STXs (Hoeger *et al.*, 2004).

1.3 - Cianobactérias, relógio biológico e ritmos circadianos

Ritmos circadianos, como o adjetivo sugere, são variações onde o pico ou máximo de um evento metabólico ocorre e recorre no período (circa) de um dia (diem). Essa noção é bem conhecida pela ciência, tendo sido primeiramente descoberta em plantas, ainda no século XVIII (Golden *et al.*, 1997). O primeiro grande salto no conhecimento sobre a ocorrência de ritmos circadianos em eventos metabólicos ocorreu com o trabalho realizado por Bünning (1930, revisto por Sweeney, 1987), que observou o movimento de folhas de feijão (*Phaseolus*) ocorrendo em um período de 25h e 24min, em escuro constante e em exatas 24h, quando ocorria um estímulo luminoso. Esse processo foi entendido como uma mensuração do tempo pela planta.

Atualmente, pesquisadores da área de cronobiologia estudam o chamado relógio biológico, que seria o controlador genético dos ritmos circadianos. Existem definições próprias para os fenômenos da área. Por exemplo, um ritmo pode ser do tipo “entrained” (Fig. 1.3a), aquele que seria sincronizado em períodos (entendidos como tempo de recorrência do máximo ou mínimo de um processo) com exatas 24h de recorrência. Esse tipo poderia ocorrer em condições onde existissem variações de um estímulo, como por exemplo, a alternância entre períodos luminosos e de escuro (Andersen, 2005). Um ritmo circadiano pode ser também do tipo “free-running” (Fig. 1.3b). Esse ritmo poderia ser observado em condições constantes, como exposição à luz sem ocorrência de escuro (ou vice-versa) e com período maior ou menor que 24h (Andersen, 2005).

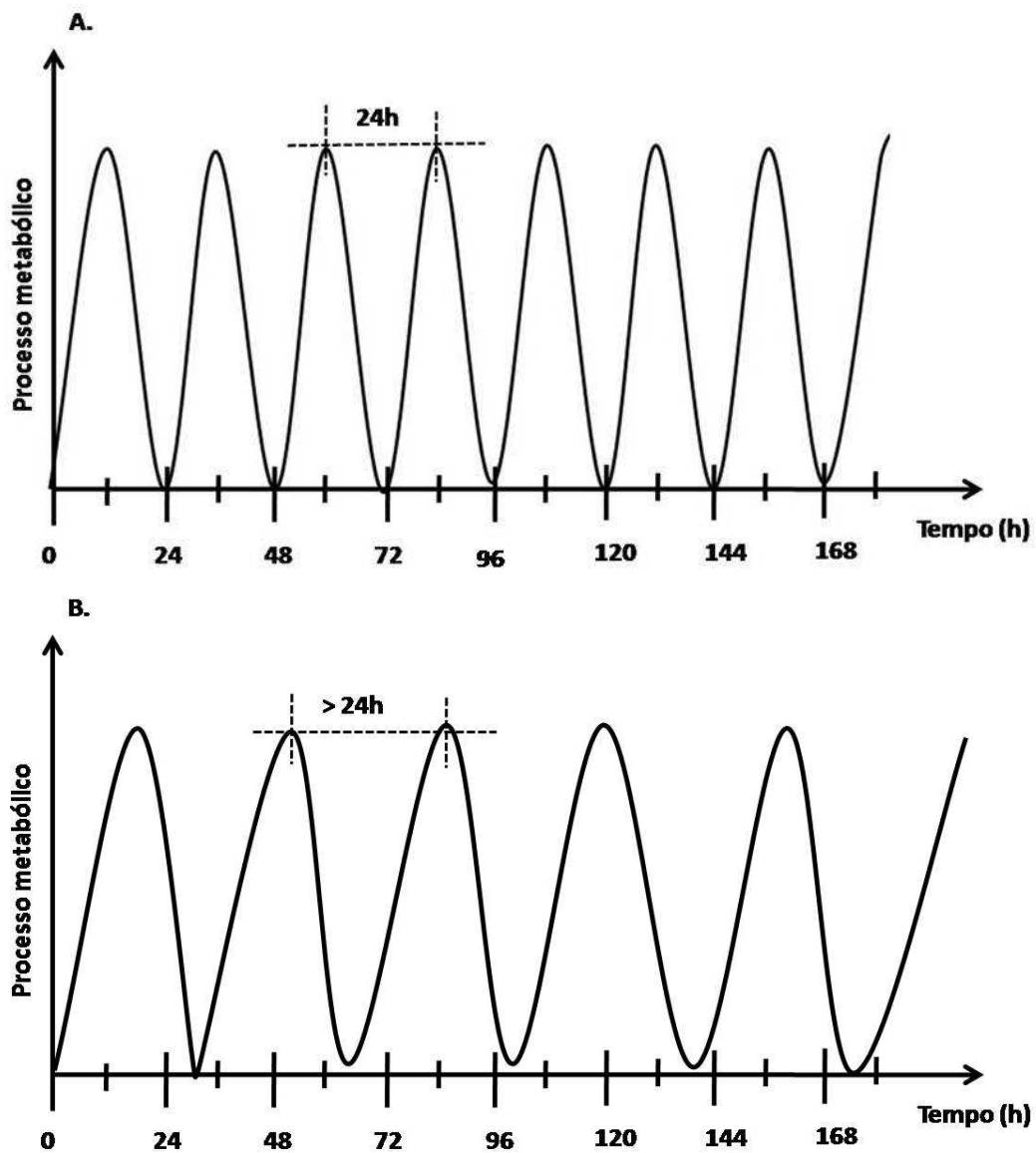


Figura 1.3 – Representações gráficas dos tipos de ritmos circadianos de um processo metabólico. Os exemplos são apenas ilustrativos e não se refere a nenhum processo metabólico, em especial. A. ritmo do tipo “entrained”, com período exato de 24h; B. ritmo tipo “free-running”, com período maior que 24h. Definições de Andersen (2005).

O comportamento circadiano foi reportado em muitos processos metabólicos, ao longo do século XX. Até bem recentemente, acreditava-se que esses ritmos eram exclusivos do domínio Eucarya (Iwasaki e Kondo, 2004). Os processos referenciados nesse domínio foram do metabolismo de microrganismos unicelulares, passando pela saída do estágio de pupa em insetos e chegando até mesmo no controle do tempo de sono em humanos (Harmer *et al.*, 2001). Todos são reconhecidos como evidências da existência de um entendimento do tempo por parte do relógio biológico endógeno.

A ocorrência de fixação de nitrogênio em espécies unicelulares de cianobactérias (espécies diazotróficas) era até certo ponto considerada um paradoxo, pela simples inoperância da nitrogenase na presença de oxigênio. Um estudo-marco, realizado por Mitsui *et al.* (1986), mostrou que fotossíntese e fixação de nitrogênio eram eventos separados temporalmente e mantinham ritmos circadianos com picos em horários opostos, fotossíntese no período luminoso e fixação de nitrogênio no período escuro. Foi sugerido que esse controle poderia ser realizado por um relógio endógeno. De fato, a partir da última década, comportamentos circadianos foram reportados em cianobactérias (McClung, 2001; Suzuki e Johnson, 2001; Iwasaki e Kondo, 2004). Sabe-se atualmente que diferentes tipos de relógio são encontrados na natureza, com a habilidade de iniciar e reiniciar um processo por indução ambiental (Young e Kay, 2001).

Em cianobactérias, se sabe atualmente que o relógio biológico opera por controle de expressão gênica, envolvendo os genes *kai*, bastante conservados em diversas espécies (Lorne *et al.*, 2000). Seus produtos, as proteínas KaiABC, exercem papel fundamental no controle dos diferentes ritmos circadianos (Golden e Canales, 2003; Iwasaki e Kondo, 2004).

Os processos citados na literatura que podem ser controlados por esse relógio endógeno em cianobactérias incluem a fixação de nitrogênio, fotossíntese, divisão celular, aquisição de aminoácidos e a síntese de carboidratos (Iwasaki e Kondo, 2004). Mais recentemente, outros ritmos circadianos na bioluminescência (Mihalcescu *et al.*, 2004) e na síntese de microcistinas (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2004) foram reportados em cianobactérias.

1.4 - Cianobactéria e proteoma

O termo proteômica (do inglês – *proteomic*) é utilizado para descrever o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo, em determinado momento (Anderson e Anderson, 1996). Os primeiros estudos envolvendo a análise de expressão de proteínas em larga escala foram iniciados na década de 70 com os trabalhos de O'Farrell, Klose e Scheele (todos publicados em 1975 e revistos por Graves e Haystead, 2002) com o mapeamento de proteínas de *Escherichia coli*, rato e porco, respectivamente. Esses trabalhos utilizaram eletroforese bidimensional (2-DE) para separar as proteínas, que foram visualizadas, mas não identificadas. Tecnologias de identificação de proteínas se iniciaram com o sequenciamento pela degradação de Edman (Edman, 1949 revisto por Graves e Haystead, 2002) e evoluíram até que se chegasse ao uso da tecnologia da Espectrometria de Massa (MS) (Andersen e Mann, 2000).

O atual objetivo da proteômica é obter de maneira global e integrada uma visão sobre todas as proteínas da célula, ao contrário de cada uma individualmente (Graves e Haystead, 2002). Tais estudos podem fornecer informações como fenótipos de células, mecanismos de ação de doenças e efeitos do ambiente sobre os organismos, que não podem ser deduzidos apenas a partir das sequências gênicas (Wilkins *et al.*, 1995; Celis *et al.*, 2000; Lery, 2007). Em suma, é possível observar alterações quantitativas, detectar modificações ou identificar interações protéicas ou estabelecer a dinâmica celular de proteínas e seus complexos (Fig. 1.4). Respostas celulares a ambientes alterados ou a um parâmetro ambiental (luz, temperatura, etc.) podem também ser caracterizadas a partir da construção de mapas proteômicos (Lery, 2007).

Dentre 62 trabalhos publicados, desde 1999, listados num site especializado de busca de bibliografia (Pubmed, www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) sobre proteoma envolvendo cianobactéria, 46 foram publicados nos últimos cinco anos, o que revela que o estudo de proteomas desse grupo só tem se intensificado recentemente. O trabalho pioneiro nesta área foi publicado em 1997 iniciando o projeto proteoma de *Synechocystis* sp. (Sazuka e Ohara, 1997). Os gêneros *Synechocystis* e *Nostoc* têm sido os mais estudados em análises proteômicas que se dedicam principalmente a caracterizar a composição total de proteínas ou de frações celulares (Srivastava *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006; Rajahlati *et al.*, 2007; Ow *et al.*, 2008), além de respostas metabólicas a estímulos ambientais como luz, salinidade ou disponibilidade de nitrogênio (Ehling-Schluz *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2006; Stensjö *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2009), para citar alguns exemplos.

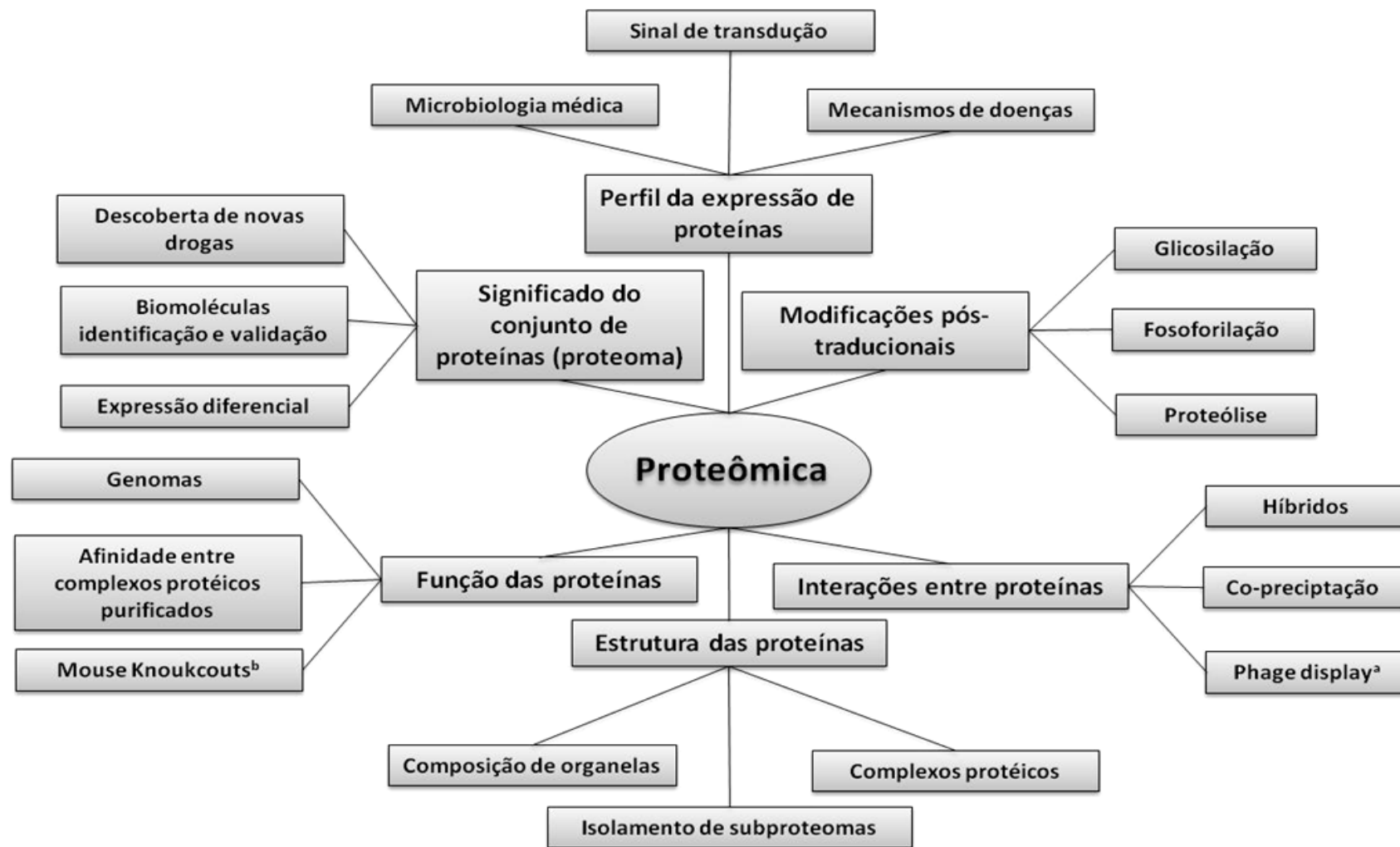


Figura 1.4 – Tipos de estudos proteômicos e suas aplicações. Modificado de Graves e Haystead (2002). ^aPhage display, método para estudos de interações proteína-proteína, proteína-peptídeo ou proteína DNA, que usa bacteriófagos para codificar as informações; ^bMouse knockouts são inativações de genes, em camundongos, usados para conhecer a função de proteínas.

1.5 - Ecofisiologia, toxicologia e estudos moleculares sobre *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii (domínio Bacteria; ordem Nostocales) é uma cianobactéria que se apresenta como uma cadeia de células formando tricomas (Fig. 1.5). Os tricomas são solitários, cilíndricos, podendo ser retos, sigmóides ou espiralados, mas ligeiramente estreitos (afilados) nas extremidades. Seenaya e Subba Raju (1972, revisto por Shafik, 2003), transferiram *Anabaena* (*Anabaenopsis*) *raciborskii* (Woloszynska) para *Cylindrospermopsis raciborskii*, fundamentalmente pelo fato da espécie ser capaz de diferenciar células vegetativas em heterocistos (Fig. 1.6). Em *C. raciborskii* os heterocistos são desenvolvidos a partir de células terminais, que se dividem em duas e a mais apical das células geradas se modifica tornando possível um ambiente anóxico, consonante com o funcionamento da nitrogenase (Moore *et al.*, 2005). A diferenciação de heterocistos pode ocorrer nas duas extremidades de um mesmo tricoma (Shafik, 2003).

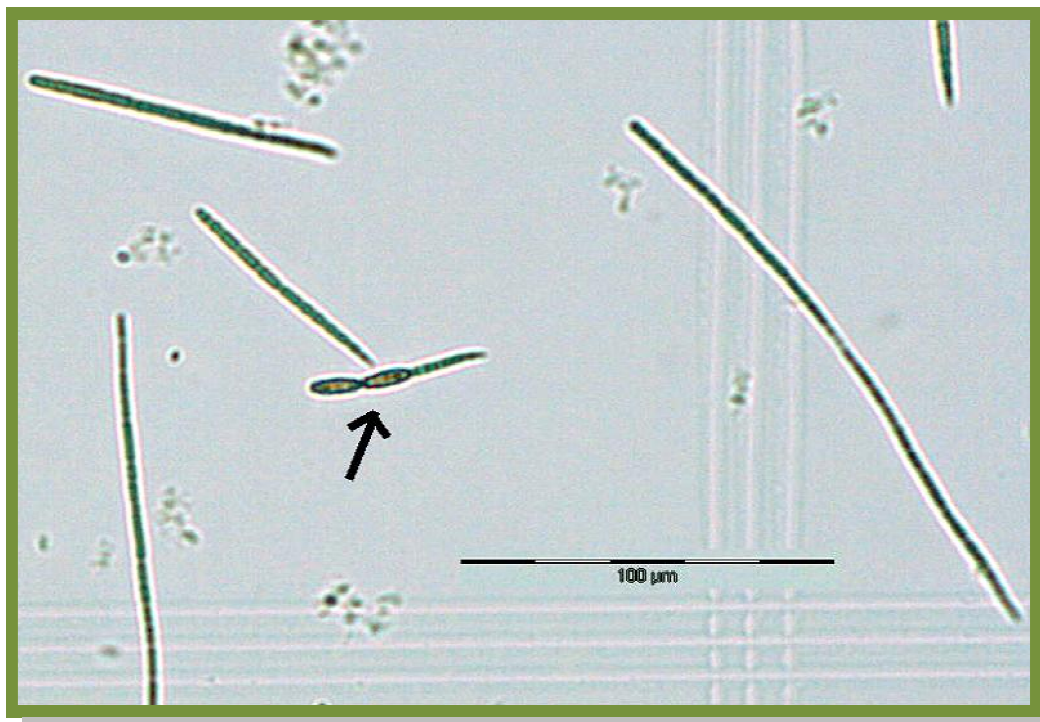


Figura 1.5 – *Cylandrospermopsis raciborskii* (linhagem T3). Detalhe superior, acineto e acineto com células vegetativas, mostrando o início de um novo filamento. A seta indica acinetos. Linhagem mantida na coleção de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias.

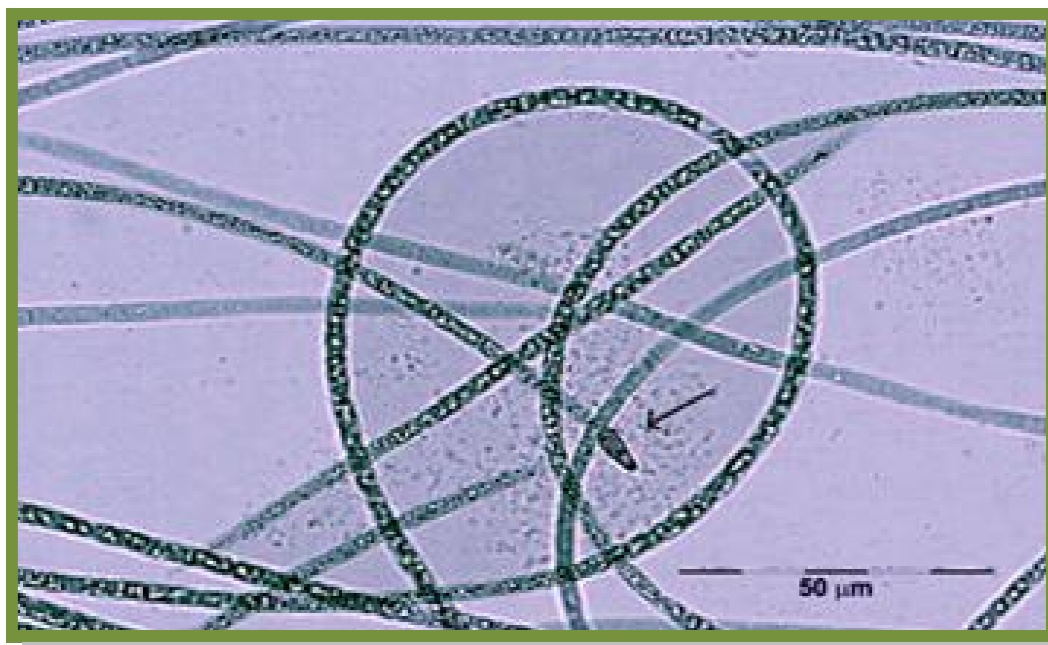


Figura 1.6 – *Cylandrospermopsis raciborskii* (linhagem ITEP A3). A seta indica heterocisto terminal. Linhagem mantida na coleção de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias.

A presença de heterocisto e a capacidade de fixação de nitrogênio classificam *C. raciborskii* entre as cianobactérias diazotróficas. Outras características marcantes da espécie são: (i) suas células, também cilíndricas, apresentarem um adensamento de vacúolos gasosos (aerótopos) divididos por paredes às vezes densas e conspícuas, visíveis em microscopia óptica (Molica, 2003; Shafik, 2003; Hamilton *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006); (ii) o afilamento das extremidades dos heterocistos ou das células apicais dos tricomas (Shafik, 2003); (iii) diferenciação de células vegetativas em acinetos, esporos de resistência que se apresentam solitários ou em duplas, ao longo do tricoma. Quando presentes são separados da célula terminal por uma a três células vegetativas (Fig. 1.5) (Shafik, 2003).

De acordo com estudos ecofisiológicos, *C. raciborskii* é uma espécie capaz de formar florações. *C. raciborskii*, antes considerada de origem tropical, tem ao longo das duas últimas décadas aumentado sua distribuição que agora é considerada mundial (Wiedner *et al.*, 2007). As ocorrências de florações da espécie em diferentes partes do mundo incluem, por exemplo: (i) Austrália (Hawkins *et al.*, 1985); (ii) Áustria (Dokulil e Mayer, 1996); (iii) alguns outros países da Europa, além da América do Norte e do Sul (Chapman e Schelske, 1997; Padisák, 1997; Bouvy *et al.*, 1999; McGregor e Fabbro, 2000); (iv) Grécia (Hindak e Moustaka, 1988), (v) Hungria (Borics *et al.*, 2000), (vi) Alemanha (Fastner *et al.*, 2003), (vii) Portugal (Saker *et al.*, 2003), (viii) Canadá (Hamilton *et al.*, 2005); (ix) Egito (Mohamed, 2007), (x) África (Haande *et al.*, 2008).

Muitas vezes, os relatos descrevem apenas a ocorrência da espécie e sua possível toxicidade. Todavia, alguns motivos para o sucesso ecológico da espécie em vários ecossistemas foram levantados há mais de doze anos por Padisák (1997), que reportou: (i) habilidade de migrar, permitindo a exploração de várias camadas na

coluna d'água; (ii) alta taxa de assimilação do amônio, possibilitando sua rápida metabolização; (iii) grande afinidade por fósforo e grande capacidade de armazenar esse elemento; (iv) resistência à predação pelo zooplâncton e (v) baixo requerimento por luz, como fatores que favorecem sua dominância. Recentemente, a espécie vem sendo considerada invasora e tem sido reportado que sua distribuição e dominância estão associadas à mudança global de temperatura (Molica, 2003; Briand *et al.*, 2004; Wiedner *et al.*, 2007). Somando-se a essas características, a síntese de possíveis inibidores alelopáticos, também poderia estar contribuindo para esse sucesso e ampla distribuição (Figueiredo *et al.*, 2007; Soares, 2008).

O interesse mundial por *C. raciborskii* tem aumentado cada vez mais, em parte por estar associada aos referidos prejuízos que florações podem causar à qualidade da água, em parte por apresentar linhagens toxigênicas, que podem contaminar águas de abastecimento (Chorus e Bartram, 1999; Hudnell, 2008). Os efeitos tóxicos de *C. raciborskii* causados em humanos foram observados pela primeira vez em 1979, em Solomon Dam, Palm Island, Queensland, Austrália. Um surto de hepatoenterite ocorreu em uma população abastecida com água de um reservatório onde ocorriam florações dessa espécie (Byth, 1980 e Bourke *et al.*, 1983 revisto em Griffiths e Saker, 2003). Em uma investigação epidemiológica posterior, isolou-se uma linhagem de *C. raciborskii* desse reservatório, que testada em bioensaios com camundongos gerou sintomas de hepatotoxicidade e foi então considerada como responsável pelo evento (Hawkins *et al.*, 1985).

Somente em 1992, um alcalóide foi caracterizado a partir dessa linhagem, nomeado como cilindrospermopsina (CYN) e classificado como hepatotoxina (Ohtani *et al.*, 1992). Desde então, muitas linhagens toxigênicas de *C. raciborskii* encontradas nos diferentes países tem se mostrado produtoras de CYN.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* data de 1969 (Palmer, 1969, revisto em Tucci e Sant'Anna, 2003) em uma floração inicialmente classificada como de *Anabaena flos-aquae*. Novos relatos ocorreram em maior escala nas décadas de 80 e 90 (Tucci e Sant'Anna, 2003). Lagos *et al.* (1999) relataram a ocorrência de STX, NSTX e GTX em uma densa floração de *C. raciborskii*, ocorrida no estado de São Paulo. Esse foi o primeiro relato de uma floração tóxica de *C. raciborskii* no Brasil. Desde então, todas as linhagens toxigênicas isoladas até o momento no país demonstraram produzir STXs (Lagos *et al.*, 1999; Molica *et al.*, 2002; Molica *et al.*, 2005). As variantes de STXs caracterizadas até o momento em linhagens brasileiras de *C. raciborskii* foram: STX, NSTX, decarbamoil-STX e algumas variantes de GTX (Molica, 2003).

Moreira e Bizi (2007) apresentaram um painel em congresso onde demonstraram a ocorrência de CYN em amostras de séston e de cultivo de linhagem de *C. raciborskii* isolada em Minas Gerais. Contudo, até o momento não encontramos esses resultados publicados.

Estudos de genética molecular têm investigado várias linhagens de *C. raciborskii*, procurando determinar a origem e o padrão de dispersão da espécie (Wilson *et al.*, 2000; Saker e Neilan, 2001; Dyble *et al.*, 2002; Neilan *et al.*, 2003; Haande *et al.*, 2008; Stucken *et al.*, 2009). Um total de dezenove linhagens isoladas de diferentes localidades, entre Austrália, Brasil, Canadá, Holanda e Japão, exibiu uma similaridade de 99% a 100%, nas sequências nucleotídicas do gene *rpoC1*, existente em cópia única no genoma de cianobactérias e responsável por codificar a subunidade γ da RNA polimerase (Wilson *et al.*, 2000). Baseados em análises de sequências de genes de RNA ribossomal 16S, Saker e Neilan (2001), relataram 99,8% de similaridade entre sete linhagens australianas, com morfologia reta ou

sigmóide. Outro estudo agrupou linhagens européias (húngaras, alemãs e portuguesas), separou-as das australianas e das norte-americanas, que se agruparam com linhagens brasileiras (Dyble *et al.*, 2002). Esse estudo analisou vinte e uma linhagens, observando variações no gene *nifH*, altamente conservado e codificante da dinitrogenase redutase, uma subunidade da nitrogenase (Dyble *et al.*, 2002). De outra forma, nas mesmas linhagens, a análise de sequências intergênicas (*cpaBA-IGS*), altamente variáveis, próximas ao gene envolvido com a síntese de ficobilinas, agrupou as de origem australiana com européias e separou brasileiras de norte-americanas (Dyble *et al.*, 2002). A análise da sequência repetitiva HIP1, bastante disseminada em cianobactérias, mas de função desconhecida (Hudnell, 2008), envolvendo trinta e uma linhagens agrupou (i) americanas e brasileiras e (ii) européias e australianas (Neilan *et al.*, 2003). é

Gugger *et al.* (2005), analisaram sequências espaçadoras (ITS1) do operon ribossomal e os genes *rpoC1* e *nifH*, em dezoito linhagens de *C. raciborskii* provenientes de quatro continentes. Os autores mostraram uma homologia de 98% a 100% para o gene *rpoC1* entre linhagens européias, africanas e australianas, que se separaram das americanas. Ainda, as análises do gene *nifH* agruparam: (i) linhagens africanas e australianas, (ii) linhagens americanas e (iii) linhagens européias. As análises da ITS1 agruparam as linhagens de todos os continentes com 91% de similaridade (Gugger *et al.*, 2005).

Interessante notar que os estudos agruparam as diferentes linhagens de acordo com suas origens geográficas. Esse fato é reforçado pelo recente estudo de Haande *et al.* (2008) que analisaram outras vinte e quatro linhagens de *C. raciborskii* não toxigênicas para cilindrospermopsina. Algumas dessas linhagens apresentaram toxicidade em bioensaios em ratos (sem identificação da toxina), além de duas

brasileiras produtoras de STXs. Os autores agruparam (i) linhagens africanas e australianas, (ii) linhagens européias, (iii) brasileiras e mexicanas, pela avaliação da homologia da sequência ITS-1 do operon ribossomal. Para essas mesmas linhagens, o mesmo padrão de agrupamento se repetiu de acordo com a homologia do gene *nifH* (Haand *et al.*, 2008). Todavia, as australianas e africanas se juntaram às européias quando analisadas pela sequência intergênica da ficocianina (PC-IGS), ficando novamente separadas das americanas (brasileiras e mexicanas) (Haand *et al.*, 2008).

Recentemente, Stucken *et al.* (2009) demonstraram em linhagens australianas que a toxicidade da espécie está mais associada à transferência horizontal de genes de toxicidade (Kellman *et al.*, 2008 b) do que propriamente com uma evolução convergente. É espantoso que *C. raciborskii* possa ter alta similaridade genética quando comparada com outras cianobactérias toxigênicas em que essas variações são bem altas. Como exemplo, *Planktothrix agardii*, uma espécie também filamentosa e *Microcystis sp.*, uma espécie cocóide colonial, podem apresentar variações genéticas bastante expressivas, em uma mesma população, num mesmo corpo d'água (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2005; Mbedi *et al.*, 2005; Kurmayer e Gumpenberger, 2006).

Alguns padrões em relação à toxigenicidade das linhagens de *C. raciborskii* puderam ser observados. Primeiramente, parece que ocorreu uma dispersão recente e separada da espécie em cada continente (Molica, 2003; Neilan *et al.*, 2003; Gugger *et al.*, 2005; Haande *et al.* 2008). Segundo, de acordo com essa toxigenicidade é possível agrupar linhagens australianas (produtoras de CYNs), linhagens européias, (produtoras de compostos não identificados, que apresentaram

efeitos hepatotóxicos ou neurotóxicos, em bioensaios), linhagens americanas (produtoras de CYN) e linhagens brasileiras (produtoras de STXs).

As linhagens brasileiras apresentaram-se sempre em grupos (“clusters”) destacados, nos dendogramas gerados da análise dos diferentes genes (Dyble *et al.*, 2002; Molica *et al.*, 2003; Neilan *et al.* 2003; Fastner *et al.*, 2003; Saker, *et al.*, 2003; Haand *et al.*, 2008). Essa posição de destaque das linhagens brasileiras em relação à sua toxigenicidade é uma motivação para investigar variáveis particulares dos ambientes brasileiros que possam ajudar a elucidar a ocorrência da espécie no país.

2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA TESE

2.1 – Justificativa

Nos últimos 10 anos foi crescente o número de trabalhos que abordam fatores que potencialmente se relacionam com a ocorrência de *C. raciborskii* em sistemas aquáticos brasileiros (Souza *et al.*, 1998; Huszar e Silva, 1999; Pedrosa *et al.*, 1999; Bouvy *et al.*, 1999, 2000, 2003; Chellappa e Costa, 2003; Tucci e Sant'Anna, 2003; Costa *et al.*, 2006; Panosso *et al.*, 2007; Delazari-Barroso, 2007; Soares, 2008).

Gomes *et al.* (2007), analisaram dados de cinquenta e três ecossistemas aquáticos brasileiros, concluindo que a contribuição de *C. raciborskii* era maior que 80%, ou seja, ocorre uma dominância da espécie em grande parte dos ambientes estudados. A análise dos componentes principais (PCA) levou à conclusão de que os fatores que mais favorecem a dominância de *C. raciborskii* no país são: altos valores de condutividade, alcalinidade, pH e temperatura (Gomes *et al.*, 2007).

A dominância de *C. raciborskii* no Brasil confirmou-se como favorecida pela ocorrência de baixas intensidades luminosas (Gomes *et al.*, 2007), corroborando a hipótese de Padisák (1997), que propôs para a espécie, baseado em estudos de vários países, um crescimento ótimo em torno de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Adicionalmente, experimentos em laboratório com linhagens de *C. raciborskii*, tanto de ambientes tropicais quanto de ambientes temperados, demonstraram crescimento ótimo em torno de 121 a $240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Dokulil & Mayer, 1996) e uma tolerância de até $500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Briand *et al.*, 2004).

A tabela 2.1 reúne dados de alguns dos estudos realizados no Brasil que citam a dominância ou ocorrência da espécie, ao longo dos últimos dez anos. Dentro do escopo desta tese, priorizamos a descrição da intensidade luminosa e condutividade como variáveis ambientais importantes. Entretanto, tradicionalmente, outras medidas físicas e químicas são levadas em consideração nos estudos relacionados.

Tabela 2.1 - Condutividades e intensidades luminosas associadas à ocorrência e dominância¹ de florações de *C. raciborskii* encontradas em alguns ecossistemas brasileiros².

Localidade (ambiente estudado)	Período^a	Cond^b	IL^c	Prof^d	(Meses com dominância ou ocorrência) / (percentagem média de dominância de <i>C. raciborskii</i>)	Autor
São Paulo (Reservatório Billings)	Nov/1992 - Out/1993	35 - 109	ND	0 (superfície)	(Nov/1992 - Mai/1993) / NC	Souza <i>et al.</i> (1998)
Pernambuco (Reservatório Ingazeira)	Jan/1997 - Dez/1998	611 - 1700 (maioria dos meses acima de 1000)	14 - 650 (maioria dos meses maiores que 100)	0,5	(Abril - Nov/1998) / 96,0 - 100%	Bouvy <i>et al.</i> (1999)
Rio de Janeiro (Lago Cima)	Jun/1995	35 - 49	ND	0,9 - 2,5	(Jun/1995) / 90,0%	Pedrosa <i>et al.</i> (1999)
Pernambuco (39 reservatórios)	Set - Nov/1998	198 - 19630	ND	0,5 - 12,0	(Set - Nov/1998) / 0,0% - 99,6% (maioria com mais de 80%)	Bouvy <i>et al.</i> (2000)
Rio de Janeiro, São Paulo e Pernambuco (8 Lagos e reservatórios)	Abr/1995 - Abr/1996	NC	ND	0 (superfície)	(Abr/1995 - Abr/1996) / 33 - 78%	Huszar <i>et al.</i> (2000)
Pernambuco (Reservatório Tapacurá)	Mai/1998 - Mai/2000	1015 - 1039	8 - 830	0,5	Mai/1998 - Out/1998 e Nov/1998 - Jul/1999) / 25,8 - 60,9%, respectivamente	Bouvy <i>et al.</i> (2003)
Rio Grande do Norte (Gargalheiras)	Nov/1999 - Abr/2000	221 - 365	ND	0,0, 4, 6 e 11,0	Estação de seca/ 38,0 - 48,0%	Chellappa e Costa (2003)
São Paulo (Lago das Garças)	Set/1997 - Jun/1998	96 - 171	ND	NC	(12/1997) / > 50,0%	Tucci e Sant'Anna (2003)
Rio Grande do Norte (Armando Ribeiro Gonçalves)	Abr/2000 - Dez/2000	NC	ND	NC	(Abr - Mai/2000 e Nov - Dez/2000) / > 50,0%	Costa <i>et al.</i> (2006)
Rio Grande do Norte (6 reservatórios)	Set-Dez/2002, Abr-Set/2003 e março/2004	253 - 900	ND	0,5	(12/2002, 04/2003, 03/2004) / 60,6 - 97,5%	Panosso <i>et al.</i> (2007)

Tabela 2.1 - Continuação

Localidade (ambiente estudado)	Período ^a	Cond ^b	IL ^c	Prof ^d	(Meses com dominância ou ocorrência) / (percentagem média de dominância de <i>C. raciborskii</i>)	Autor
Espírito Santo (Duas bocas)	Out/2002 - Set/2003	37 - 84	ND	Subsuperfície, profundidade de extinção de secchi*, 1% de luz (Z_{eu}^*), 0,5 acima do fundo	(Out/2002 - Mar/2003) / 25,9 - 81,6%	Delazari-Barroso (2007)
Minas Gerais (Reservatório Chapéu D'Uvas e Rio Paraibuna)	Jul/2001 - Fev/2002	40 - >160	ND	NC	(Jul/2001) / 33 - 94% (Fev/2002) / 24 - 54%	Soares <i>et al.</i> (2007)
São Paulo (Lagoa das garças)	Jan/1997 - Dez/2004	73 - 614 (constante mente > 100)	ND	NC	(Jan/1997- Jan 1998 / Set/1999 – Dez/2004) / NC	Crosseti e Bicudo (2008)
Rio Grande do Norte (Cruzeta, açude público)	Set/2004 - Jun/2005	291 - 548	ND	0, 2 e 6	(Set/2004) / 68,21%	Chellappa <i>et al.</i> (2008a)
Rio Grande do Norte (Marechal Dutra)	Dez/2003 - Jun/2004	659 - 931	ND	Superfície, 4, 8 e 11	(Dez/2003) / 90% em associação com Bloom de <i>M. aeruginosa</i>	Chellappa <i>et al.</i> (2008b)
São Paulo (Lagoa das garças)	Jan/1997 - Dez/1997	140 - 150,9	ND	Superfície, 1, 2, 3 e 4	(Set-Dez/ 1997) / 16,1% em associação com Bloom de <i>Rhaphidiopsis sp.</i>	Fonseca e Bicudo (2008)
Rio de Janeiro (Funil)	Jun/2002 - Jun/2003	70 - 110	500	Subsuperfície, 1% de luz (Z_{eu}^*), 15 e 30	(Jan-Mar/2003) / NC	Soares (2008)
Rio Grande do Norte (6 reservatórios)	Set/2002 - Mar/2004	~300 - ~1400	ND	Subsuperfície e hipolimnion (0,1 acima do sedimento)	(Abr/2003) / 85% (Reservatório Gargalheiras)	Costa <i>et al.</i> (2009)

¹As citações na tabela em relação à percentagem de dominância não necessariamente correspondem a todos os ambientes, quando o estudo refere-se a mais que um. ²Referências as quais pudemos ter acesso e que foram publicadas ao longo dos últimos 10 anos, sendo apenas 2 referências correspondentes a teses de doutorado.

^aMeses de duração de cada estudo; não discrimina o intervalo de tempo amostral. ^bCondutividade em $\mu S.cm^{-1}$. ^cIntensidade luminosa em $\mu mol\ fótons.m^{-2}.s^{-1}$. ^dProfundidade das coletas em metros. ND não medida pela mensuração em $\mu mol\ fótons.m^{-2}.s^{-1}$. NC, sem citação na referência.

*As intensidades luminosas na maioria dos estudos no ambiente, não são medidas em relação à quantidade de fótons que chega às florações, em diferentes profundidades. A penetração de luz na coluna d'água é referida como profundidade de extinção do disco de Secchi.

Fica evidente que “*in situ*”, apesar de existirem algumas citações da ocorrência de *C. raciborskii* em intensidades luminosas bastante altas, essa variável não é frequentemente mensurada como a quantidade de energia luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) que estaria favorecendo a ocorrência da espécie. Essa mensuração tradicional gera uma lacuna entre estudos de campo e de laboratório.

Levando em conta o fato de *C. raciborskii* ser descrita como uma espécie adaptada a baixas intensidades luminosas, a presença de vacúolos gasosos (aerótopos) poderia conferir a habilidade de minimizar os danos causados pela luz ao sistema fotossintético, possibilitando a busca por menores intensidades luminosas, em maiores profundidades. Ao migrar pela coluna d’água, a espécie experimental não só uma variação na intensidade luminosa, mas também na qualidade espectral da luz. Em águas claras a luz azul é o comprimento de onda na região visível que mais penetra a coluna d’água, chegando a profundidades maiores. Em águas com alta turbidez e com grande número de partículas orgânicas em suspensão (como exemplo águas eutrofizadas), a luz vermelha alcançaria uma maior profundidade, pois a luz azul seria absorvida nas camadas mais superficiais (Reynolds, 2006). Variações na intensidade luminosa e na qualidade espectral poderiam influenciar o metabolismo da espécie, refletindo na sua produção de STXs.

Hipótese primeira: O crescimento e produção de saxitoxinas por *C. raciborskii* é afetado por variações da intensidade luminosa nos diferentes ecossistemas brasileiros.

Hipótese segunda: A qualidade espectral da luz interfere na síntese de saxitoxinas durante o período a migração para altas profundidades.

Podemos também observar pelos dados levantados na tabela 2.1, que a ocorrência de *C. raciborskii* no Brasil parece não ter relação linear com a condutividade. Entretanto, as análises de correspondência canônica realizadas por Gomes *et al.* (2007) demonstraram que o sucesso de *C. raciborskii* está diretamente relacionado com a condutividade da água, na maioria dos ecossistemas brasileiros. A condutividade é uma medida indireta da concentração de sais inorgânicos em um corpo d'água, sendo definida como o quanto a água pode conduzir de eletricidade, propriedade diretamente relacionada ao tipo e à concentração de íons dissolvidos na água. Sais de carbonato, em particular, também são geralmente analisados e definem o grau de dureza da água (APHA, 1995). Alguns estudos relatam que águas de irrigação em regiões do nordeste revelam grande quantidade de carbonatos de cálcio, magnésio e sódio variando da ordem de mmol.L⁻¹ a mol.L⁻¹ (Morais *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2004). Maia *et al.* (2001) determinaram a entrada de íons em um corpo d'água do nordeste e confirmaram que águas de rios e reservatórios são afetadas por seus solos, que liberam íons como Na⁺ ou Mg²⁺ Ca²⁺, que se acumulam nesses ecossistemas conferindo-lhes alta salinidade ou condutividade. Costa *et al.* (2009) demonstraram ainda que a ocorrência de florações de *C. raciborskii* esteve associada à entrada de alguns desses íons após períodos de chuva. Por esses apontamentos, podemos supor que composição entre esses diferentes íons presentes na água exerça efeito sobre a fisiologia de *C. raciborskii*, favorecendo a produção de STXs. Essas alterações se refletiriam também na síntese de proteínas. Nesse sentido, buscamos elaborar mapas proteômicos a fim de entender as diferentes respostas metabólicas, avaliadas ao nível molecular.

Hipótese terceira: O crescimento e a produção de saxitoxinas por *C. raciborskii* são afetados pela composição iônica das águas de diferentes ecossistemas brasileiros.

Hipótese quarta: O padrão de síntese de proteínas de *C. raciborskii* é modificado pela presença de alguns íons comuns nas águas brasileiras.

2.2 – Objetivos

Diante do exposto, o objetivo geral desta tese é estudar os efeitos de algumas variáveis ambientais comuns aos ecossistemas brasileiros com ocorrência de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre a ecofisiologia, dessa espécie.

Objetivos específicos:

- 1) Estudar as respostas fisiológicas de uma linhagem tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii* a diferentes intensidades luminosas, investigando alterações associadas ao crescimento e à produção de saxitoxinas. (Capítulo primeiro)
- 2) Estudar as respostas fisiológicas de uma linhagem tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii* a luz azul e luz vermelha, investigando alterações associadas à produção de saxitoxinas. (Capítulo primeiro)
- 3) Estudar as respostas fisiológicas de uma linhagem tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii* ao aumento da condutividade da água, proporcionada por diferentes sais, investigando alterações associadas ao crescimento e à produção de saxitoxinas. (Capítulo segundo)
- 4) A partir da constatação da inibição do crescimento e produção de saxitoxina em resposta ao cálcio, estudar alterações no padrão total de proteínas diferencialmente expressas em uma linhagem de *Cylindrospermopsis raciborskii* (mapa proteômico) (Capítulo terceiro).

3 - MATERIAL E MÉTODOS COMUNS A TODOS OS CAPÍTULOS

3.1 - Manutenção da linhagem

Neste estudo foi utilizada a linhagem toxigênica de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. Essa linhagem foi isolada do reservatório de Billings (São Paulo) e descrita como produtora de saxitoxinas (Lagos *et al.*, 1999). A linhagem vem sendo mantida na coleção de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ). Esta linhagem já foi caracterizada como produtora de STX, NSTX, dc-STX e dc-NSTX. Devido à falta de padrões adequados, confirmamos no laboratório somente a produção de STX e NSTX, que foram avaliadas durante todo o trabalho. Foi utilizado o meio de cultivo ASM-1, descrito por Gorham *et al.* (1964), para manutenção e para os experimentos com a linhagem acima citada. A linhagem foi mantida em balões de fundo chato de 125 mL, em meio ASM-1 esterilizado, pH inicial 8,0, sem aeração, temperatura de 24 + 2° C, sob intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, medida a partir de sensor quântico (QSL-100, Box – Biospherical Instruments Inc.) e fotoperíodo de 12 h. As condições de esterilização, o pH do meio ASM-1 e temperatura já citados foram mantidos em todos os ensaios. As intensidades luminosas foram sempre medidas com o sensor quântico imerso até o fundo de frascos com meio ASM-1 ou meio ASM-1 acrescido de diferentes sais, com volumes idênticos aos utilizados nos diferentes ensaios.

3.2- Determinação do crescimento celular

O crescimento celular em todos os experimentos foi acompanhado através da contagem de células, a cada três dias, com o auxílio de microscópio óptico, em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, estimando-se o número de células/mL.

Inicialmente, aleatoriamente, foram mensurados os comprimentos de trinta células, em cada tempo amostral, para cada condição testada. Posteriormente, os comprimentos dos tricomas foram também mensurados, porém usando regras para contagem de células em hemocitômetro.

A soma total dos comprimentos de tricomas mensurados foi dividida pelo comprimento médio de uma célula, constituindo o número de células contadas. Partindo do número de células de culturas amostradas a cada três dias, foram estabelecidas as curvas de crescimento. A taxa de crescimento, $\mu \cdot \text{dia}^{-1}$ ou tempo médio de geração G (divisões. dia^{-1}) foram calculadas segundo Fogg & Thake (1987).

3.3 - Extração e análise de saxitoxinas

As culturas amostradas durante os experimentos eram filtradas em filtros de borossilicato (fibra de vidro, 45 mm de diâmetro - Millipore). O líquido filtrado foi analisado como fração extracelular e as células retidas no filtro como fração intracelular para determinação da produção de saxitoxinas. Os filtros foram guardados a -20° C até que fossem utilizados para extração das toxinas. O material da fração extracelular foi congelado e liofilizado. A extração de saxitoxinas foi feita no máximo 24h antes das análises das toxinas por HPLC (*“High Performance Liquid Chromatography”* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

Para extração, foram adicionados 5 mL de ácido acético 500 mM sobre os filtros ou sobre o material liofilizado. Essas amostras ficaram sob agitação magnética

por 2h, em agitador de bancada. Posteriormente, foram centrifugadas durante 30min a 10000 g. Os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados em filtros de nylon (0,45 µm – 13 mm diâmetro - Millipore). Cada amostra foi analisada para quantificação de STX e NSTX de acordo com a metodologia de Oshima (1995). As toxinas foram identificadas e quantificadas pela comparação com tempo de retenção e área integrada geradas por padrões. Os padrões foram adquiridos do “Institute of Marine Bioscience, National Research Council of Canada” (Halifax, Canadá).

Tabela 3.1 - Sistema HPLC utilizado (Shimadzu)

COMPONENTES	DESCRIÇÃO
Detector	Fluorescência - RF-10Axl
Controlador	SCL-10AVp
Bombas	1 - LC-10AT VP – fase móvel
	2 - LC-10AT VP – reagente oxidante
	3 - LC-10AT VP – reagente acidificante
Loop	20 µL
Coluna	Lichrospher 100 – RP (fase reversa) -18 (125X4 mm), 5 µm
Forno	CTO-10ATvp – 80°C
Aplicativo	LZ Workstation Class-vp

Tabela 3.2 - Condições cromatográficas utilizadas (Oshima, 1995)

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Fluxo	Bomba 1 – 0,8 mL/min.
	Bomba 2 – 0,4 mL/min.
	Bomba 3 – 0,4 mL/min.
Volume injetado	20 L
Deteção	Excitação em 330 nm – Emissão em 390 nm
Fase móvel	Condição isocrática; Heptasulfonato de sódio 2 mM em tampão de fosfato de amônio 30 mM e acetonitrila, pH 7,1.
Reagente oxidante	Ácido periódico 7 mM em tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 9,0
Reagente acidificante	Ácido acético 500 mM
Tempo	20 min.

3.4 - Análises estatísticas dos dados

Os resultados do crescimento celular e produção de toxinas foram expressos como médias \pm erro padrão (EP), em figuras. Quando mostrados em tabelas, os valores foram expressos como médias \pm desvio padrão (DP).

Para testar a normalidade de distribuição dos dados, as diferenças entre os desvios-padrão foram testadas usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Barlett, respectivamente. Quando os dados foram classificados como não normalizados, foi realizada a análise de variância (ANOVA) pelo teste Kruskal-Wallis (KW) para múltiplas comparações.

Para comparar cada dois tratamentos entre si (controle x tratamento), foram utilizados os testes de Dunn ou teste-*U* de Mann-Whitney. Todos os testes foram realizados com a utilização do aplicativo GraphPad-Instat, 3.0. No caso de comparações entre os dados das análises moleculares, os testes estatísticos foram realizados por programas específicos que serão citados no capítulo terceiro.

4 - RESUMOS DE MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO DO ARTIGO JÁ PUBLICADO E DOS MANUSCRITOS SUBMETIDOS

4.1 - CAPÍTULO PRIMEIRO – EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA E DA QUALIDADE DA LUZ SOBRE O CRESCIMENTO E O RITMO CIRCADIANO DE PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS POR *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria).

“Carneiro, RL, Santos, MEV, Pacheco, ABF, Azevedo, SMFO. Effects of Light Intensity and Light Quality on Growth and Circadian Rhythm of Saxitoxins Production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* 31(5), 481-488, 2009.”

Objetivo: Estudar as respostas fisiológicas de uma linhagem de *Cylindrospermopsis raciborskii* a diferentes intensidades luminosas e a luz azul ou vermelha, investigando alterações associadas à produção de saxitoxinas.

4.1.1 - Resumo de material e métodos

4.1.1.1 - Efeito da intensidade luminosa sobre crescimento e produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*

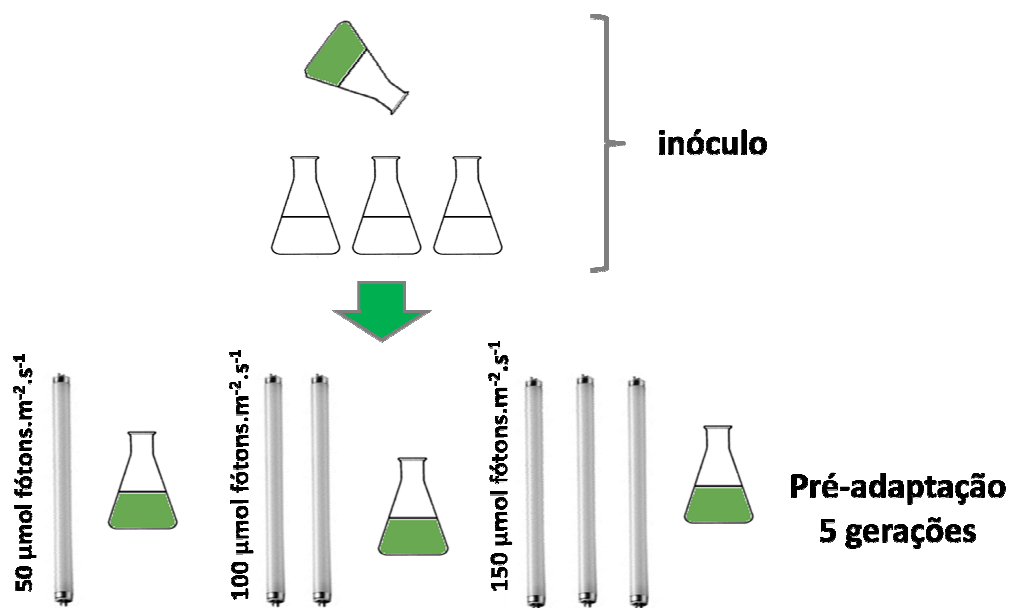
Células de *C. raciborskii* T3 foram inoculadas em meio de cultura e expostas às intensidades luminosas de 50, 100 ou 150 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1.1A). As culturas permaneceram sob essas intensidades durante cinco gerações, visando a pré-adaptação das células e serviram de inóculo para o experimento.

Em balões de fundo chato de três litros, contendo 2,5 litros de meio de cultura, foram inoculadas $5,0 \times 10^6$ células/mL provenientes de cada uma das diferentes intensidades luminosas, em triplicatas (Fig. 4.1.1B). As culturas foram

novamente expostas às intensidades luminosas de 50, 100 ou 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e cresceram sob essas condi\u00e7\u00f5es por doze dias (correspondente ao in\u00edcio da fase estacion\u00e1ria de crescimento), sob temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoper\u00edodo de 12h. Foram feitas amostragens a cada tr\u00eas dias, durante quinze dias para determina\u00e7\u00e3o do crescimento celular (item 3.2). Ap\u00f3s doze dias, 100 mL de cada cultura foram coletados a cada 2 ou 4h, durante 36h. As amostras foram posteriormente submetidas aos procedimentos de extra\u00e7\u00e3o das saxitoxinas (STX e NSTX) e analisadas por HPLC como descrito no item 3.3.

Com o objetivo de comparar a concentra\u00e7\u00e3o de saxitoxinas em diferentes fases de crescimento, 500 mL de culturas de *C. raciborskii* (linhagem T3) mantidas a 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (condi\u00e7\u00e3o controle) foram coletados para determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de saxitoxinas por c\u00e9lulas em fase exponencial de crescimento. Dessas amostras foram extra\u00eddas saxitoxinas, analisadas por HPLC como descrito no item 3.3.

A.



B.

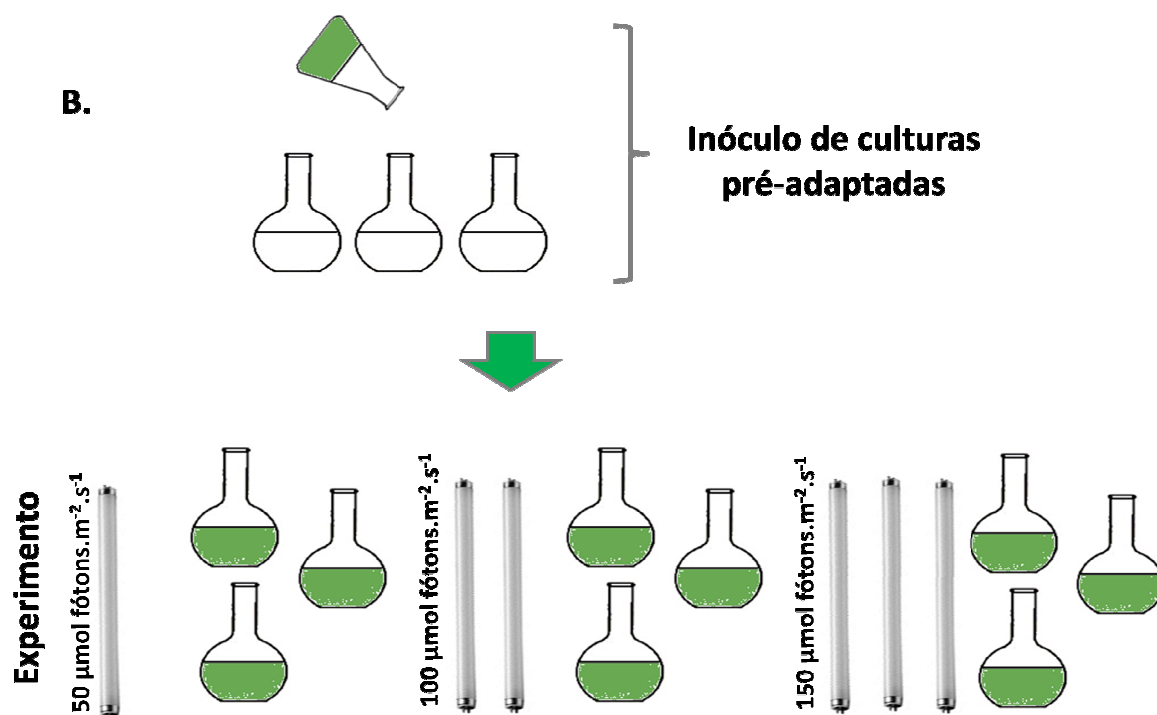


Figura 4.1.1 – Esquema dos experimentos para avaliação do efeito da intensidade luminosa sobre crescimento e produção de saxitoxinas por *C. raciborskii* T3. A. Fase de pré-adaptação às diferentes intensidades luminosas; B. Fase experimental, culturas mantidas nas diferentes intensidades luminosas por 12 dias, sob temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. O crescimento foi avaliado ao longo dos 12 dias e após esse período amostras foram coletadas a cada 2 ou 4h, durante 36h, para análise de saxitoxinas (STX e NSTX).

4.1.1.2 - Efeito da qualidade da luz sobre produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*

Uma cultura de *C. raciborskii* (linhagem T3) mantida a $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi utilizada como in\u00f3culo para testar o efeito da luz azul e da luz vermelha sobre a produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas (Fig. 4.1.2A). Para tanto, em triplicatas, $5,0 \times 10^6$ c\u00e9lulas/mL foram inoculadas em mariotes de 13,5 L, contendo doze litros de meio de cultura (Fig. 4.1.2B). As culturas foram mantidas sob essa condi\u00e7\u00e3o por 12 dias e ent\u00e3o cada uma das tr\u00e9plicas foi subdivida em tr\u00eas. Um conjunto de tr\u00eas culturas foi exposto \u00e0 luz branca (controle), outro \u00e0 luz vermelha e outro \u00e0 luz azul (Fig.4.1.2C). De cada condi\u00e7\u00e3o, 100 mL de culturas foram coletados a cada 2 ou 4h, contadas a partir da transi\u00e7\u00e3o para cada condi\u00e7\u00e3o de luz, durante 36h. As amostras foram submetidas aos procedimentos para extra\u00e7\u00e3o e an\u00e1lise de saxitoxinas com descrito no item 3.3.

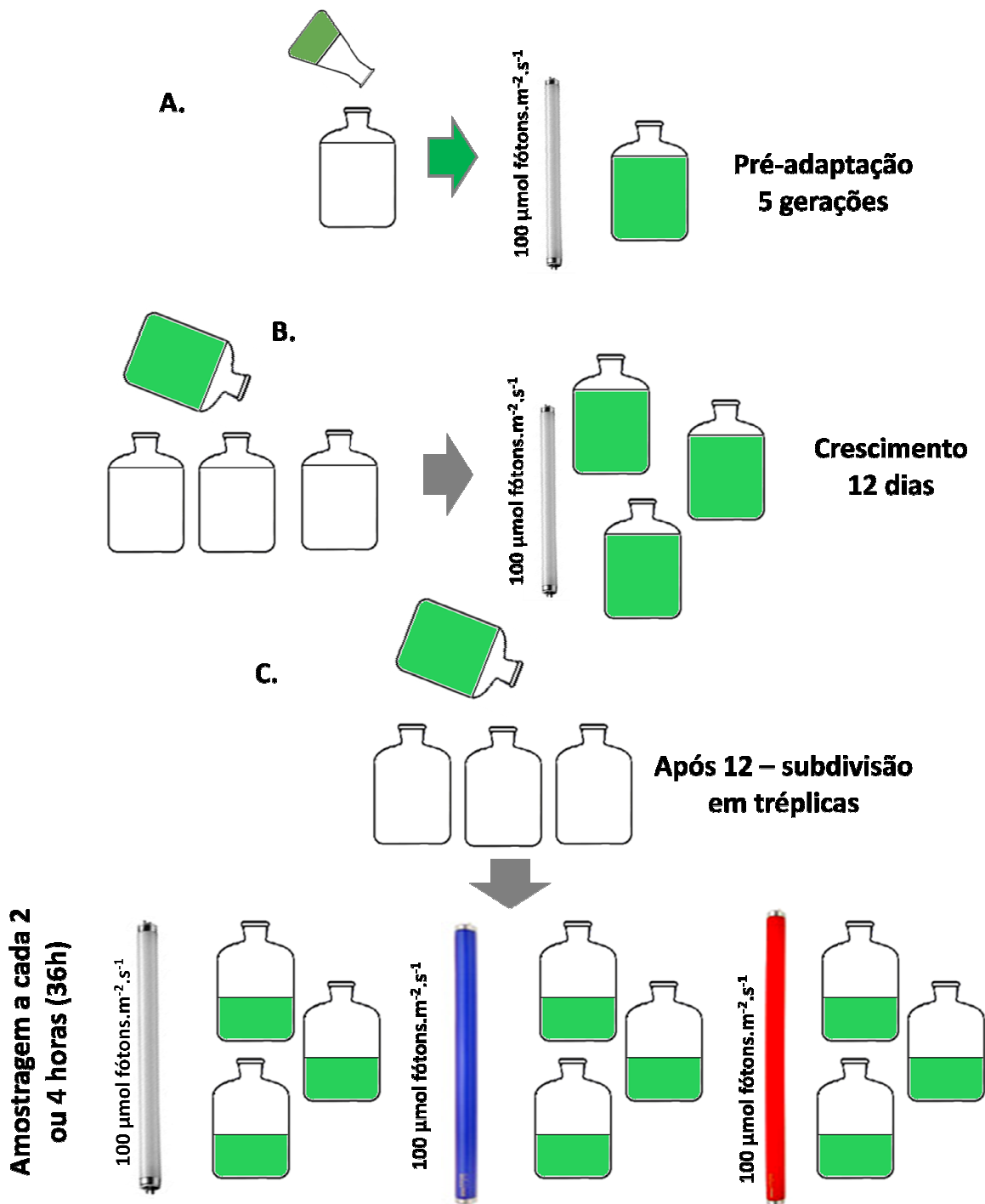


Figura 4.1.2 – Esquema dos experimentos sobre o efeito da luz azul ou vermelha sobre a produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas por *C. raciborskii* T3. A. Fase de pr\u00e9-adiapta\u00e7\u00e3o \u00e0 intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; B. Fase de crescimento celular por 12 dias; C. Fase experimental, culturas mantidas nas diferentes qualidades luminosas, ap\u00f3s 12 dias. Amostras foram coletadas a cada 2 ou 4h, durante 36h, para an\u00e1lise do n\u00famero de c\u00e9lulas por mL e determina\u00e7\u00e3o de saxitoxinas (STX e NSTX).

4.1.2 - Resumo dos resultados e discussão

O crescimento exponencial de *C. raciborskii* T3 durou em torno de nove dias, em todas as condições testadas (Fig. 4.1.3). O crescimento celular, mensurado como taxa de crescimento ($\mu\text{.dia}^{-1}$) foi proporcionalmente maior para as células sob as maiores intensidades luminosas (100 e 150 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$), quando comparadas com as células mantidas sob a condição controle (50 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$). Comparações entre as taxas de crescimento das células sob as duas maiores intensidades luminosas não evidenciaram diferenças significativas (tabela 4.1.1). Os maiores valores de taxa de crescimento de *C. raciborskii* T3 observados (0,3 $\mu\text{.dia}^{-1}$) foram menores que os citados na literatura para a espécie. Briand *et al.* (2004) reportaram, para 10 linhagens (entre tóxicas e não-tóxicas de diferentes origens), taxas de 0,4 a 0,8 $\mu\text{.dia}^{-1}$, em culturas crescidas até 125 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$.

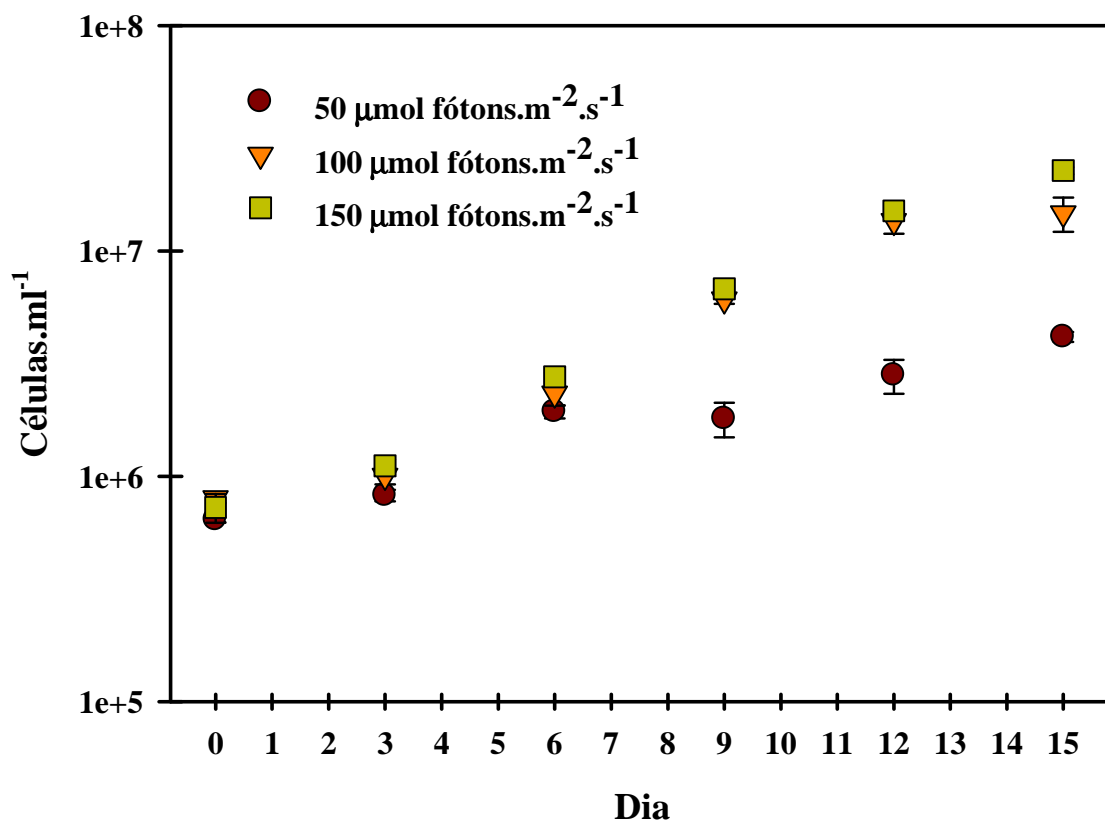


Figura 4.1.3 - Curvas de crescimento das células de *C. raciborskii* T3 expostas a três diferentes intensidades luminosas. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).

Tabela 4.1.1 - Taxas de crescimento de células de *C. raciborskii* T3 expostas a três diferentes intensidades luminosas.

Tratamento	$\mu.\text{dia}^{-1}$	divisão. dia^{-1}
50 ^a	0.126 ± 0.04	0.182 ± 0.06
100 ^a	0.301 ± 0.02	0.424 ± 0.10
150 ^a	0.301 ± 0.01	0.409 ± 0.01

μ é o crescimento relativo/dia e G é divisão/dia.

Os valores são apresentados como médias \pm desvio padrão (n=3).

^a Intensidade luminosa em $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Não foi possível detectar STX ou NSTX nas amostras da fração extracelular proveniente das condições testadas. Os valores ficaram abaixo do limite de detecção do método (STX, 0,3 ng e NSTX, 0,04 ng).

As concentrações intracelulares de STX e NSTX foram normalizadas por 10^6 células. Sob a intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (condição controle), a produ\u00e7\u00e3o de ambas as toxinas foi maior na fase estacion\u00e1ria do que na fase exponencial de crescimento (Fig. 4.1.4).

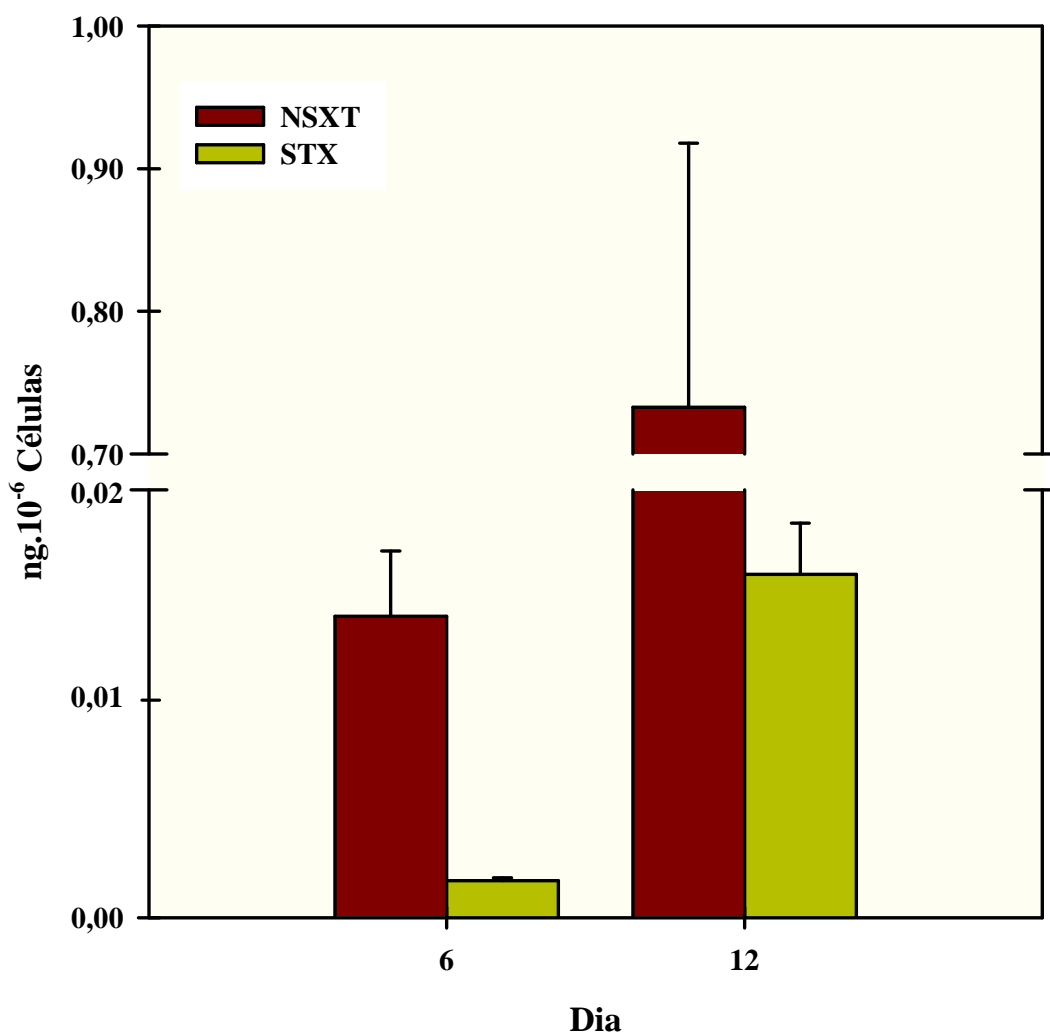


Figura 4.1.4 - Varia\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de STX e NSTX em c\u00e9lulas de *C. raciborskii* T3 entre as diferentes fases de crescimento. Dia 6, fase exponencial; dia 12, fase estacion\u00e1ria. As barras de erro indicam o erro padr\u00e3o das m\u00e9dias (n=3).

A produção de saxitoxinas tem sido mais bem estudada em dinoflagelados do que em cianobactérias. Nesse grupo, também há uma variação na concentração de saxitoxinas entre as fases de crescimento em cultura, como observado para *C. raciborskii* T3. Ora a maior concentração é observada na fase exponencial, ora na fase estacionária do crescimento de diferentes espécies (Boyer *et al.*, 1987; Boczar *et al.*, 1988; Parkhill e Cembella, 1999; Etheridge e Roesler, 2005; Taroncher-Oldenburg e Anderson, 2005; Lim *et al.*, 2006). Por outro lado, quando observamos dados da literatura sobre a produção dessas toxinas em espécies de cianobactérias, como *Anabaena circinalis* e *Aphanizomenon sp.*, a concentração de saxitoxinas parece ser mais pronunciada na fase exponencial do crescimento do que na estacionária (Negri *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, quando analisadas durante 36h, na fase estacionária, as culturas de *C. raciborskii* T3 apresentaram uma variação nas concentrações de STX e NSTX durante um dia, com maior concentração por volta do meio do dia (período luminoso; de 0 às 6h e de 24 às 30h) e decréscimo até o meio da noite (período escuro; de 12 às 18h), denotando a existência de um ritmo circadiano de produção de saxitoxinas por essa linhagem de *C. raciborskii* (Figs 4.1.5 e 4.1.6). O mesmo fenômeno foi observado em células mantidas a 50, 100 ou 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, embora neste último caso o padrão de variação tenha sido menos pronunciado (Figs 4.1.5 e 4.1.6).

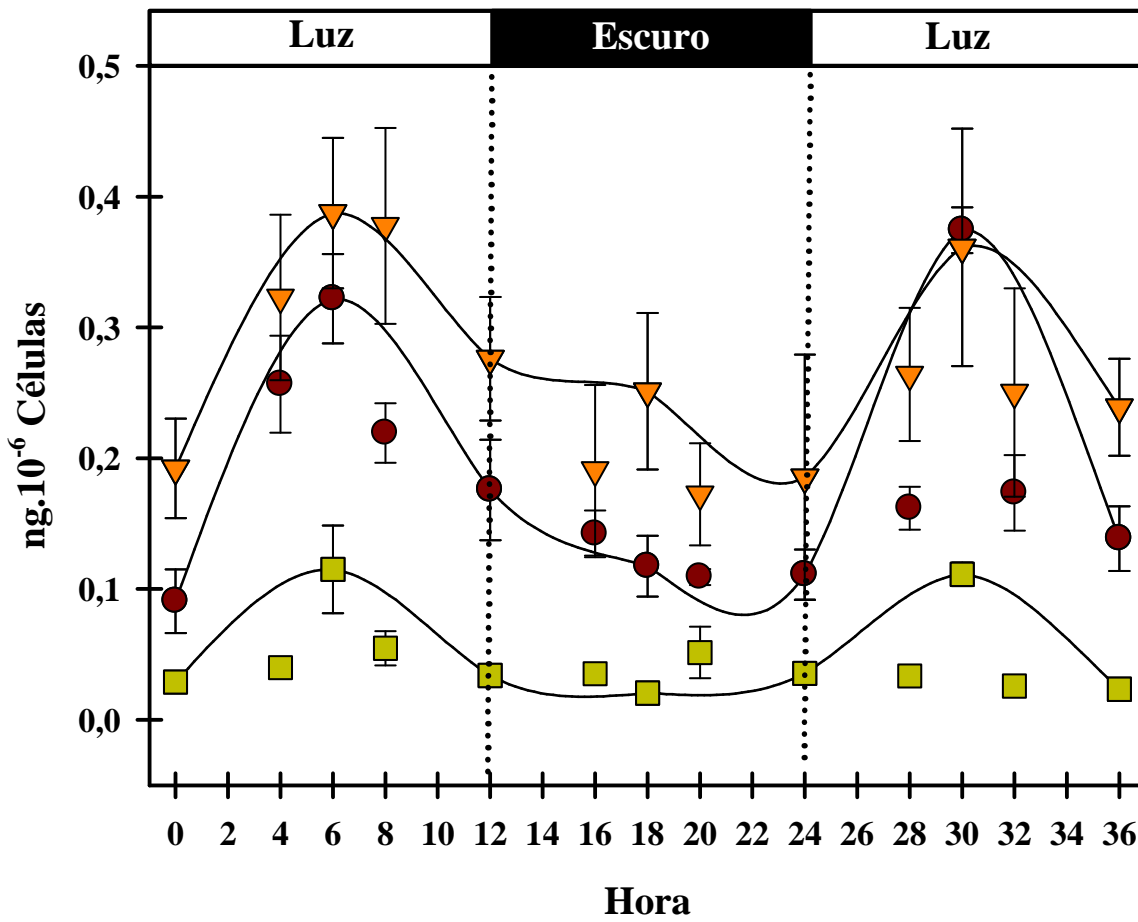


Figura 4.1.5 - Variação das concentrações de STX durante 36h, em células de *C. raciborskii* T3 submetidas a três intensidades luminosas. ● 50, ▼ 100 e ■ 150 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As barras de erro indicam o erro padrão das médias ($n=3$).

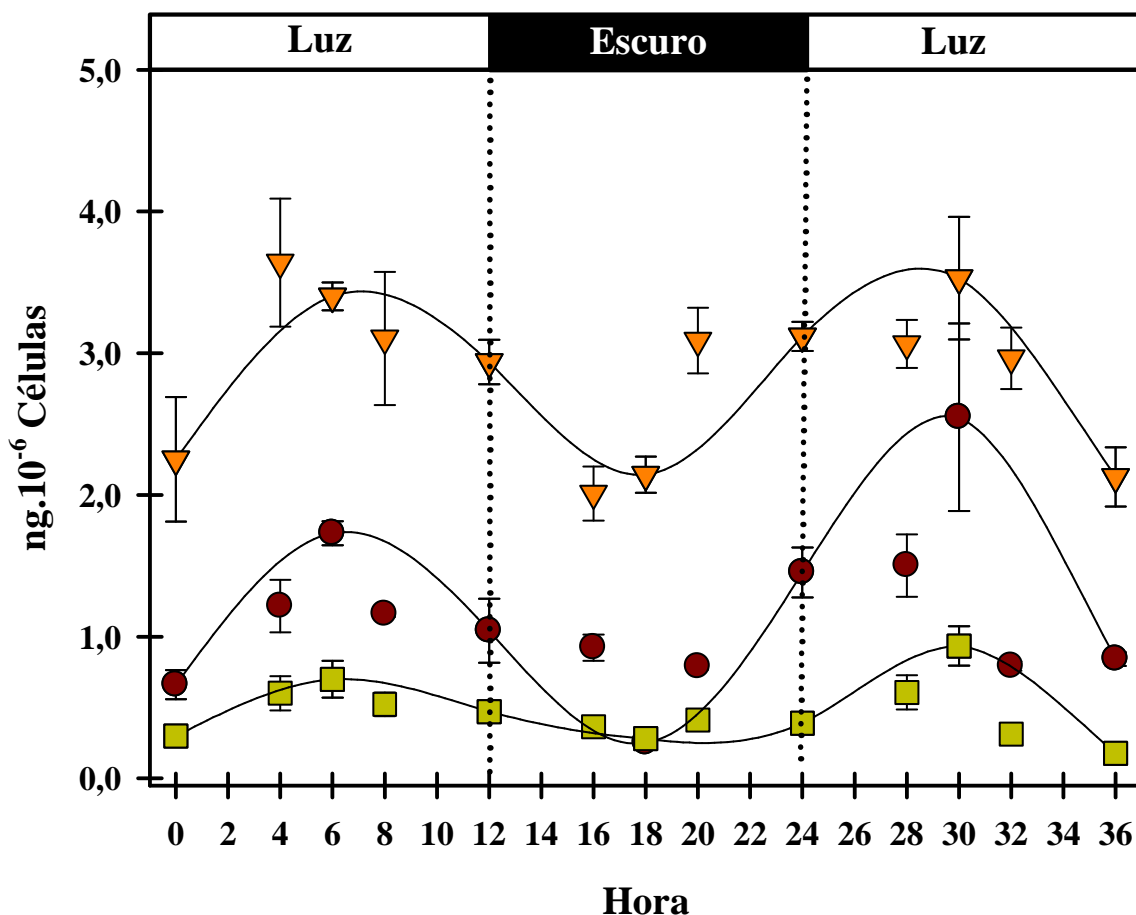


Figura 4.1.6 - Variação das concentrações de NSTX em células de *C. raciborskii* T3 submetidas a três intensidades luminosas. ● 50, ▼ 100 e ■ 150 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).

Os valores máximos de saxitoxinas quantificados durante as 36h de análise encontram-se na tabela 4.1.2 e as razões entre os valores mais altos (período de luz) e menores (período de escuro) encontram-se na tabela 4.1.3. As intensidades luminosas de 50 e 100 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ estimularam produção de ambas as toxinas, em comparação com a condição de 150 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As variações mais pronunciadas entre os valores máximos e mínimos das concentrações de STX e NSTX, correspondendo a períodos de luz e escuro, respectivamente, foram observadas também nas intensidades luminosas de 50 e 100 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em comparação com a condição de 150 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Isso equivale a dizer que o

ritmo circadiano de produção de saxitoxinas é favorecido em cultura nas menores intensidades luminosas testadas.

Tabela 4.1.2 - Concentrações máximas de NSTX e STX em células de *C. raciborskii* em fase estacionária do crescimento submetidas a três intensidades luminosas e três qualidades de luz. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Tratamento	Neosaxitoxina ^b	Saxitoxina ^b
50 ^a	2,54 \pm 0,66	0.37 \pm 0.01
100 ^a	3.52 \pm 0.43	0.38 \pm 0.05
150 ^a	0.69 \pm 0.12	0.11 \pm 0.01
Branco	4.31 \pm 0.15	0.35 \pm 0.03
Azul	4.58 \pm 0.57	0.46 \pm 0.14
Vermelho	4.56 \pm 0,29	0.48 \pm 0.13

^a Intensidade luminosa em $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

^b os valores est\u00e3o apresentados em $\text{ng}.10^{-6}$ c\u00e9lulas.

Tabela 4.1.3 - Razão entre as maiores e menores concentrações de NSTX e STX em células de *C. raciborskii* quantificadas durante as fases luminosa e escura, em culturas submetidas a três intensidades luminosas. O valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Variação	Neosaxitoxina			Saxitoxina		
	50	100	150	50	100	150
Entre 6 e 0h	2,78 \pm 0,98	1,65 \pm 0,66	2,43 \pm 1,02	4,47 \pm 3,08	2,05 \pm 0,22	4,29 \pm 1,75
Entre 6 e 18h	7,13 \pm 1,54	0,85 \pm 0,11	0,93 \pm 0,44	1,47 \pm 1,10	1,17 \pm 0,02	1,35 \pm 0,15
Entre 30 e 18h	10,02 \pm 2,82	1,64 \pm 0,29	3,32 \pm 0,65	1,42 \pm 1,55	0,71 \pm 1,56	0,40 \pm 0,17
Entre 30 e 36h	3,08 \pm 1,57	1,65 \pm 0,08	5,49 \pm 2,24	1,40 \pm 1,20	0,49 \pm 0,14	0,67 \pm 0,07

^aAs razões foram determinadas dividindo-se a concentração maior, na fase de luz pela menor, na fase escura.

^bIntensidade luminosa em $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Parkhill e Cembella (1999) e Etheridge e Roesler (2005) relataram para dinoflagelados uma maior toxicidade de células a $150 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e maior concentra\u00e7\u00e3o de saxitoxinas a $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Um estudo reportou uma rela\u00e7\u00e3o positiva entre a intensidade luminosa (m\u00ednima de 0,1 e m\u00e1xima de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas por *Lyngbya wollei* (Cyanobacteria) (Yin *et al.*, 1997). No presente estudo, o aumento observado na produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas por c\u00e9lulas mantidas a $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ concorda com as observa\u00e7\u00f5es desses \u00faltimos autores. Por outro lado, a intensidade luminosa de $150 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ causou uma redu\u00e7\u00e3o na produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas em *C. raciborskii* T3.

O efeito da intensidade luminosa sobre a s\u00edntese de STX foi avaliado “*in vitro*” por Kellman e Neilan (2007). A taxa de bioss\u00edntese da STX foi 12 vezes maior na presen\u00e7a de $10 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante uma hora de exposi\u00e7\u00e3o. Por\u00e9m, quando a rea\u00e7\u00e3o foi mantida no escuro, a bioss\u00edntese diminuiu at\u00e9 1,6 vezes, ap\u00f3s 5h. Os autores levantaram a hip\u00f3tese de que alguns est\u00e1gios da s\u00edntese de saxitoxinas podem ser regulados por enzimas, como a foto-frutoquinase e a sucrose-fosfato sintase, reguladas pela luz. Dessa forma, essas e outras enzimas do ciclo Calvin induzidas pela luz (Nelson e Cox, 2002), podem ter sido afetadas pela mais alta intensidade luminosa utilizada no nosso estudo. Assim, \u00e9 prov\u00e1vel que o funcionamento \u00f3timo dessas enzimas em *C. raciborskii* T3 ocorra em torno de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Um aumento na produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas durante algumas horas, ou mesmo um ritmo circadiano de produ\u00e7\u00e3o foi observado em dinoflagelados, assim como no caso de microcistinas em cianobact\u00e9rias, (Taroncher-Oldenburg e Anderson, 2005; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2004, respectivamente). Nossos resultados mostram pela primeira vez que a produ\u00e7\u00e3o de saxitoxinas em *C. raciborskii* T3 obedece a um ritmo

circadiano com um período exato de 24h (Figs 4.1.5 e 4.1.6) e portanto deve ser regulada por um relógio biológico.

O ritmo de produção de saxitoxinas por *C. raciborskii* T3 foi avaliado também em células submetidas à variação na qualidade espectral da luz durante 36h. Em comparação com o ritmo antes observado na luz branca (controle), o período da acrofase (máxima produção) de STX e NSTX aumentou para 26h quando essas células foram submetidas à luz azul (Figs. 4.1.7 e 4.1.8) e ocorreu uma perda do ritmo circadiano de produção de NSTX após 12h de exposição à luz vermelha (Fig. 4.1.8).

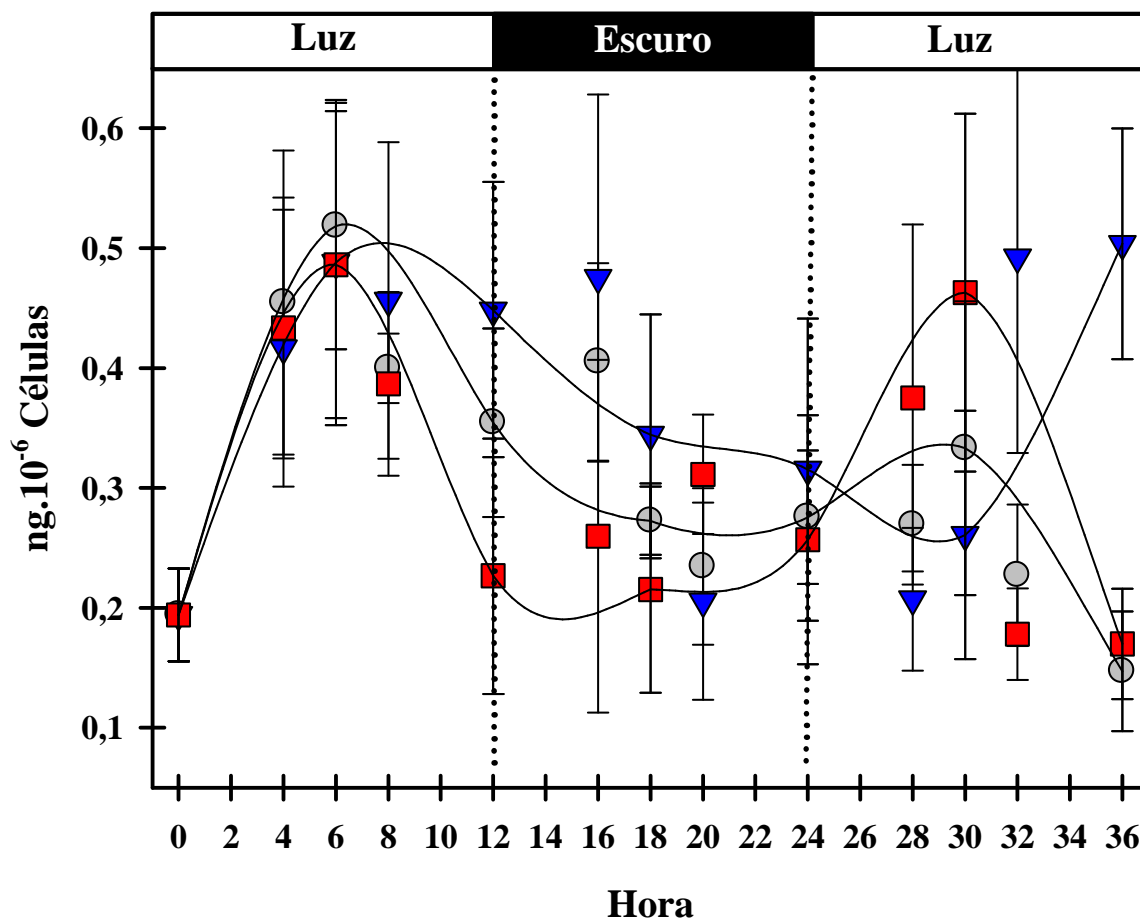


Figura 4.1.7 - Variação das concentrações de STX em células de *C. raciborskii* T3 submetidas durante 36h a três comprimentos de onda (fluxo de fótons de $100 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). ● branco, ▼ azul, ■ vermelho. As barras de erro indicam o erro padrão das médias ($n=3$).

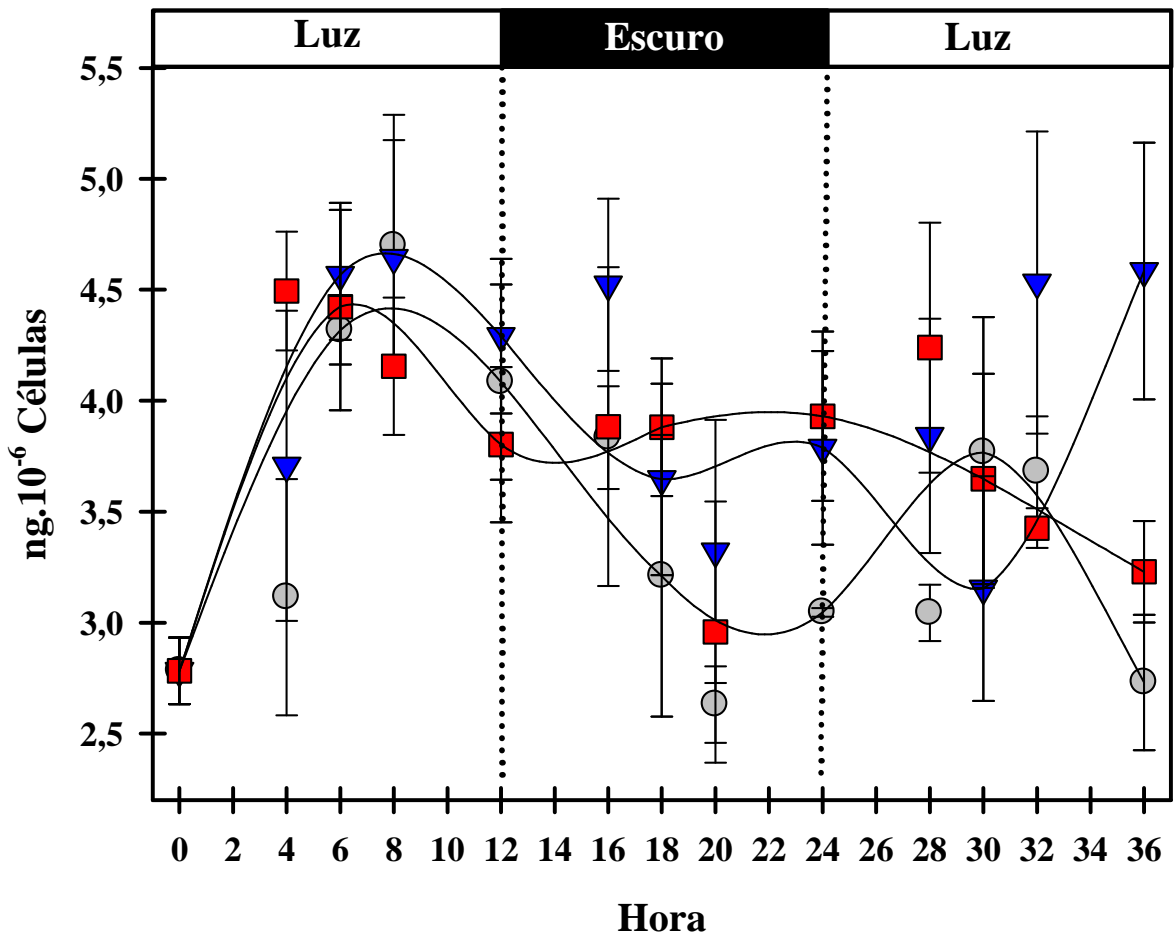


Figura 4.1.8 - Variação das concentrações de NSTX em células de *C. raciborskii* T3 submetidas durante 36h a três comprimentos de onda (fluxo de fótons de $100 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). ● branco, ▼ azul, ■ vermelho. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).

Dittmann *et al.* (2001) identificaram em *Microcystis aeruginosa* uma proteína (MrpA) e dois genes (*mrpA* e *B*) com expressão regulada pela qualidade espectral da luz. A transcrição do gene *mrpAB* era aumentada quando a cianobactéria foi exposta à luz azul. Em mutantes incapazes de produzir microcistina, não ocorreu esta resposta, indicando que a resposta do gene *mrpAB* à luz azul era dependente de microcistina, que seria um sinalizador para essa transcrição. Adicionalmente, os genes *mcyB* e *mcyD*, envolvidos na produção de microcistinas são estimulados quando *M. aeruginosa* é exposta a luz vermelha (Kaebernick *et al.*, 2000). Não são conhecidas as formas como a qualidade espectral pode afetar os genes de *C. raciborskii*. Entretanto, se alguns dos genes envolvidos na produção de saxitoxinas forem afetados pela qualidade da luz, uma possível interferência dos comprimentos de onda testados sobre a sua expressão pode ser esperada, explicando a perda de ritmo circadiano ou aumento do período de produção observado, neste estudo.

A existência de um ritmo circadiano na produção de saxitoxinas pode ter implicações ecológicas, uma vez que essas toxinas interferem na mobilidade de espécies do zooplâncton (Ferrão-Filho *et al.*, 2008). O fato da maior produção de saxitoxinas ocorrer no período de luz poderia conferir alguma vantagem para a cianobactéria. Se considerarmos que usualmente a maior densidade de células no ambiente se dá abaixo da superfície (tabela 2.1), profundidade que costuma apresentar maior número de organismos zooplânctônicos durante o período luminoso (Soares, 2009), essa vantagem se torna evidente. Portanto, diminuiria a pressão de predação sobre essa espécie durante o dia. Entretanto, a real função ecológica desse ritmo circadiano de síntese de saxitoxinas ainda precisa ser esclarecida.

4.2 - CAPÍTULO SEGUNDO – A DUREZA DA ÁGUA AFETA O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS POR *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria)

“Carneiro, RL, Pacheco, ABF, Azevedo, SMFO. The water hardness affects growth and saxitoxins production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Plankton Research*.”

Objetivo: Estudar as respostas fisiológicas de uma linhagem de *Cylindrospermopsis raciborskii* à condutividade (dureza da água), testando diferentes concentrações de íons monovalentes e bivalentes, para investigar alterações associadas ao crescimento e à produção de saxitoxinas.

4.2.1 - Resumo de material e métodos

A dureza da água pode ser traduzida como uma função da concentração de íons presentes. Essa característica pode ser medida como condutividade ou salinidade, assim como pelas concentrações de carbonato de cálcio (APHA, 1995). Para avaliar o efeito do íon carbonato (CO_3^{2-}) sobre o crescimento e produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*, os sais carbonato de cálcio (CaCO_3), carbonato de magnésio (MgCO_3) ou carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram adicionados ao meio de cultivo ASM-1. A adição foi feita de forma a obter a concentração de 5 mM do ânion no meio de cultura (Fig.4.2.1). Para avaliar o efeito da adição dos cátions adicionados na forma de carbonatos (Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) e o efeito do aumento da concentração desses sobre o crescimento e produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*, novos experimentos foram realizados. Os sais CaCl_2 , MgCl_2 ou NaCl

foram adicionados isoladamente ao meio ASM-1, para obtenção das concentrações de 5 mM ou 10 mM de cada cátion. O procedimento foi similar ao descrito na figura 4.2.1. O meio ASM-1 normalmente contém alguns desses íons e suas concentrações iniciais estão descritas na tabela 4.2.1. A escolha dos diferentes sais e das diferentes concentrações dos íons foi baseada na sua presença e concentrações comumente encontradas em ambientes onde florações da espécie *C. raciborskii* ocorrem com frequência.

Tabela 4.2.1 – Concentrações iniciais dos diferentes íons adicionados ao meio de cultivo ASM-1.

Íon	Concentração (µM)
Ca ²⁺	20,00
Mg ²⁺	40,00
Na ⁺	2,24
CO ₃ ⁻²	0,00

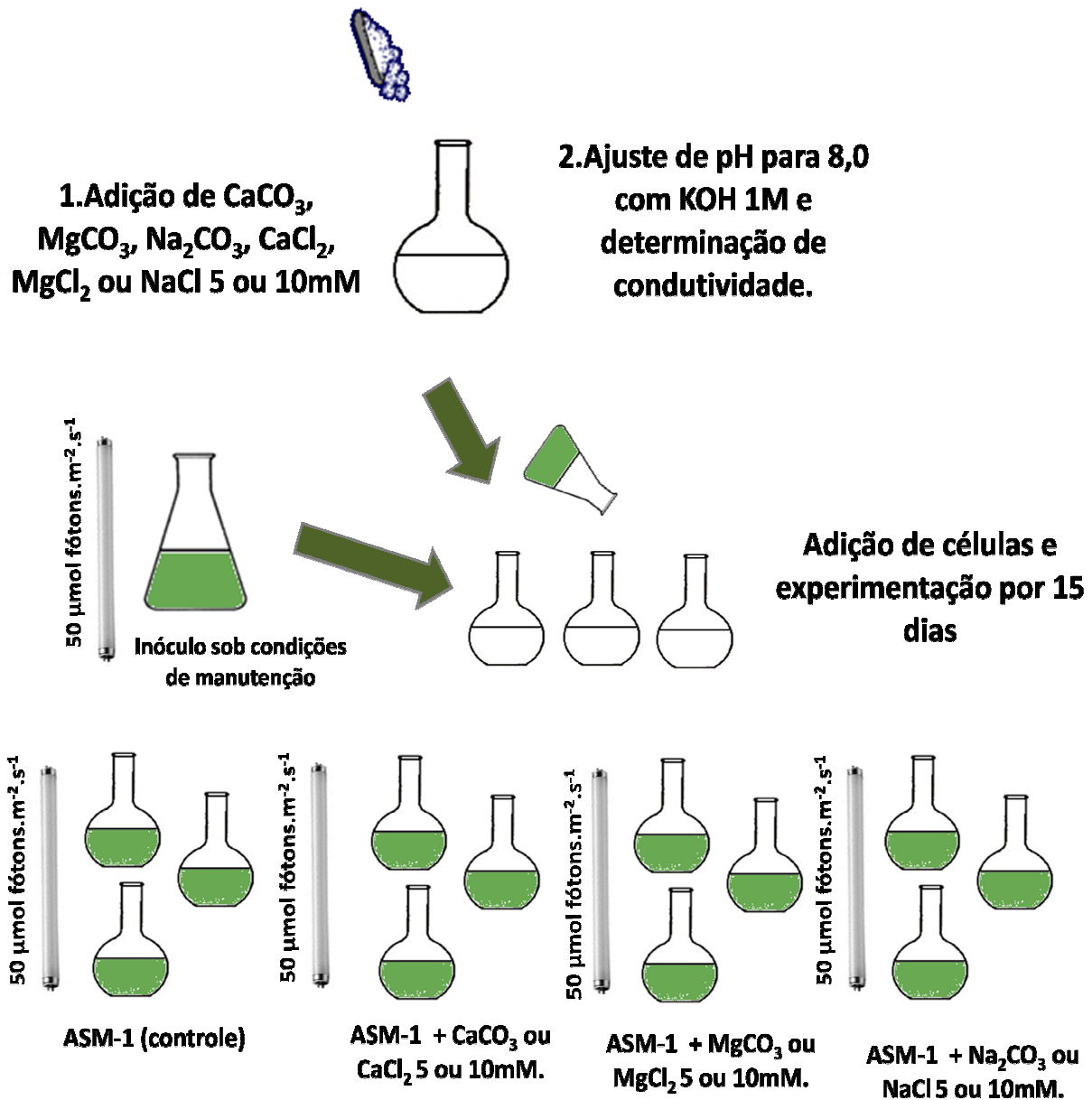


Figura 4.2.1 – Esquema dos experimentos sobre o efeito da condutividade (dureza da água) sobre o crescimento e produção de STXs por células de *C. raciborskii* T3.

Antes de iniciar os experimentos, em todos os meios de cultivo o pH foi ajustado para 8,0 com KOH 1M e a condutividade foi mensurada, com o auxílio de um condutivímetro (30/25FT - Yellow Springs). Os meios de cultivo foram então divididos em triplicatas (Fig. 4.2.1). Uma cultura de *C. raciborskii* T3 foi crescida nas condições de manutenção (descrita no item 3.1) e após suas células atingirem 12 dias de cultivo foi utilizada como inóculo. Os ensaios foram iniciados com $7,0 \times 10^5$ células/ml, inoculadas em balões de fundo chato de 3 litros, contendo 2,0 L de meio ASM-1 (condição controle) ou o meio ASM-1 adicionado dos diferentes sais (Fig. 4.2.1). As células foram cultivadas nas mesmas condições de manutenção e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (item 3.1). Essa intensidade foi medida em frascos de cultivo (bal\u00f5es) semelhantes aos utilizados no experimento, com sensor qu\u00e2ntico. Para que n\u00e3o houvesse varia\u00e7\u00e3o na intensidade luminosa, a mesma foi medida ap\u00f3s a confec\u00e7\u00e3o dos diferentes meios adicionados com os diferentes sais e antes do in\u00f3culo, com o sensor imerso at\u00e9 o fundo dos frascos. As culturas foram mantidas sob aera\u00e7\u00e3o constante, fornecida por uma bomba de ar comprimido filtrado. Essas culturas foram amostradas a cada tr\u00eas dias, durante quinze dias, para determina\u00e7\u00e3o do crescimento celular (conforme descrito no item 3.2). Nos sexto e d\u00e9cimo segundo dias de cada cultivo (que corresponderam \u00e0 fase exponencial e estacion\u00e1ria da condi\u00e7\u00e3o controle, respectivamente) 500 mL de cada cultura foram amostrados para procedimentos de extra\u00e7\u00e3o e an\u00e1lises de saxitoxinas (STX e NSTX), como descrito no item 3.3.

4.2.2 - Resumo dos resultados e discussão

A tabela 4.2.2 reúne os valores da condutividade mensurados após adição dos diferentes sais e ajuste do pH para 8,0, em cada meio de cultivo. Nesta tabela, também estão reunidos os valores das taxas de crescimento, calculadas a partir do número de células na fase exponencial de cada cultivo e a razão celular, a razão celular, que corresponde à divisão do número de células final (dia 15) pelo número de células inicial (dia 0). Além disso, esta mesma tabela mostra os valores das concentrações totais de STXs (SXT+NSTX) e a variação percentual desses valores entre o sexto e décimo segundo dia de cultivo.

As figuras 4.2.2 e 4.2.3 mostram a variação do número de células durante quinze dias de cultivo das células. As figuras 4.2.4 e 4.2.5 a variação da concentração do total de saxitoxinas por células de *C. raciborskii* T3 sob os diferentes tratamentos com sais.

Tabela 4.2.2 – Condutividade do meio de cultura, taxa de crescimento celular, razão celular, duração da fase exponencial do crescimento e concentração intracelular de STXs em células de *C. raciborskii* T3 expostas a diferentes tratamentos, com diferentes íons.

Tratamento	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Taxa de crescimento (μ) ^{a, b}	Razão celular ^{a, c}	Duração da fase exponencial de crescimento	Dia ^d	Total de saxitoxinas (STX + NSTX) ^a	Varição (%) de produção STXs entre as fases de crescimento ^e
Controle	568	0,224 ± 0,03	8,209 ± 0,36	9	6	1,036 ± 1,40	209,31
					12	3,206 ± 1,53	
CaCO ₃	656	0,117 ± 0,02 ^f	4,514 ± 0,47 ^f	6	6	0,077 ± 0,00 ^f	668,65
					12	0,596 ± 0,01 ^g	
MgCO ₃	1196	0,316 ± 0,00 ^f	31,777 ± 10,31 ^g	15	6	6,119 ± 1,69 ^g	- 42,53
					12	3,516 ± 0,56	
Na ₂ CO ₃	1401	0,254 ± 0,02	9,663 ± 1,50	12	6	12,517 ± 6,20 ^h	- 66,53
					12	4,188 ± 0,53	
CaCl ₂ (5 mM)	1436	0,550 ± 0,03 ^g	5,172 ± 2,32 ^f	6	6	3,598 ± 0,52 ^g	- 63,56
					12	1,311 ± 0,18 ^h	
MgCl ₂ (5 mM)	1484	0,361 ± 0,13 ^f	20,049 ± 3,61 ^g	9	6	4,369 ± 1,71 ^g	- 7,78
					12	4,029 ± 0,40	
NaCl (5 mM)	808	0,657 ± 0,08 ^g	17,638 ± 4,71 ^f	12	6	1,998 ± 0,14	162,90
					12	5,253 ± 2,08 ^f	
CaCl ₂ (10 mM)	2550	0,233 ± 0,22	1,585 ± 0,17 ^f	6	6	2,490 ± 0,84 ^f	31,23
					12	3,268 ± 0,30	
MgCl ₂ (10 mM)	2475	0,347 ± 0,19 ^f	12,223 ± 2,30 ^f	9	6	8,584 ± 3,30 ^h	60,36
					12	13,767 ± 4,48 ^h	
NaCl (10 mM)	1350	0,487 ± 0,014 ^g	10,292 ± 1,79 ^f	12	6	6,835 ± 2,59 ^h	8,22
					12	7,398 ± 2,40 ^g	

^aValores apresentados como médias ± desvio padrão (n=3). ^b μ é crescimento relativo.dia⁻¹. ^cRazão celular é a divisão do número de células final (dia 15) pelo número de células inicial (dia 0). ^dDia é correspondente a fase de crescimento do controle: dia 6 = fase exponencial; dia 12 = fase estacionária. ^eOs valores foram calculados entre as concentrações no 12º dia e 6º dia de cultivo, para cada condição experimental. ^{f, g, h}Diferenças estatísticas de cada tratamento em relação ao controle em relação ao controle: ^fTeste de Dunn, $P < 0,05$; ^gTeste de Dunn, $P < 0,01$; ^hTeste de Dunn, $P < 0,001$.

De maneira geral, foi observada uma relação positiva entre o aumento da condutividade do meio e o aumento das taxas de crescimento ($\mu\text{.dia}^{-1}$) das células, quando comparadas ao controle (tabela 4.2.2). Porém, na condição CaCO_3 a taxa de crescimento ficou reduzida (teste de Dunn, $P < 0,05$) e nas condições Na_2CO_3 e CaCl_2 10 mM, as taxas de crescimento celular não se diferenciaram em relação ao controle (teste de Dunn, $P > 0,05$; tabela 4.2.2).

O crescimento exponencial de *C. raciborskii* T3 durou até o nono dia de cultivo, na condição controle (tabela 4.2.2). As adições dos diferentes íons ocasionaram mudanças na duração da fase exponencial de crescimento das células. Essa fase durou somente até o sexto dia de cultivo nas condições de CaCO_3 , CaCl_2 5 mM e 10 mM (tabela 4.2.2). Portanto, pode-se afirmar que os tratamentos com CaCO_3 e CaCl_2 10 mM inibiram o crescimento celular de *C. raciborskii* T3. Esse fato pôde ser mais bem observado quando se analisou os valores de razão celular, que se mostraram diminuídos em relação ao controle nesses dois tratamentos com cálcio (teste Dunn, $P < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente; tabela 4.2.2).

Por outro lado a fase exponencial do crescimento celular foi mais longa na condição de MgCO_3 , não sendo detectado o início da fase estacionária até o décimo quinto de cultivo (Fig. 4.2.2). Todavia, essa fase não se diferenciou do controle nas condições de MgCl_2 (Figs. 4.2.2 e 4.2.3; tabela 4.2.2). A avaliação das razões celulares em ambas as condições com Mg^{2+} mostrou um estímulo ao crescimento celular na presença do íon se comparado ao controle (tabela 4.2.2).

Em todas as condições onde se testou o efeito do Na^+ , o crescimento exponencial das células durou doze dias. Portanto, esse tempo foi maior que o tempo de duração dessa fase na condição controle. Observando as razões celulares

foi possível também notar um estímulo ao crescimento celular, nesses tratamentos (tabela 4.2.2).

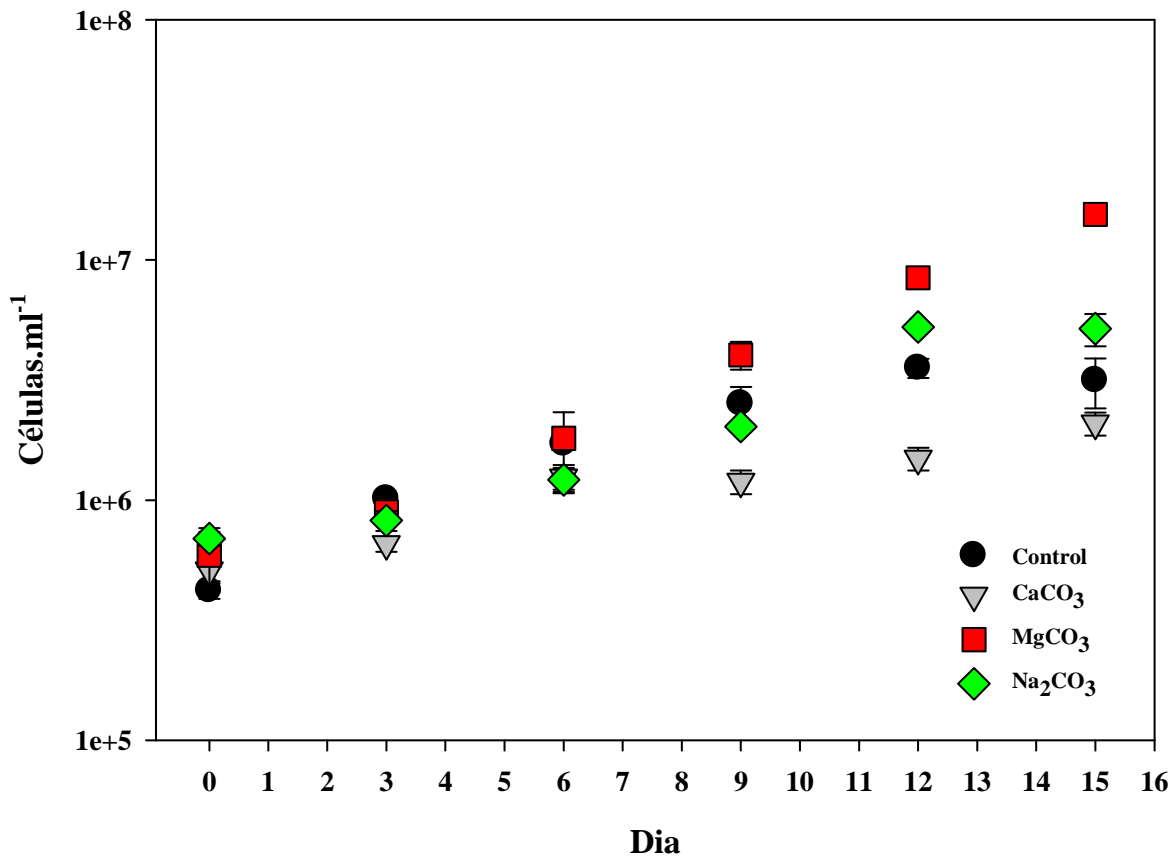


Figura 4.2.2 - Curvas de crescimento das células de *C. raciborskii* T3 cultivadas na presença de carbonato de cálcio, magnésio ou sódio (CO₃⁻² 5 mM). As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).

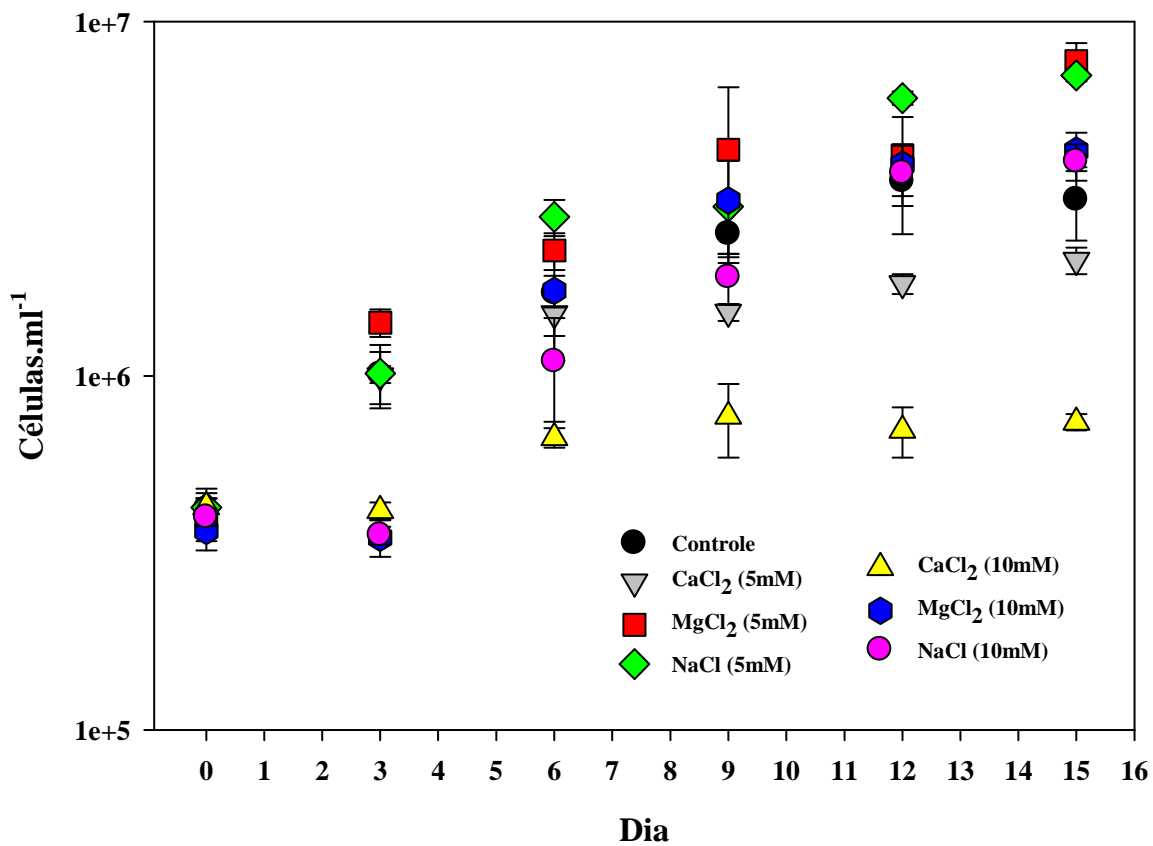


Figura 4.2.3 - Curvas de crescimento das células de *C. raciborskii* T3 cultivadas na presença de sais de cálcio, magnésio ou sódio, em concentrações de 5 ou 10 mM do cátion. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).

Os valores apresentados nas figuras 4.2.4 e 4.2.5 ou na tabela 4.2.2 correspondem às concentrações intracelulares, totais de STXs (STX + NSTX), normalizadas por 10^6 células. Não foi possível detectar STX ou NSTX nas amostras da fração extracelular, provenientes das diferentes condições testadas, pois os valores ficaram abaixo dos valores do limite de detecção do método, nas condições experimentais utilizadas (STX, 0,3 ng e NSTX, 0,04 ng).

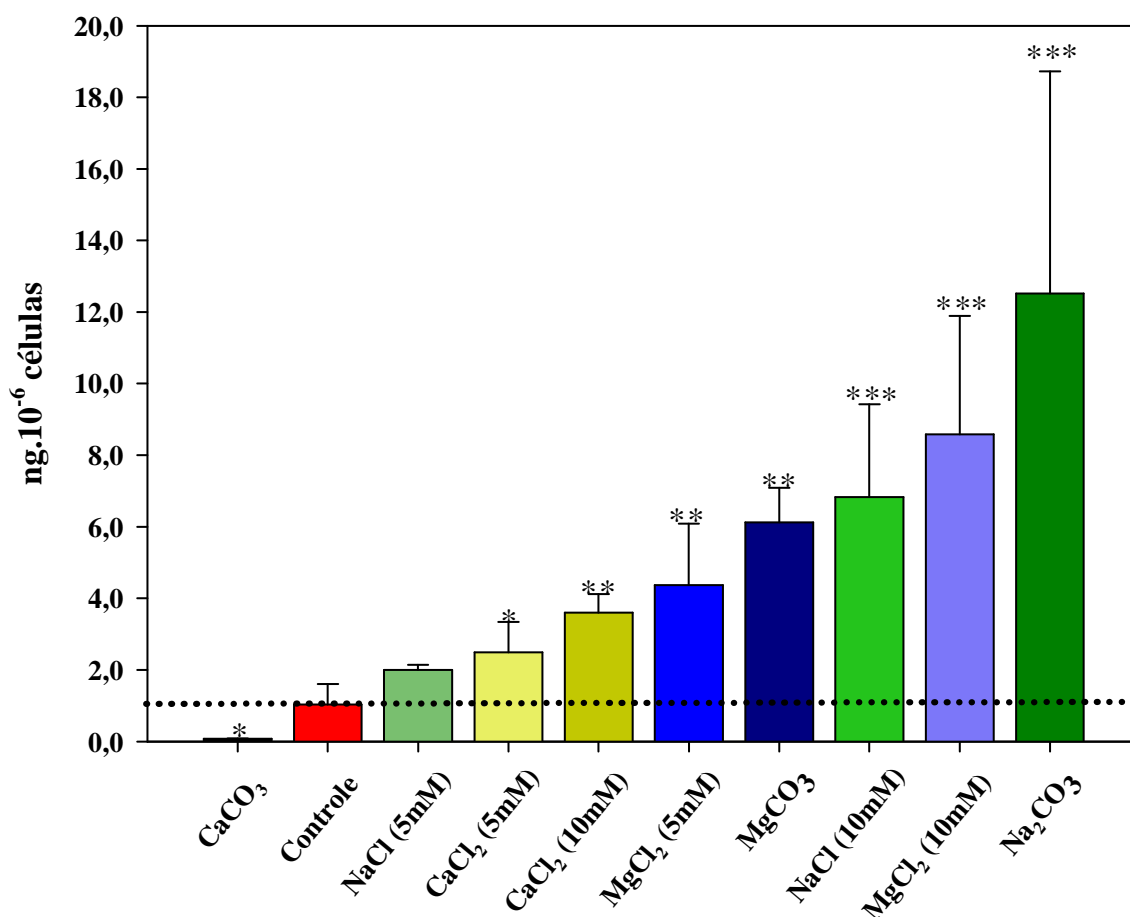


Figura 4.2.4 - Variação na concentração de STXs totais (STX + NSTX) no 6º dia do cultivo de células de *C. raciborskii* T3 cultivadas na presença de sais de cálcio, magnésio ou sódio. O 6º dia corresponde à fase exponencial do crescimento das células na condição controle. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3). A linha tracejada marca a concentração de STXs em células da condição controle. Diferenças estatísticas são representadas em relação ao controle: *teste de Dunn, P<0,05; **teste de Dunn, P<0,01; ***teste de Dunn, P<0,001.

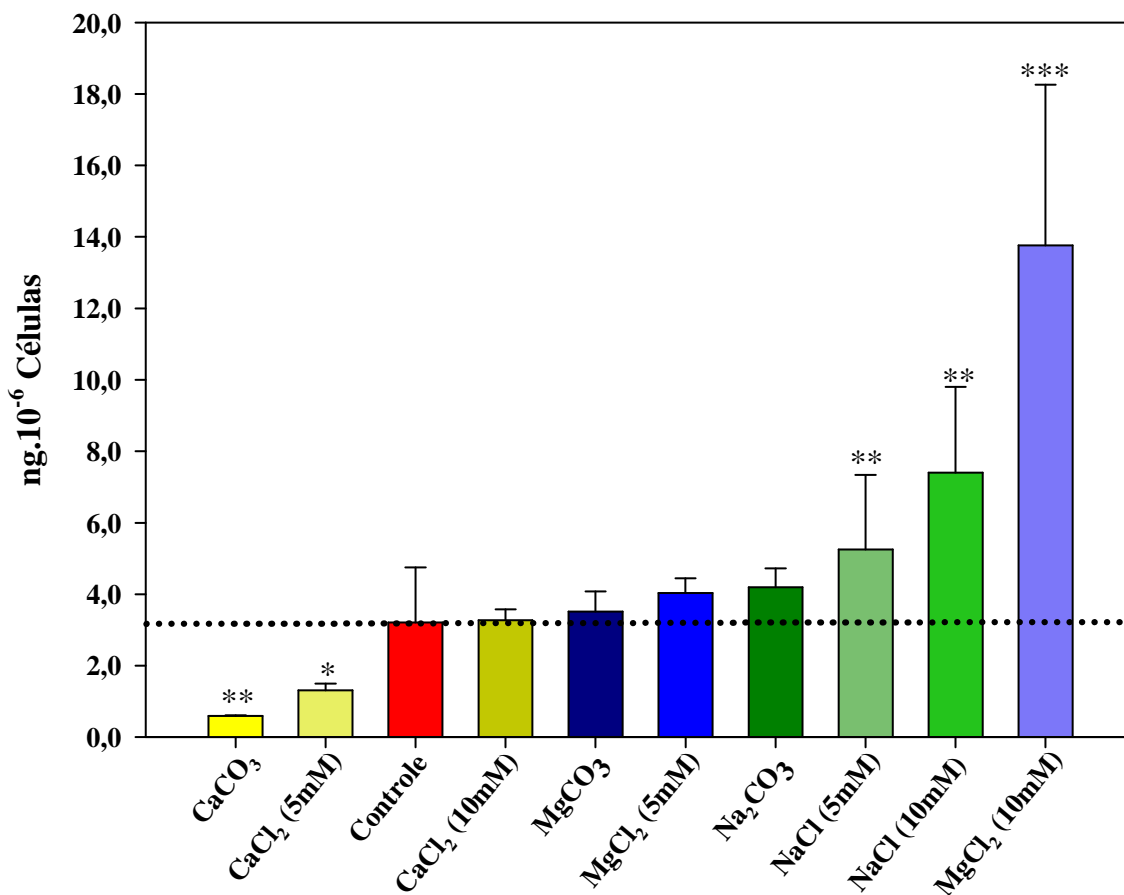


Figura 4.2.5 - Variação na concentração de STXs totais (STX + NSTX) no 12º dia do cultivo de células de *C. raciborskii* T3 cultivadas na presença de sais de cálcio, magnésio ou sódio. O 12º dia corresponde à fase estacionária do crescimento das células na condição controle. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3). A linha tracejada marca a concentração de STXs em células da condição controle. Diferenças estatísticas são representadas em relação ao controle: *teste de Dunn, P<0,05; **teste de Dunn, P<0,01; ***teste de Dunn, P<0,001.

No sexto dia de cultivo, o aumento da condutividade ocasionou o aumento da concentração de STXs por células, na maioria dos tratamentos (teste KW, $P < 0,01$). Duas exceções foram observadas: em células sob a condição de CaCO_3 ocorreu diminuição na concentração de STXs por células (teste de Dunn, $P < 0,05$) e na condição de NaCl 5mM a concentração de STXs não se diferenciou estatisticamente da concentração na condição controle (teste de Dunn, $P > 0,05$; Fig. 4.2.4; tabela 4.2.2).

Uma tendência ao aumento das concentrações de STXs por células foi também observada, na maioria dos tratamentos, se comparados ao controle, no décimo segundo dia de cultivo, mas não de forma tão acentuada como observada no sexto dia. Somente em três dos nove tratamentos (NaCl 5 ou 10 mM e MgCl_2 10 mM) esse aumento da concentração de STXs foi estatisticamente significativo (Fig. 4.2.5; tabela 4.2.2). Por outro lado, observou-se a redução das concentrações celulares de STXs nas condições de CaCO_3 e CaCl_2 5 mM, se comparadas com a concentração de STXs nas células sob a condição controle (teste de Dunn, $P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente; Fig. 4.2.6; tabela 4.2.2).

Tendo em vista as observações supracitadas, de maneira geral, pode-se afirmar que o aumento da condutividade, ocasionado pela adição de sais de magnésio ou de sódio no meio de cultura estimula a produção de saxitoxinas por células de *C. raciborskii* T3, enquanto que sais de cálcio a inibem.

Sob a condição controle as células apresentaram um aumento da produção de saxitoxinas, aumentando do sexto para o décimo segundo dia de cultivo (209,31%), demonstrando um aumento da produção de STXs na fase estacionária do crescimento, já citado na literatura para a linhagem estudada (Carneiro *et al.*, 2009). Os diferentes tratamentos testados ocasionaram a diminuição dessa

percentagem de produção (tabela 4.2.2). Em apenas cinco dos nove tratamentos testados, as células também apresentaram esse aumento. Porém, somente as células na condição CaCO_3 apresentaram maior produção de STXs no décimo segundo dia (cerca de três vezes), se comparada ao aumento observado na condição controle (tabela 4.2.2).

A cianobactéria *C. raciborskii* já foi citada em alguns estudos como uma espécie capaz de crescer em diferentes salinidades (Padisák, 1997; Briand *et al.*, 2002; Moisander *et al.*, 2002; Dufour *et al.*, 2006). Neste estudo, medimos a salinidade em valores de condutividade.

Moisander *et al.* (2002) encontraram crescimento máximo das células de *C. raciborskii* em condições de NaCl até 100 mM (valor 10 vezes maior do que o utilizado em nosso estudo) e levantaram a hipótese de que a salinidade poderia ser um fator controlador de florações da espécie, favorecendo o seu sucesso. No Brasil, relatos da ocorrência desta espécie têm corroborado essa afirmação. Florações de *C. raciborskii* ocorrem, com frequência, em ambientes com altas condutividades, em alguns mananciais, principalmente no nordeste (Souza *et al.*, 1998; Bouvy *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2006; Panosso *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009). Bouvy *et al.* (2000) relataram que 12,1% da biomassa de células fitoplanctônicas, em um reservatório do estado de Pernambuco com condutividade de $19630 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ era de *C. raciborskii*. Adicionalmente, dezenove dos 39 reservatórios estudados por estes últimos autores apresentaram condutividades maiores que $1000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e nesses *C. raciborskii* constituiu de 33,3 a 99,6 % da biomassa fitoplanctônica. Recentemente, Costa *et al.* (2009) também relataram a dominância (>80%) de *C. raciborskii* em um reservatório do Rio Grande do Norte, com condutividade também superior a $1000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Neste estudo, de maneira geral, o aumento da condutividade mostrou-se

diretamente relacionado com o aumento na taxa de crescimento das células. Isto foi constatado em seis das oito condições onde a condutividade foi efetivamente superior às da condição controle (tabela 4.2.2). Portanto, nossos resultados corroboram o fato de que altas condutividades constituem um fator que contribui para o crescimento de *C. raciborskii*, no ambiente.

A condutividade está relacionada com os diferentes íons que podem ser encontrados na água. Deste modo, é natural questionarmos também que efeito teria a presença de cada íon em particular e sua concentração sobre a ocorrência de florações e sua toxicidade. Em água pura, o CO₂ dissolvido reage com diferentes íons formando carbonatos (Maia *et al.*, 2001). Porém, os sais de carbonato podem se solubilizar gerando bicarbonato (HCO₃⁻) e o equivalente cátion livre, em condições de pH ácido (Maia *et al.*, 2001). A dureza da água geralmente é expressa por concentrações de sais de carbonato (APHA, 1995). Avaliando, então, a dureza ocasionada pela adição de carbonatos ao meio de cultura, percebe-se que os diferentes cátions parecem contribuir de forma diferente para o crescimento de *C. raciborskii* (tabela 4.2.2).

O CaCO₃ é praticamente insolúvel. Isto poderia explicar a diminuição da taxa de crescimento, da razão celular e da duração da fase exponencial de *C. raciborskii* T3 na condição de CaCO₃, evidenciando um acentuado efeito da dureza sobre o crescimento de *C. raciborskii* T3 (tabela 4.2.2). MgCO₃ e Na₂CO₃, nesta ordem, são proporcionalmente mais solúveis em água que CaCO₃ (Morais *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 2001), havendo assim disponibilidade de Mg²⁺ e Na⁺ nessas condições. Portanto, parece que a dureza está relacionada ao tipo de cátion disponível. Adicionalmente, é interessante notar que MgCO₃ ou Na₂CO₃ não causaram diminuição, mas aumento do crescimento celular, após 15 dias de exposição (Tabela 4.2.2). Esse crescimento

pode ter sido favorecido pela oferta de íons livres, nessas condições. Para testar a hipótese de que Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ livres possam ser responsáveis pelos efeitos observados, novos experimentos foram realizados com a adição ao meio de cultura dos sais CaCl_2 , MgCl_2 e NaCl .

O Na^{2+} é um cátion que participa da formação de gradientes iônicos celulares, importantes no transporte de solutos através de membranas, além de participar da manutenção da homeostase celular e de várias reações metabólicas (Nelson e Cox, 2002; Pomati *et al.* 2004). Pomati *et al.* (2004) analisaram o crescimento de *C. raciborskii* T3 sob $15 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em condições de NaCl 10 mM. O crescimento celular da linhagem, medido como densidade óptica das culturas ($\text{DO}_{750\text{nmNaCl}} / \text{DO}_{750\text{controle}}$), diminuiu progressivamente após três dias de exposição ao sódio, reduzindo-se cerca de 2,5 vezes, até o sétimo dia de cultivo da linhagem. Neste estudo, a disponibilidade de Na^+ na forma NaCl 5 ou 10 mM estimulou o crescimento das células de *C. raciborskii* T3. As taxas de crescimento e as razões celulares nessas condições foram maiores que na condição controle (tabela 4.2.2). Por tanto nossos dados discordam dos observados por Pomati *et al.* (2004). Com definições de crescimento celular distintas, nossos dados provavelmente não são comparáveis com os desses autores. Adicionalmente, duas outras linhagens de *C. raciborskii* apresentaram diminuição de crescimento celular quando expostas a concentrações de 36 ou 108 mM de NaCl (Moisander *et al.*, 2002). Os autores utilizaram para cálculo das taxas de crescimento os valores de clorofila-a. Além disso, a menor concentração de NaCl testada pelos autores é maior que a mais alta concentração usada em nosso estudo. Comparações entre nossos dados e os de Moisander *et al.* (2002) seriam incoerentes.

Na literatura, encontramos, ainda, estudos se referindo à inibição de crescimento em algumas espécies de cianobactéria pela salinidade, investigada através do aumento da concentração de NaCl no meio de cultivo. Concentrações de NaCl de 0,5 a 40 mM inibiram a fotossíntese e o sistema respiratório de cianobactérias como *Anabaena cylindrica*, *Synechocystis* e *Synechococcus* (Bhadauriya *et al.*, 2007; Allakhverdiev e Murata, 2008). As concentrações utilizadas em nosso estudo aparentemente não foram suficientemente altas para exercer tal inibição sobre células de *C. raciborskii* T3.

Neste estudo, as concentrações de MgCl₂ 5 mM e 10 mM parecem ter estimulado o metabolismo das células de *C. raciborskii* T3, explicando o aumento das taxas de crescimento celular e das razões celulares nessas condições em comparação com o controle (tabela 4.2.2). Isso poderia ser explicado pelo fato do magnésio atuar como co-fator de enzimas e na ligação de compostos fosfatados. A fixação de carbono requer ATP, que tem sua concentração aumentada na luz, na presença de Mg²⁺ e em pH acima de 7,0, possibilitando a atividade carboxilase da RUBISCO (Nelson e Cox, 2002). Concentrações de Mg²⁺ regulam as funções de enzimas que participam da sua inserção nos anéis tetrapirrólicos da clorofila, onde sua presença é essencial para a captura de energia luminosa (Chew e Bryant, 2007; Sobotka *et al.*, 2008).

Quando observamos os resultados do uso CaCl₂ percebemos que esse sal proporcionou diferentes respostas de crescimento em células de *C. raciborskii* T3 em função da concentração do cátion Ca²⁺. Na menor concentração (5 mM) a taxa de crescimento foi maior, enquanto que na maior concentração (10 mM) essa não se diferenciou do controle. Porém, quando avaliamos a razão celular, percebemos que tanto o tratamento com CaCO₃, quanto os com CaCl₂ diminuiram a fase exponencial

de crescimento para o sexto dia de cultivo, o que se refletiu em uma redução significativa da razão celular, nestas condições (tabela 4.2.2).

Existem poucos estudos na literatura quanto ao efeito do Ca^{2+} no crescimento de cianobactérias. Um único exemplo, em ensaios de laboratório, concentrações de 0,1 a 0,4 mM de cálcio foram tidas como ótimas para o crescimento de *Lyngbya wollei*, também produtora de saxitoxinas (Yin *et al.*, 1997). Esses valores de cálcio são menores que os utilizados neste estudo impossibilitando comparações.

Em cianobactérias, devido à competição entre O_2 e CO_2 pela enzima RUBISCO (Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase), a fixação de carbono envolve um mecanismo mais efetivo (chamado CCM, “ CO_2 -concentrating mechanism”), o que resulta em uma concentração de CO_2 na célula cerca de 1000 vezes maior que o CO_2 concentrado pela enzima RUBISCO (Koropatkin *et al.*, 2007). Um complexo protéico transportador de membrana chamado CmpABCD participa do CCM por importar e acumular carbono inorgânico como HCO_3^- (Omata *et al.*, 1999). Na cianobactéria *Synechocystis* foi observado que a proteína CmpA desse complexo possui alta afinidade por Ca^{2+} . Esse cátion seria um co-fator enzimático que aumentaria a afinidade por HCO_3^- , além de também aumentar a afinidade do complexo por nutrientes como o nitrato (Koropatkin *et al.*, 2007). Além disso, o Ca^{2+} é considerado um mensageiro universal, que pode transmitir sinais da superfície celular para seu interior. Sua concentração intracelular é regulada por controle do influxo e efluxo do meio externo que requer transporte dependente de ATP ($\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$) e canais de Ca^{2+} (Dominguez, 2004). Em *Anabaena sp* foi descrito pela primeira vez em cianobactérias um mecanismo de transdução de sinal mediado por alterações transientes na concentração intracelular de Ca^{2+} (Torrecilla *et al.*,

2000). Esta sinalização participa da resposta à salinidade alta (NaCl), estresse osmótico e transições de luz e escuro (Torrecilla *et al.*, 2004).

A concentração de 5 mM na condição CaCl₂, utilizada nesse estudo, pareceu inicialmente estimular o crescimento de *C. raciborskii* T3, provavelmente por ser adequada ao uso desse cátion em processos metabólicos como os citados acima. Contudo uma maior exposição parece ter inibido o crescimento celular, reduzindo o tempo de duração da fase exponencial do crescimento e a razão celular (tabela 4.2.2). O mesmo ocorreu na condição CaCl₂ 10 mM (tabela 4.2.2). Essa inibição seria justificável caso estas concentrações interferissem na manutenção da homeostase celular. O fato de bactérias manterem o controle da concentração de Ca²⁺ intracelular em face de diferentes concentrações extracelulares desse cátion (nM ou mM) e usar aumentos transientes da concentração citosólica desse íon como um sinal, sugere que altas concentrações de cálcio no citosol podem ser tóxicas (Dominguez, 2004; Torrecilla *et al.*, 2004). O excesso de cálcio poderia estar exigindo um gasto energético maior, pela intensa utilização de bombas de cálcio, para o ajuste das concentrações citosólicas de Ca²⁺, como ocorre também em bactérias (Dominguez, 2004). Porém, deve-se ressaltar que apesar de observarmos a inibição do crescimento celular nas condições em que se utilizou cálcio, nenhum dos tratamentos evidenciou morte celular, uma vez que não houve redução significativa do número de células, após essas atingirem a fase estacionária do crescimento (Figs. 4.2.2 e 4.2.3)

O efeito de alguns dos íons testados neste estudo sobre a síntese de saxitoxinas já havia sido estudado (Yin *et al.*, 1997; Pomati *et al.*, 2004; Kellman e Neilan, 2007). Pomati *et al.* (2004) analisaram o efeito do cátion Na⁺ (NaCl 10 mM) sobre a produção de STX por *C. raciborskii* T3 após exposição por seis dias. Os

autores observaram que o aumento da concentração de STX/OD_{750nm} era dose dependente, e propuseram que a síntese de STX em *C. raciborskii* é dependente de concentrações citosólicas de Na⁺ e está associada a manutenção da homeostase celular em condições de estresse osmótico. Isto também foi observado anteriormente por Negri *et al.* (1997), que observaram uma estreita correlação entre a concentração intracelular de Na⁺ e o acúmulo de STX em células de *Anabaena circinalis*. Este efeito estimulante foi confirmado por nossas observações, para valores de STXs.10⁻⁶ células, tanto no sexto quanto no décimo segundo dia de cultivo e tanto no caso de Na₂CO₃ quanto de NaCl. Por esses resultados, podemos supor que as vantagens metabólicas já discutidas para o crescimento das células em presença de Na⁺ refletiram também no metabolismo de produção de saxitoxinas por *C. raciborskii* T3, confirmando o observado anteriormente, nos estudos supracitados.

No trabalho de Pomati *et al.* (2004), nenhum efeito foi relatado sobre a síntese de STX por *C. raciborskii* T3 exposta a 5mM de MgCl₂ durante seis dias. Porém, “*In vitro*”, o uso de 1 mM de magnésio estimulou em 11% a síntese de STX (Kellman e Neilan, 2007). No nosso estudo, o magnésio adicionado nas diferentes formas estimulou a produção de STXs nos sexto e décimo segundo dias de cultivo (Tabela 4.2.2). Os dados indicam que o aumento da produção de STXs é dose dependente (seis dias: MgCl₂ 5 mM - 321,55%; MgCl₂ 10 mM - 728,17%; doze dias: MgCl₂ 5 mM – 20,42%; MgCl₂ 10 mM - 76,70%). Possivelmente as vantagens decorrentes da presença de Mg²⁺ para o metabolismo geral da cianobactéria refletiu-se na síntese dessas toxinas, aumentando suas concentrações celulares. Esses resultados contradizem o observado por Pomati *et al.* (2004), talvez devido ao fato de que os valores de STX quantificados por esses autores foram normalizados por densidade

óptica das células (STX/OD_{750nm}) e não por contagem de células como no nosso caso. Adicionalmente, no presente estudo, a síntese de STXs continuou a ser estimulada no décimo segundo dia de cultivo, em todas as condições em que se usou Mg²⁺ (tabela 4.2.2). Os mecanismos pelos quais o magnésio pode influenciar a síntese de saxitoxinas também permanecem desconhecidos.

Em nosso estudo, as condições de CaCO₃ inibiram a síntese de STXs (STX+NSTX) pelas células *C. raciborskii* T3, tanto no sexto dia quanto no décimo segundo dia do cultivo se comparadas com a condição controle (Figs. 4.2.4 e 4.2.5; Tabela 4.2.2). Entretanto, nas condições de CaCl₂ 5 ou 10 mM a síntese de STXs por células foi estimulada no sexto dia de cultivo (Fig. 4.2.4), mas esse padrão não se repetiu no décimo segundo dia de cultivo, pois sob a condição CaCl₂ 5 mM a síntese de STXs ficou reduzida e sob a condição CaCl₂ 10 mM não aumentou em relação ao controle (Fig. 4.2.6). Analisando nossos resultados, na condição de CaCO₃ as células entraram mais cedo em fase estacionária (tabela 4.2.2). Nesse caso, a inibição da síntese de STXs poderia não estar relacionada com a presença do cátion Ca²⁺, mas com o estresse causado pelo uso do CaCO₃. Por outro lado, sob as condições de CaCl₂, as vantagens, já discutidas, representadas pelo aporte de cálcio podem ter favorecido o metabolismo celular, favorecendo também o aumento na síntese de STXs até o sexto dia de cultivo. Entretanto, a prolongada exposição às essas condições (doze dias) parece ter representado um estresse para as células, como já discutido em relação ao crescimento celular, refletindo também na menor síntese de STXs. Quanto a outras cianobactérias, o aumento na concentração de Ca²⁺ entre 0,2 e 1,2 mM aumentou proporcionalmente a toxicidade de *L. wollei* e a diminuição da concentração desse cátion para 0,025 mM diminuiu a toxicidade (Yin *et al.*, 1997). Em um estudo sobre a síntese de STX “*in vitro*”, a

concentração de Ca^{2+} 2 mM inibiu a síntese em 2% (Kellman e Neilan, 2007). Porém, o papel do Ca^{2+} na síntese de STXs permanece desconhecido.

Apesar de um aumento da fase exponencial de crescimento ter ocorrido em todas as condições nas quais o sódio foi utilizado, a diminuição da síntese de STXs foi observada do sexto para décimo segundo dia de cultivo, em todas as condições de uso de sódio, se comparadas com o aumento da produção na condição controle (tabela 4.2.2). Por outro lado, observamos tanto aumento, quanto diminuição da produção de STXs do sexto para o décimo segundo dia nas condições de magnésio, onde também não foram observadas reduções na duração da fase exponencial de crescimento. É também interessante notar que diferentes respostas foram observadas do sexto para décimo segundo dia de cultivo, nas condições sob uso de Ca^{2+} . Enquanto que na condição de uso de CaCO_3 ocorreu o aumento expressivo na síntese de STXs, nas condições de uso CaCl_2 , ocorreu diminuição dessa síntese (tabela 4.2.2). Portanto, a síntese de STXs parece estar ligada ao estresse causado pela prolongada exposição aos diferentes íons. Porém, não há dados na literatura que suportem outras discussões sobre essas observações.

Em uma visão global, a síntese de STXs foi estimulada na maioria dos tratamentos adotados para se testar o efeito da condutividade (dureza) da água nesse estudo. No sexto dia de cultivo quando a maioria das culturas estava com as células em fase exponencial de crescimento (tabela 4.2.2), houve um aumento proporcional da síntese de STXs em sete das nove condições experimentais, as quais apresentavam condutividade do meio acima de $800 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (tabela 4.2.2). Todavia, a exposição prolongada a essas condições não teve o mesmo efeito e o aumento da síntese de STXs ocorreu em apenas três dos tratamentos, após doze dias de exposição, se comparados ao controle.

Portanto, a maioria dos íons testados estimulou o crescimento de *C. raciborskii* T3 e a síntese de STXs também foi estimulada nessas condições. Evidentemente, o real significado ecológico dessas observações precisa ser mais bem avaliado, com experimentos com outras linhagens da espécie, produtoras de STXs. Entretanto, este estudo mostra que o aumento da condutividade pela maior disponibilidade de cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ , usualmente observado em ambientes aquáticos brasileiros (Bouvy *et al.*, 2000; Chellappa *et al.* 2008 a e b; Chellappa e Costa, 2003; Costa *et al.*, 2009), onde se tem verificado florações neurotóxicas de *C. raciborskii* (Bouvy *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2006; Molica *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2009), pode influenciar o aumento da síntese de saxitoxinas. Esse conhecimento contribui para direcionar um melhor acompanhamento do crescimento dessa espécie e da toxicidade dessas florações. Em suma, pode proporcionar uma base para estudos que busquem minimizar os potenciais riscos decorrentes dos usos múltiplos desses mananciais.

4.3 – CAPÍTULO TERCEIRO – EFEITO INIBITÓRIO DO CÁLCIO SOBRE O METABOLISMO DE *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria)

“Carneiro, RL, Alípio, ACN, Bisch, PM, Azevedo, SMFO, Pacheco, ABF. The Inhibitory Effect of Calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA) Metabolism. Submetido ao periódico Applied and Environmental Microbiology

Objetivo: A partir de alterações no crescimento e produção de saxitoxinas em resposta a alta concentração de cálcio, estudar possíveis alterações no padrão total de proteínas expressas em uma linhagem de *Cylindrospermopsis raciborskii* (mapa proteômico).

4.3.1 - Resumo de material e métodos

4.3.1.1 - Experimentação com CaCl₂

Para avaliar o efeito do íon Ca²⁺ sobre o metabolismo de *C. raciborskii*, foi adicionado ao meio de cultura ASM-1 o sal CaCl₂ em quantidade suficiente para se obter a concentração de 10 mM do íon Ca²⁺. Após a adição do sal e ajuste do pH para 8,0, a turbidez dos diferentes meios de cultivo (ASM-1 e ASM-1 com cálcio) foi determinada usando um turbidímetro (2100P - HACH). Uma vez que a precipitação natural de parte do cálcio na forma de CaCO₃ poder gerar aumento de turbidez, a intensidade luminosa foi mensurada com o auxílio de um sensor quântico imerso até o fundo de um balão de fundo chato com o mesmo volume de meios de cultivo utilizados nos experimentos.

Para determinar as concentrações iniciais de íons Ca²⁺ livres nos meios de cultura, foram retirados 10 mL de meio ASM-1 ou ASM-1 adicionado de CaCl₂, antes das células serem inoculadas. A concentração desse íon foi determinada por

cromatografia iônica. Foi utilizado um sistema de cromatografia de íons (Dionex® ISC-1000) para separação de cátions. A análise foi feita com supressão da condutividade. O método de supressão utilizou uma coluna CS12A (250 mm, 4 mm de diâmetro interno), precedida de uma coluna guarda CG12A (50 mm, 4 mm de diâmetro interno) e uma bomba supressora (CSRS 300 - 4 mm). A eluição isocrática com ácido metassulfônico (AMS) 21 mM (preparado offline antes do uso) foi feita “online” pelo aplicativo Chromeleon 6.80. O volume de injeção de amostras do meio ASM-1 ou ASM-1 com cálcio foi 500 µL (loop 500 µL) e o tempo de corrida foi de 15 minutos. A concentração foi determinada levando em conta o tempo de retenção e de acordo com curva de calibração de padrão de cátions (“Six cation II- Standard” Dionex®).

Para os experimentos, uma cultura de *C. raciborskii* T3 foi crescida nas condições de manutenção (item 3.1) e após atingir a fase estacionária de crescimento (12 dias de cultivo) foi utilizada como inóculo. Os experimentos foram iniciados com $7,0 \times 10^5$ células/ml inoculadas em balões de fundo chato de 3 litros, contendo meio ASM-1 (condição controle) ou meio ASM-1 adicionado de CaCl_2 (Ca^{2+} 10 mM), em triplicatas. As culturas foram amostradas a cada três dias, durante quinze dias para determinações do crescimento celular (item 3.2). No décimo segundo dia de cultivo (que corresponde à fase estacionária do crescimento, na condição controle), de cada cultura foram amostrados 500 mL para serem submetidos à extração e análises de STX, como descrito no item 3.3.

4.3.1.2 - Purificação de proteínas

De cada cultura foram também amostrados 500 mL, no décimo segundo dia, para purificação de proteínas. Esse volume foi centrifugado (10000g, 15min, 4°C) e as células precipitadas foram estocadas a -20° C. Para extração das proteínas, as células foram descongeladas em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado ácido acético 500 mM, um volume suficiente para cobrir as células, e a amostra foi incubada a 25° C por 1 h. Uma alíquota de 2 mL desse material foi então combinada com 18 mL de uma solução de acetona 90%, ácido tricloroacético 10% e β -mecaptoetanol 0,07%, agitada vigorosamente e mantida a -20°C durante 18 h. As proteínas precipitadas foram recuperadas por centrifugação (10000 g, 45 min, 4° C) e o precipitado resultante foi lavado três vezes com acetona 90%. Em sequência, as proteínas foram solubilizadas a 25° C por 1 h em solução de tio-uréia 2 M, uréia 7 M, Chaps 4%, DTT (ditriotretol) 40 mM, anfólitos Pharmalyte 3-10 0,5% e PMSF (fluoreto de metil fenil sulfonato) 1 mM. O solubilizado foi novamente centrifugado (10000 g, 45 min, 4° C) e o sobrenadante recolhido. Uma nova etapa de purificação foi realizada com o Kit comercial, 2D-Clean up kit (GE Healthcare). A amostra resultante teve sua concentração protéica determinada de acordo com Bradford (1976) e foi estocada em nitrogênio líquido.

4.3.1.3 - Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Amostras de 150 μ g de proteínas solúveis (solubilizadas em 200 μ l de tio-uréia 2 M, uréia 7 M, Chaps 4%, DTT 40 mM, Pharmalyte 3-10 0,5% e azul de bromofenol 0,002%) foram usadas para re-hidratar tiras de poliacrilamida (Immobiline Drystrip; GE Healthcare) de 11 cm, pH 4-7, durante 16 h, em temperatura ambiente. A focalização das proteínas foi feita em equipamento

Multiphor II (GE Healthcare), de acordo com a recomendação do fabricante. Após a focalização, as proteínas foram reduzidas e alquiladas (as tiras foram equilibradas com DTT e iodacetamida) e as tiras foram colocadas em um gel SDS-PAGE 12%, confeccionado de acordo com Sambrook e Russell (2001).

Para a separação em segunda dimensão, foi realizada uma eletroforese no equipamento Multiphor II (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a corrida, os géis foram corados com comassie blue G-250, digitalizados e as imagens obtidas analisadas usando o aplicativo ImageMaster 2D Platinum v5.0 (GE Healthcare).

Para cada condição testada, cálcio ou controle, foram produzidos três géis, dois carregados com amostras de proteínas da mesma cultura e o terceiro com amostra de cultura diferente. O valores de ponto isoelétrico (pI) das proteínas de interesse foram determinados usando uma distribuição linear de pH 4-7 e os valores de massa molecular (MM) foram estimados com base em padrões de proteína de baixa MM (GE Healthcare).

Os spots dos géis 2D foram inicialmente detectados automaticamente com o aplicativo ImageMaster 2D Platinum v5.0 (GE Healthcare) e posteriormente foram manualmente confirmados. Em cada gel, as intensidades dos spots foram normalizadas e as três réplicas dos géis de cada classe (controle ou cálcio) foram combinadas e comparadas (ImageMaster 2D Platinum v5.0, manual do usuário). Um conjunto de spots característico de cada condição experimental foi definido selecionando aqueles que estavam consistentemente presentes nas trélicas dos géis. Para identificar as proteínas diferencialmente expressas, imagens de dois géis foram comparadas (um gel mestre para cada condição, gerado a partir das análises

das réplicas individuais) e a intensidade dos diferentes spots foi avaliada usando o volume relativo de acordo com a fórmula:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vol_s} \times 100;$$

onde, Vol_s é o volume do spot S no gel com n spots. Os spots foram considerados como diferencialmente expressos quando: (i) %Vol diferiu mais que duas vezes entre a condição controle e cálcio; (ii) os valores de %Vol mostraram pouca dispersão nas réplicas dos géis e (iii) a dispersão dos valores %Vol em cada condição não se sobrepunha por mais que 25%.

4.3.1.4 - Identificação das proteínas por Espectrometria de Massas

Os spots selecionados como proteínas diferencialmente expressas foram cortados dos géis, lavados duas vezes em acetoneitrila 50% 25 mM NH_4HCO_3 , depois colocados em acetoneitrila 100% e secos a vácuo. Os fragmentos de gel foram tratados com tripsina ($15 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (Promega, Madison, WI, USA) e os peptídeos foram extraídos com 50 μl de acetoneitrila 50% e TFA (ácido trifluoroacético) 5%, secos a vácuo e ressuspensos com 3 μl de acetoneitrila 50% e TFA 0,1%. Uma alíquota de 0,5 μl das amostras foi misturada com volume igual de uma solução saturada de ácido α -cayno-4-hydroxycinamico em acetoneitrila 50% e TFA 5%. Essa mistura foi analisada por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF (4700 Explorer Proteomics Analyzer, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Para dissociação por colisão do íon precursor foi utilizado N_2 como gás indutor à pressão de $2,8 \times 10^{-6}$ Torr. As massas dos picos dos espectros resultantes, representantes dos fragmentos iônicos gerados, devidamente calibradas, foram utilizadas para buscas no banco de dados

NCBI (versão disponível em 30/09/08), através do aplicativo MASCOT

(www.matrixscience.com).

4.3.1.5 - Análises estatísticas dos dados

Os dados das análises de proteínas diferencialmente expressas foram testados usando teste t para comparar o volume relativo (%*Vol*) dos spots nas imagens dos géis com 80% de significância (α 0,2) usando o aplicativo ImageMaster 2D Platinum v5.0 (GE Healthcare).

4.3.2 - Resumo dos resultados e discussão

A adição de CaCl_2 ao meio de cultivo causou um aumento da turbidez (controle $3,25 \pm 0,38$ unidades de turbidez (NTU); CaCl_2 $7,28 \pm 0,35$ NTU). A determinação da concentração de Ca^{2+} iônico livre antes do inóculo das células mostrou que houve uma redução em relação à concentração original desse íon tanto no meio controle (de $20 \mu\text{M}$ para $17,93 \pm 0,01 \mu\text{M}$) quanto na condição de CaCl_2 (de 10 mM para $7,86 \pm 0,88 \text{ mM}$).

As taxas de crescimento calculadas a partir do número de células na fase exponencial, não apresentaram diferenças significativas entre as condições controle (tabela 4.3.1; teste-U; $P > 0,05$). Entretanto, na condição controle, a fase exponencial de crescimento durou até o décimo segundo dia, enquanto que na condição de Ca^{2+} 10 mM essa fase durou somente até o sexto dia de cultivo, denotando uma inibição do crescimento nesta última condição (Fig. 4.3.1). Essa inibição fica evidente quando comparamos os números de células na fase estacionária nas duas condições, significativamente menores na condição de Ca^{2+} 10 mM (dias 12 e 15; teste-U; $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente; Fig. 4.3.1), assim como a razão entre o número final (décimo quinto dia) e o número inicial de células nas duas condições (tabela 4.3.1)

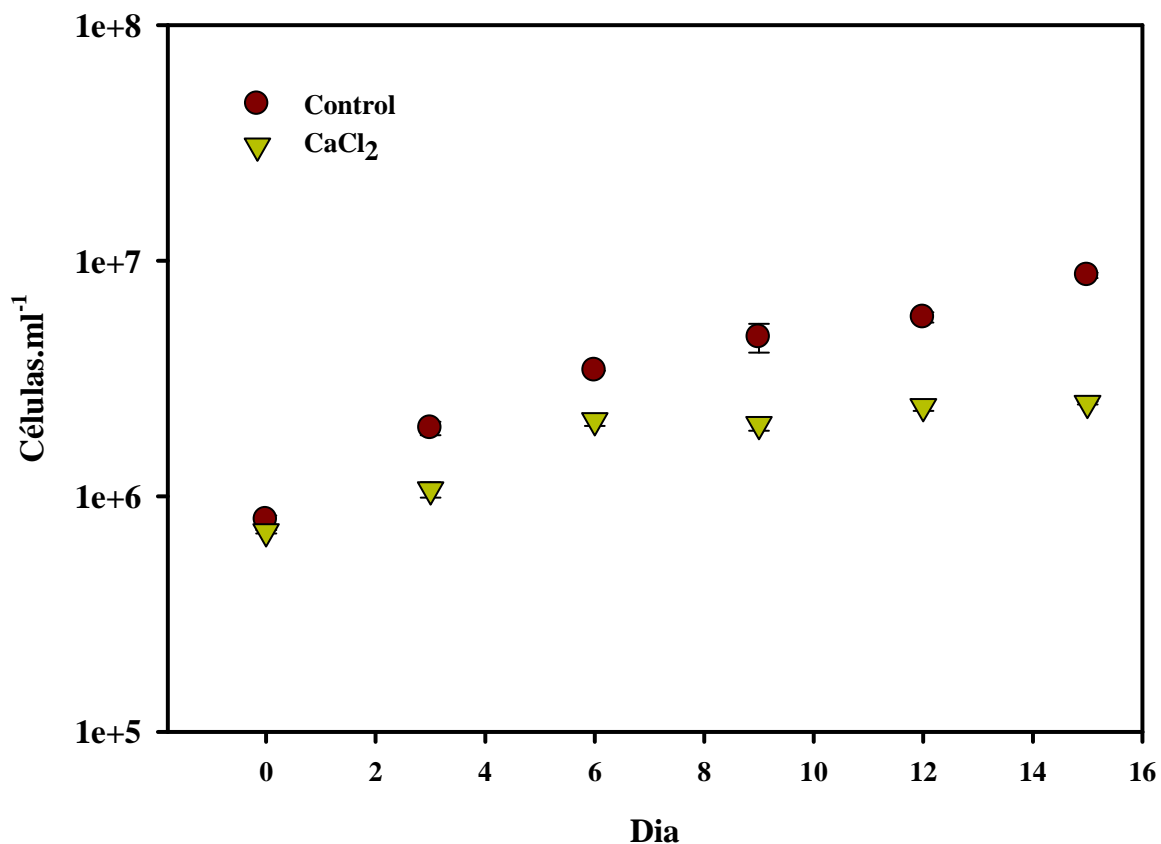


Figura 4.3.1 - Curvas de crescimento de células de *C. raciborskii* T3 cultivadas em meio ASM-1 e ASM-1 acrescido de Ca²⁺ 10 mM. As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=3).

Tabela 4.3.1 – Parâmetros de crescimento e produção de STX por células de *C. raciborskii* T3 cultivada em meio ASM-1 ou ASM-1 com Ca²⁺ (10 mM), após 12 dias de exposição.

Condição	Duração da fase exponencial	Taxa de crescimento (μ) ^{a,b}	Razão celular ^a	STX (ng).10 ⁻⁶ células ^a
controle	9 dias	0,26 ± 0,04	12,30 ± 1,37	0,49 ± 0,08
CaCl ₂	6 dias	0,23 ± 0,22	1,58 ± 0,31 ^c	0,18 ± 0,02 ^b

^aValores apresentados como médias ± desvio padrão (n=3). ^b μ é crescimento relativo.dia⁻¹. ^cRazão celular é a divisão do número de células final (dia 15) pelo número de células inicial (dia 0). ^{b,c}Diferenças estatísticas de cada tratamento em relação ao controle em relação ao controle: ^bTeste de Dunn, $P < 0,05$; ^cTeste de Dunn, $P < 0,01$.

Para avaliar o efeito da longa exposição ao cálcio sobre a produção STX, foram mensuradas as concentrações intracelulares, normalizadas por 10^6 células, no décimo segundo dia de cultivo, correspondente à fase estacionária do crescimento (Fig. 4.3.1). Pela observação dos valores, ocorreu uma inibição de 2,7 vezes na concentração de saxitoxinas após 12 dias de exposição ao Ca^{2+} na concentração 10 mM.

Os géis para análises de proteínas diferencialmente expressas apresentaram em média cento e trinta e cinco spots com resolução clara. Géis representativos das duas condições estão mostrados na figura 4.3.3.

Considerando os spots que representaram uma diferença de expressão de pelo menos duas vezes entre as duas condições, um total de trinta e cinco proteínas foram definidas como diferencialmente expressas e assim processadas para identificação. Dessas trinta e cinco, apenas cinco tiveram expressão maior na condição Ca^{2+} 10 mM. Quinze proteínas foram identificadas por análises de espectrometria de massas (MS), algumas delas com identificação repetida em diferentes spots (spots 33 e 34; 63, 64 e 67, Tabela 4.3.1, Fig. 4.3.3). Essas proteínas apresentaram-se como spots com *pI* variável, mas com mesma *MM*, possivelmente resultando de modificações pós-traducionais. As outras proteínas não puderam ser identificadas devido à pequena quantidade no gel ou por estarem misturadas, resultando em espectros de massa com baixa qualidade.

A busca baseada em homologia feita em banco de dados de proteínas retornou em todos os casos proteínas de cianobactérias, o que pode ser considerado como um bom indicativo de identificação correta. Para cada proteína identificada, os valores de *MM* e *pI* estimados pela posição do spot no gel e os encontrados para as proteínas homólogas recuperadas foram comparados (Tabela

4.3.1). Na maioria das vezes os valores eram similares. As funções propostas para cada proteína também estão descritas na Tabela 4.3.1. Os sinais mais intensos nos géis (Fig. 4.3.3) corresponderam a um aglomerado de spots com MM de aproximadamente 20kDa e pI entre quatro e cinco, provavelmente contendo proteínas co-migrantes. Um fragmento correspondente foi identificado por MS e indicou a presença de uma subunidade da ficocianina (Tabela 4.3.1, Fig.4.3.3).

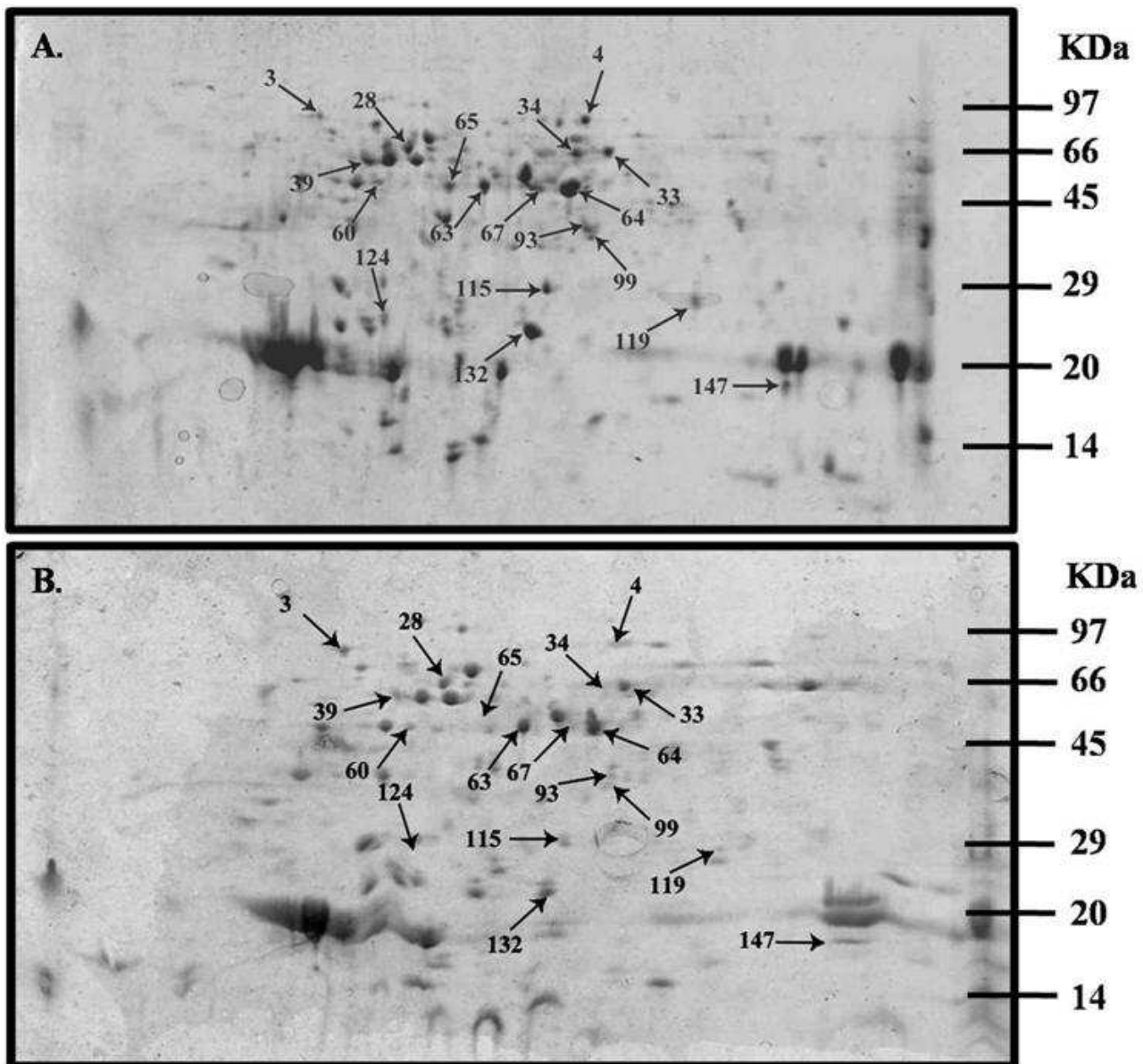


Figura 4.3.2 – Padrões protéicos (géis 2D) de células de *C. raciborskii* T3 cultivadas em meio ASM-1 (A) ou em meio ASM-1 com Ca^{2+} 10 mM (B) durante 12 dias. As proteínas solúveis foram extraídas e separadas usando gradiente de pH linear de 4-7 seguido de SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com coomassie blue G-250. Os spots são identificados com os mesmos números da tabela 4.3.1. À direita estão indicados padrões de massa molecular.

Tabela 4.3.1 - Proteínas diferencialmente expressas por *C. raciborskii* (T3) na fase estacionária (12 dias) quando cultivada em meio ASM-1 ou ASM-1 adicionado de Ca²⁺ 10 mM. Foram consideradas proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram pelo menos duas vezes maior expressão comparando as duas condições.

Spot n°.	Acesso	Identificação da proteína	MM ^b Aparente (kDa)/pI ^c	MM ^b (kDa)/ pI ^c da proteína homóloga	Categoria funcional	Condição de maior expressão
39 ^a	gi 142006	ATPase subunidade beta	56/5.10	50.8/5.10		
28	gi 17227501	F0F1 ATP sintase subunidade alfa	64/5.1	54.4/5.11		
124	gi 113475215	Difosfatase inorgânica	24/4.9	19.3/4.84		
93 ^a	gi 119509590	Piruvato desidrogenase E1 subunidade beta	39/5.6	36.4/5.31	Metabolismo energético	
60 ^a	gi 17231623	Fosfoglicerato quinase	50/5	42.5/5.15		
63	gi 17232055	Frutose-1,6-bisfosfato aldolase	45/5.3	38.7/5.49		
64	gi 17232055	Frutose-1,6-bisfosfato aldolase	45/5.6	38.7/5.49		
67	gi 17232055	Frutose-1,6-bisfosfato aldolase	45/5.5	38.7/5.49		
99 ^a	gi 186683980	Transcetolase, região central	39/5.6	36.3/5.31		Controle
119	gi 22299912	Ribulose-fosfato 3-epimerase	27/5.9	25.1/5.37	Fotossíntese	
33	gi 417058	Gluatamina sintase	62/5.7	53.5/5.22	Biosíntese de aminoácidos	
34	gi 417058	Gluatamina sintase	58/5.6	53.5/5.22		
65	gi 159154294	Fator de alongamento Tu	45/5.0	30.1/4.76	Síntese de proteínas	
3	gi 17229234	Chaperona molecular DnaK	78/4.8	68.0/4.84	Chaperona	
132	gi 6693856	Superóxido dismutase	23/5.5	22.3/5.48	Detoxificação	
4	gi 186681644	Receptor TonB-dependente	78/5.6	76/4.68	Receptor de membrana	
115	gi 17232471	Proteína hipotética alr4979	28/5.5	24.2/5.70	Desconhecido	
147	gi 20136749	Ficocianina subunidade beta	17/6.3	18.4/5.02	Fotossíntese	Cálcio

^bMassa molecular.

^cPonto Isoelétrico.

A longa exposição à alta concentração de cálcio (Ca^{2+} 10 mM) mostrou acentuado efeito inibitório no crescimento e na produção de STX e na síntese de proteínas, que foi alterada, em relação ao controle. Apenas uma referência ao efeito do cálcio sobre a síntese de saxitoxina está disponível. A reação de síntese da saxitoxina foi inibida por Ca^{2+} 1 mM, “in vitro” (Kellman e Neilan, 2007). Quanto ao efeito de outros íons, Pomati *et al.* (2004) relataram para *C. raciborskii* T3 um acúmulo de saxitoxinas após seis dias de exposição a 10 mM de NaCl, além de redução de crescimento celular. Os autores postularam que a presença do sal possa ter gerado uma intensa atividade de transportadores Na^+/H^+ , exigindo maior dispêndio de energia para manter a homeostase celular. Em bactérias existem transportadores dependentes de ATP envolvidos com o fluxo de Ca^{2+} , como transportadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ou $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, inclusive em cianobactérias (Dominguez, 2004; Waditee *et al.*, 2004). É possível que, de forma análoga ao proposto por Pomati e colaboradores, células mantidas em Ca^{2+} 10 mM necessitem ativar transportadores para manter os níveis intracelulares de Ca^{2+} adequados, o que representa uma situação de estresse. Porém, ao contrário de estimular a produção de STX, como no caso de Na^+ , o estresse por Ca^{2+} reduziu-a em cerca de 2,7 vezes, em comparação ao controle. Alternativamente, a menor produção de toxina pode não ser devida a um efeito direto do Ca^{2+} sobre a síntese de saxitoxinas mas sim uma consequência da menor taxa de crescimento celular, como já foi observado no caso de outras cianobactérias tóxicas como *Microcystis aeruginosa* e *L. wollei* (Yin *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2001).

A concentração de 10 mM de cálcio escolhida neste estudo é comum a alguns ambientes brasileiros que apresentam frequentemente dominância de

C. raciborskii (Bouvy *et al.*, 2000; Chellappa e Costa, 2003; Chellappa *et al.*, 2008 a e b; Costa *et al.*, 2009). Por exemplo, o cálcio pode chegar a concentrações acima de 40 mM em reservatórios do nordeste brasileiro (Costa *et al.*, 2009). Outros estudos usaram concentrações bem inferiores para avaliar o efeito de cálcio sobre crescimento e toxicidade de cianobactérias. Uma investigação realizada por Dufour *et al.* (2006) concluiu que a concentração de 0,2 mM de Ca^{2+} presente em águas de um lago no Senegal, foi suficiente para manter o crescimento de *C. raciborskii* em cultivo. Yin *et al.* (1997) conseguiram manter linhagens de *L. wollei*, usando água de um reservatório com concentrações de Ca^{2+} entre 0,1 e 0,85 mM e mostraram que na concentração de 1,2 mM de Ca^{2+} em meio de cultura, as linhagens aumentaram sua toxicidade.

A análise das proteínas diferencialmente expressas nas células de *C. raciborskii* mantidas em condição controle (Ca^{2+} 20 μM) e na condição de Ca^{2+} 10 mM reforçou o efeito inibitório desse cátion sobre o metabolismo das células, já apontado a partir dos resultados de crescimento e produção de toxinas. O cultivo na concentração de Ca^{2+} 10 mM ocasionou a entrada precoce e permanência das células na fase estacionária do crescimento, desde o sexto dia de cultivo. A redução generalizada da síntese protéica é natural e esperada em células em fase estacionária de crescimento se comparadas a células em fase exponencial (Nelson e Cox, 2002). Os resultados da análise proteômica concordam com este princípio. Em sua maioria (Tabela 4.3.1), as proteínas diferencialmente expressas foram mais abundantes na condição controle e estavam associadas ao metabolismo basal. Apenas uma subunidade de ficocianina foi identificada como mais expressa na condição de Ca^{2+} 10 mM. A

ficocianina é um pigmento fotossintético, que compõe o complexo-antena de cianobactérias e auxilia na captação da energia luminosa (Nelson e Cox, 2002). Naturalmente, o cátion livre Ca^{2+} pode se combinar com o gás CO_2 na água, precipitando na forma de CaCO_3 , insolúvel (Morais *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006). Como observado anteriormente, já após o preparo do meio de cultivo e antes do inóculo, a precipitação de CaCO_3 ocasionou o aumento da turbidez inicial do meio. Por isso, a intensidade luminosa inicial foi ajustada para ser igual em cada meio (controle e adicionado de Ca^{2+}), eliminando a possibilidade de uma oferta diferencial de luz. Entretanto, devido à aeração constante das culturas é provável que tenha ocorrido ao longo do cultivo maior precipitação de Ca^{2+} do que a mensurada inicialmente, causando um aumento de turbidez da água. Esse aumento da turbidez poderia justificar o aumento expressivo da expressão de ficocianina, na condição de Ca^{2+} 10 mM. Por outro lado, não são conhecidos os mecanismos pelos quais o Ca^{2+} pode influenciar a síntese desses pigmentos, impossibilitando maiores discussões.

Em bactérias o cálcio está envolvido em vários processos, desde a manutenção da estrutura celular, mobilidade, patogenicidade, entre outros (Michiels *et al.*, 2002; Dominguez, 2004). Proteínas ligadoras de cálcio já foram identificadas em bactérias, o que indica um papel importante do íon na transdução de sinais. A concentração intracelular de cálcio, portanto é controlada por transportadores primários e secundários (Michiels *et al.*, 2002; Dominguez, 2004). *Escherichia coli* é capaz de regular a concentração intracelular de cálcio e essas concentrações normalmente ficam na faixa de nM, aumentando ou diminuindo conforme as concentrações de cálcio livre no meio (Jones *et al.*, 1999). No caso de cianobactérias, transportadores de cálcio

foram identificados em *Synechocystis* sp. (Nazarenko *et al.*, 2003; Waditee *et al.*, 2004) e uma série de estudos vem mostrando a ocorrência de aumentos transientes na concentração intracelular de cálcio como uma forma de sinalização (Torrecilla *et al.*, 2000, 2004). Portanto, a perda de controle da concentração de Ca^{2+} intracelular deve ser prejudicial a esses microorganismos.

O importante papel desse íon na homeostase de cianobactérias é evidente. Em *Anabaena* sp. foi descrito pela primeira vez um mecanismo de transdução de sinal de Ca^{2+} em cianobactérias (Torrecilla *et al.*, 2000). Estresses térmicos causaram aumento transitório nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , acima dos níveis basais de células sem os tratamentos. Além disso, aumentos dos valores da concentração de Ca^{2+} intracelular foram observados quando *Anabaena* sp. foi submetida à salinidade alta, estresse osmótico e transições de luz e escuro (Torrecilla *et al.*, 2004). Um aumento transiente nas concentrações intracelulares de cálcio está envolvido na aclimação à falta de nitrogênio em *Synechococcus elongatus*, uma cianobactéria diazotrófica (Leganés *et al.*, 2009). O fato de a cianobactéria manter um controle da concentração de Ca^{2+} intracelular em face de diferentes concentrações extracelulares do íon (nM ou mM) e usar aumentos transientes da concentração citosólica do íon como um sinal, sugere que concentrações de cálcio altas no citosol podem ser tóxicas em procariontes assim como descrito para eucariontes (Torrecilla *et al.*, 2004). Contudo pouco se sabe sobre o papel do transporte de cálcio em cianobactérias.

As extrapolações de dados de laboratório para condições ambientais devem ser observadas com cautela. Porém, podemos postular que em águas duras, como as descritas para alguns ambientes brasileiros, as células

poderiam usar transportes ativos de Ca^{2+} para lidar com a alta concentração desse íon, o que geraria um expressivo estresse. Nesse sentido, análises proteômicas de cianobactérias em processo de floração poderiam ser interessantes para investigar os possíveis efeitos de altas concentrações de cálcio sobre a formação dessas florações e sua toxicidade. Estudos limnológicos, no entanto, avaliam flutuações da composição fitoplanctônica em função da condutividade, salinidade ou dureza da água. Cada um desses parâmetros é ineficiente em possibilitar a compreensão da composição iônica da água. Este estudo representa um passo inicial na investigação, sob condições controladas, do efeito de diferentes íons, individualmente, sobre a fisiologia de *C. raciborskii*, o que pode contribuir para identificar fatores fisicoquímicos que contribuam para dominância da espécie em alguns ambientes.

5 - DISCUSSÃO GERAL

O crescente interesse mundial pela espécie *C. raciborskii* fez com que o número de trabalhos publicados a seu respeito aumentasse exponencialmente nos últimos anos. Muitos dos trabalhos citados ao longo dessa tese mostram algumas tendências de investigação: (i) determinação de fatores ambientais que podem influenciar as florações, (ii) determinação da toxicidade das linhagens de diferentes origens e (iii) caracterização de genomas para avaliar a distribuição geográfica de linhagens, ou (iv) elucidação das rotas de síntese de cianotoxinas. Esse padrão não é comum apenas à *C. raciborskii*, mas às cianobactérias toxigênicas como um todo. A determinação de alguns dos fatores controladores de florações é importante por oferecer informações que visam facilitar o manejo e a proposta de ações mitigadoras para recuperação da qualidade do ambiente aquático. Uma consequência direta do desenvolvimento dessas ações seria a capacidade de prever eventos de risco, como florações que possam vir a causar intoxicações por ingestões acidentais das cianotoxinas. Esta seria a principal motivação dos estudos já citados com enfoque na produção de cianotoxina por diferentes linhagens e espécies (ii) e ao entendimento de sua síntese (iv), o que levou a elucidação de muitas estruturas químicas das cianotoxinas e de alguns de seus efeitos em animais (Othani *et al.*, 1992; Oshima, 1995; Kaebernick e Neilan, 2001; Katircioglu *et al.*, 2004; Mihali *et al.*, 2008; Hudnell, 2008). Entretanto, é comum esbarrarmos com a falta de informação sobre a fisiologia de cianobactérias, principalmente em relação a aspectos básicos como, por exemplo, crescimento celular, produção de clorofila-a, de proteínas ou carboidratos totais e como esse metabolismo basal pode ser alterado por variáveis ambientais. Essa falta de

informações leva a uma lacuna quando se procura estabelecer como, onde e quando uma toxina pode ser produzida por uma dada espécie de cianobactéria no ambiente, ou mesmo como prever a possível ocorrência de florações a partir do conhecimento de fatores ambientais. Não conhecendo a fisiologia do organismo, os efeitos de fatores controladores da ocorrência de florações no ambiente tornam-se, na maioria dos casos, inconclusivos. Isso explica também porque ainda é recorrente a questão: 'por que cianobactérias produzem toxinas?'.

A linhagem escolhida para este estudo foi uma das primeiras isoladas e caracterizadas como produtora de saxitoxinas, há mais de 10 anos, em São Paulo (Lagos *et al.*, 1999). Apesar das hipóteses, deste estudo, estarem ancoradas em condições ambientais encontradas em solos e reservatórios de água nordestinos onde frequentemente ocorrem florações da espécie (Bouvy *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2009). *C. raciborskii* T3 é utilizada como linhagem-tipo, modelo de estudo para a produção de STXs pela espécie (Pomati *et al.*, 2004; Kellman e Neilan, 2007), o que justifica a sua escolha. Isso permite uma comparação mais direta entre nossos resultados e as diferentes investigações já publicadas com a linhagem.

Obter conclusões sobre a influência da intensidade luminosa (investigada no capítulo primeiro) sobre o crescimento de *C. raciborskii* não é fácil. Na literatura, uma série de estudos, desde mais antigos até bem recentes, parecem estabelecer um padrão que define a adaptação da espécie à intensidade luminosa. O levantamento de Padisák (1997) estima para a espécie uma condição ótima de crescimento em torno de $80 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (μE) em condições naturais. Outros trabalhos de laboratório mostraram

intensidades ótimas de crescimento até 200 μE (Shafik *et al.*, 2001) ou variando entre 75 e 139 μE (Dyble *et al.*, 2006), podendo também ficar em torno de 280 μE para uma linhagem brasileira (Soares, 2008). Em nosso estudo, verificamos crescimento de células de *C. raciborskii* T3 até 150 μE . Entretanto, não testamos maiores intensidades luminosas e não sabemos qual seria a intensidade ótima para o crescimento da linhagem. Pelos dados desses diferentes estudos é possível ainda considerar a espécie como adaptada a baixas intensidades luminosas. Isso fica claro quando se leva em conta que sobre a superfície da água a intensidade luminosa costuma atingir 2000 μE , no verão, em ambientes tropicais, as populações da espécie ocorrem com frequência em altas profundidades, até o limite da zona eufótica. Delazari-Barroso (2007) relata a ocorrência frequente de populações de *C. raciborskii*, com biomassa (peso seco de células) superior a 81%, na profundidade equivalente ao limite da zona eufótica. Da mesma forma, Soares (2008) descreve populações de *C. raciborskii* ocorrendo seguidamente em profundidade de quatro metros, novamente o limite da zona eufótica, sob uma floração de *Microcystis aeruginosa*, aonde chegava apenas 20 μE de intensidade luminosa, uma vez que a intensidade na superfície era 2000 μE (Soares, 2008). Porém, a carência de dados da intensidade luminosa (tabela 2.1) em diferentes profundidades onde ocorreram florações de *C. raciborskii* no Brasil impede uma comparação mais geral.

Além disso, analisando os estudos supracitados, encontramos outras divergências. Nos diferentes estudos, as mensurações do crescimento celular de *C. raciborskii* são bastante variáveis. Saker *et al.*, (1999) calculam taxas de crescimento para a espécie (duas linhagens) a partir de valores de densidade

óptica (OD_{750nm}), levando em conta uma correlação de 96 a 97% (R^2), obtida por análise de uma curva padrão, com a contagem do número de células ($n=72-87$). Esses autores, então, acompanharam o crescimento das culturas em intensidades variando de 6 a 433 μE , em fotoperíodo de 12:12h (luz:escuro, (L:E)), encontrando crescimento ótimo (1,23 divisões.dia⁻¹) em 118 μE (Saker *et al.*, 1999). Dyble *et al.*, (2006) creditaram que houve crescimento celular pela mensuração da concentração de clorofila-a por litro de cultura, que aumentou durante dezesseis dias de cultivo de duas linhagens, em fotoperíodo de 15:9h (L:E). As intensidades onde as células demonstraram maior aumento do conteúdo de clorofila-a foram de 75 a 139 μE (Dyble *et al.*, 2006), o que seria decorrente do aumento do número de células.mL⁻¹, não citado no estudo. Soares (2008) estudou a linhagem LetcCYRF-1, brasileira, mantida em fotoperíodo 14:10 (L:E), em regime de intensidades luminosas de 35 a 350 μE . O cálculo da taxa de crescimento utilizado pela autora foi baseado no volume celular (biovolume) e na concentração de clorofila-a. A taxa de crescimento foi de 0,35 a 0,55 μ .dia⁻¹, baseado no volume celular e ficou em torno de 0,4 μ .dia⁻¹, baseado na concentração de clorofila-a. (Soares, 2008). Outros estudos ainda determinaram o crescimento por fluorescência “*in vivo*” (Pomati *et al.*, 2004), ou mesmo aumento da biomassa em peso seco (Reynolds, 2006). Em nosso estudo, *C. raciborskii* apresentou taxa de crescimento entre 0,12 a 0,30 μ .dia⁻¹ ou 0,18 a 0,40 divisões.dia⁻¹ sob 40 e 150 μE , (foto período de 12h) baseado no número de células.mL⁻¹. Portanto, nossos valores estão menores que os da literatura para a espécie, se considerarmos válida a comparação entre metodologias distintas.

Os exemplos supracitados são apenas alguns dos muitos que poderiam ser listados aqui, que tratam o crescimento de diferentes linhagens, com variações na metodologia para determinação de taxas de crescimento celular, praticamente particular por cada autor, conforme mencionado. Está bem claro que isso dificulta qualquer conclusão sobre a adaptação de *C. raciborskii* a diferentes intensidades luminosas. A esse respeito, Reynolds (2006) considera que as determinações do crescimento, tanto em condições “*in situ*” bem como em condições controladas, estão sujeitas a alterações do número de células e da biomassa, que são distintos quando são feitas mensurações por clorofila-*a*, fluorescência ou absorvância. Essas últimas, apesar de convenientes, causam interpretações errôneas das dinâmicas de crescimento de espécie fitoplanctônicas. Nada substituiria o uso do microscópio ótico e técnicas tradicionais de amostragem e contagem de células, como a técnica de Utermöhl (1931, citado em Reynolds 2006) e hemocitômetro (Young-man, 1971, citado em Reynolds, 2006). Outra discrepância entre os estudos já citados ocorre em relação ao fotoperíodo utilizado. Recentemente, O’Brien *et al.* (2009) apresentaram um estudo sobre o efeito de adaptações prévias à luz sobre a produtividade primária de *C. raciborskii* em um ambiente australiano dominado pela espécie. Os autores demonstraram que o tempo que as células permanecem sem luz é crucial e modifica totalmente o padrão da produção primária (O’Brien *et al.*, 2009). Células com uma história de submissão prévia a altas intensidades luminosas apresentaram alta produtividade. Porém, maior produtividade foi observada quando as células passaram por um prévio período escuro e posterior submissão a intensidades luminosas moderadas (O’Brien *et al.*, 2009). Portanto, o fotoperíodo pode influenciar na taxa de crescimento de

C. raciborskii. Conforme afirmado por Reynolds (2006), para várias espécies do fitoplâncton, uma alternância de 12:12h (L:E) deve determinar que em não mais que 36h as células completem sua divisão (tempo de geração) e mudanças nessas proporções entre períodos luminosos e escuros gerariam mudanças no tempo de geração. Porém, a escolha do fotoperíodo nos diversos estudos, em geral se baseia nas condições de onde as linhagens foram isoladas. É evidente que o uso de diferentes fotoperíodos para o crescimento de diferentes linhagens da espécie dificulta a comparação do nosso estudo com os já citados. No entanto, sendo a linhagem T3 cultivada por nosso grupo há mais de dez anos, podemos afirmar que as taxas de crescimento encontrada neste estudo (menores que os de outros estudos) são comuns a esta linhagem nas condições em que é mantida.

Entender a influência da luz sobre a produção de saxitoxinas por *C. raciborskii* também esteve entre um dos objetivos dessa tese (capítulo primeiro). As maiores intensidades luminosas 100 e 150 μE , apesar de não alterarem o crescimento celular da linhagem, mostraram um importante efeito sobre a produção de STXs na fase estacionária de crescimento. Nessa fase, as culturas atingem um número de células compatível com uma floração e a maior intensidade luminosa gerou a diminuição da produção de STXs por células. Não foram encontrados na literatura estudos anteriores sobre o efeito da luz sobre a produção de STXs por *C. raciborskii*, sendo este, portanto, o primeiro relato. Como discutido no primeiro capítulo, há indicações de que a síntese de saxitoxina possa ser controlada pela luz, com uma intensidade luminosa ótima para a síntese em torno de 100 μE (Carneiro *et al.*, 2009). Apesar de estudos sobre a síntese de saxitoxinas “*in vitro*” (Kellman e Neilan, 2007) e sobre os

genes para produção de STXs terem sido publicados recentemente (Kellman *et al.*, 2008a), não há dados que permitam confirmar o observado no nosso estudo. Há de se ressaltar que as intensidades luminosas testadas estão dentre as normalmente descritas como ótimas para o crescimento de *C. raciborskii*, tanto no ambiente como no laboratório, que foram definidas entre 80 e 200 μE em mensurações de crescimento bastante parecidas com as usadas nesse estudo (Padisák, 1997; Shafik, 2001).

Como já referido, é interessante notar que no ambiente se observou a ocorrência de populações em baixas luminosidades em decorrência do seu posicionamento em maiores profundidades (Delazari-Barroso, 2007; Soares, 2008). Esses dados ilustram a capacidade desta cianobactéria de migrar na coluna d'água controlando seu posicionando em relação à luz, durante o dia. Como dito anteriormente, no ambiente *C. raciborskii* aumenta sua produtividade em luz moderada (equivalente a maiores profundidades) após ser submetida a um período de escuro, mais do que quando submetida somente à luz alta (O'Brien *et al.*, 2009). Esses dados corroboram o fato de que esta espécie é adaptada a baixas intensidades luminosas e essa adaptação é morfofisiológica, uma vez que a capacidade de migração é decorrente do metabolismo de carboidratos e da presença de aerótopos nas células (Reynolds, 2006).

Em condições de cultivo, numa situação semelhante à de floração, onde a população já está estabelecida no ambiente (fase estacionária de crescimento), constatamos que a produção de STXs obedece a um ritmo circadiano. O ritmo circadiano de produção de saxitoxinas condiz com o fato da produtividade primária da espécie ser maior nas primeiras horas do dia e

diminuir à tarde (O'Brien *et al.*, 2009). Também, em uma situação de simulação de variações da qualidade da luz incidente, verificamos em nosso estudo que células submetidas à luz vermelha ou azul durante 12h não diferenciaram a produção de STXs ao longo de 24 h, quando comparadas a células sob luz branca. Por outro lado, uma exposição prolongada a esses comprimentos de onda (equivalente à permanência de populações da espécie em profundidades maiores, sem migração) parece induzir a uma desorganização do metabolismo das células, evidenciada pela perda do ritmo circadiano de produção das STXs após 12h (Capítulo primeiro). Todavia, não se sabe ao certo se as populações de *C. raciborskii* migram durante o dia ou se permanecem em altas profundidades. Sendo assim, o significado ecológico da perda do ritmo circadiano, após a exposição prolongada à luz azul ou vermelha permanece desconhecido e requer maiores investigações.

Outro fato ecológico importante deve ser levantado. As STXs afetam a mobilidade de organismos zooplancctônicos, provavelmente por bloqueio dos canais de sódio em células desses animais (Ferrão-filho *et al.*, 2008). A ocorrência de um ritmo circadiano de produção como pico ao meio do dia poderia proporcionar para a espécie uma vantagem competitiva ao evitar a predação nesse período em que há uma maior oferta de luz. Porém, não há dados na literatura que embasem essa suspeita e mais investigações nesse sentido são necessárias.

Outro objetivo da tese foi entender o possível efeito da condutividade, salinidade ou dureza da água (termos muitas vezes usados como sinônimos na literatura) sobre a o crescimento e a produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*. É usual a salinidade ser calculada no ambiente a partir da condutividade da

água ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), ou seja, sua capacidade de conduzir eletricidade, ditada principalmente pela composição iônica. Outra medida bastante utilizada é a determinação da dureza da água pela concentração de CaCO_3 (APHA, 1995). Todas essas maneiras tradicionais de mensurar a salinidade não discriminam os íons presentes no momento das determinações. Entretanto, os estudos já publicados sobre o efeito da salinidade sobre o crescimento ou produção de STXs por *C. raciborskii* foram baseados na adição de NaCl aos meios de cultivo (Briand *et al.*, 2002; Moisander *et al.*, 2002; Pomati *et al.*, 2004; Dufour *et al.*, 2006). Em nossas observações foi possível constatar que o uso de diferentes sais para aumentar a condutividade do meio, gera efeitos diretos sobre o crescimento e produção de STXs por *C. raciborskii* T3, mostrando que a dureza da água é uma variável ambiental importante na dinâmica da ocorrência de *C. raciborskii* em alguns mananciais brasileiros (capítulo segundo).

Verifica-se que geralmente não é comum a determinação da composição iônica de um corpo d'água. Apenas trabalhos recentes se dedicaram a verificar a concentração de íons carbonato (CO_3^{2-}) e bicarbonato (HCO_3^-) dissolvidos na água (Fonseca e Bicudo, 2008; Crossetti e Bicudo 2008; Chellappa *et al.*, 2008a e b, Costa *et al.*, 2009). No presente estudo, investigamos a relação entre crescimento celular de *C. raciborskii* e produção de saxitoxinas e as concentrações dos íons (CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) testados. Os efeitos observados parecem estar estreitamente relacionados com a qualidade da água de alguns mananciais (águas duras) onde florações neurotóxicas ocorreram, já que em geral o aumento da condutividade e salinidade favorece o crescimento e a produção de toxinas pela linhagem estudada.

Como já descrito na literatura, o cátion Na^+ é capaz de estimular a síntese de STX, de forma dose-dependente (Pomati *et al.*, 2004). Em nosso estudo observamos o mesmo, mas ainda que o estímulo da síntese de STXs por *C. raciborskii* é dose-dependente também em relação ao Mg^{2+} . Por outro lado, o Ca^{2+} em concentrações comuns às encontradas nos ambientes brasileiros com florações da espécie, inibiu o metabolismo global de *C. raciborskii*. Florações da espécie foram citadas em época de chuva, quando aumentou a condutividade e a concentração de CaCO_3 na água de seis reservatórios, chegando a mais de 40 mM (Costa *et al.*, 2006 e 2009). Parece que nessa última condição, a dureza da água seria mais importante do que o cátion em si, pela insolubilidade deste sal. Nessas condições, de acordo com o observado no nosso estudo, apesar do crescimento celular ser inibido, pode estar ocorrendo um grande aumento da toxicidade de *C. raciborskii*, já que a produção de saxitoxinas aumentou após doze dias de exposição a CaCO_3 em células em fase estacionária (668,65%), em relação ao sexto dia de exposição, em uma condição em que o número de células. mL^{-1} é compatível ao de uma floração. Em suma, os dados encontrados neste estudo para o efeito da concentração iônica sobre o crescimento e produção de saxitoxinas mostram que há mais na dinâmica da ocorrência de florações, além da relação N:P.

Como já mencionado, investigações sobre a ecofisiologia de algumas cianobactérias são escassas. Uma abordagem valiosa nesse sentido é a análise de proteínas, como realizada de forma preliminar nesse estudo (capítulo terceiro). Conseguimos estabelecer uma metodologia de purificação de proteínas solúveis para análise proteômica de *C. raciborskii* e avaliar o efeito do íon cálcio sobre a síntese de proteínas. Em busca na literatura não

encontramos nenhum trabalho publicado com análise proteômica de *C. raciborskii*. A busca em banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), em julho de 2009, revelou que há duzentos e cinquenta e seis sequências protéicas de *C. raciborskii* depositadas, sendo trinta e nove sequências protéicas de *C. raciborskii* (linhagem T3), relativas a genes responsáveis pela produção de saxitoxinas, depositadas por Kellman *et al.* (2008 a e b). Adicionalmente, o total de proteínas depositadas até o momento para *C. raciborskii* ainda parece ser muito pequeno em relação a todas as possíveis proteínas que podem ser expressas pela cianobactéria. Dessa forma, estudos de proteomas podem se tornar uma importante ferramenta na busca por respostas a questões fundamentais sobre a fisiologia não de só de *C. raciborskii*, mas também de outras cianobactérias. Dentre essas questões, estaria a identificação de proteínas envolvidas na síntese ou controle da produção de cianotoxinas. Esses estudos devem buscar ampliar o entendimento do efeito de diferentes variáveis ambientais, como íons ou intensidade luminosa sobre a síntese de toxinas. Adicionalmente é necessário detalhar medidas mais precisas dessas variáveis no ambiente. A introdução de uma rotina de determinações dessas variáveis em avaliações limnológicas de corpos d'água dominados por cianobactérias pode auxiliar o entendimento de cenários ambientais complexos e que possam ser estudados também no laboratório.

6 – CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

(i) quanto ao efeito das variáveis testadas sobre o crescimento celular de *C. raciborskii* T3:

1. O crescimento é favorecido em intensidades luminosas até 150 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.
2. O crescimento é afetado pelo aumento da salinidade e condutividade (dureza) da água. A presença de MgCO_3 e Na_2CO_3 estimula o crescimento enquanto que a presença de CaCO_3 o inibe. A presença de Mg^{2+} e o Na^+ até 10 mM estimula o crescimento, enquanto que Ca^{2+} 10 mM o inibe.

(ii) Quanto ao efeito das variáveis testadas sobre a síntese de saxitoxinas por *C. raciborskii* T3:

1. A síntese de saxitoxinas é maior na fase estacionária do crescimento do que na fase exponencial.
2. A síntese de saxitoxinas é maior na intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, intermediária na intensidade de 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e menor na intensidade de 150 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.
3. A síntese de saxitoxinas obedece a um ritmo circadiano de produção, com período de 24h.

4. A exposição a comprimentos de onda da luz visível na faixa do azul e do vermelho ocasionam a perda do ritmo circadiano de produção de saxitoxinas.
5. A síntese de saxitoxinas está relacionada positivamente com o aumento da condutividade e salinidade da água.
6. A presença de sais de carbonato é capaz tanto de inibir quanto de estimular a síntese de saxitoxinas por células de *C. raciborskii* T3.
7. A presença de cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ podem estimular a síntese de saxitoxinas.
8. A síntese de saxitoxina é inibida por Ca^{2+} 10 mM, após uma exposição de 12 dias, devido à inibição do metabolismo basal de *C. raciborskii* T3.

7 - PERSPECTIVAS

A maioria das respostas encontradas nessa tese para uma linhagem de *C. raciborskii* ainda não tem precedentes na literatura. Sendo assim, esses dados são ainda preliminares e limitam extrapolações sobre a produção de STXs pela espécie como um todo, nos variados ambientes que ocupa. Devemos considerar ainda que várias linhagens possam produzir diferentes variantes de STX e que sua síntese apenas começou a ser elucidada (Kellman e Neilan, 2007; Kellman *et al.*, 2008). Ainda não se sabe como essa cianobactéria controla a síntese das diferentes variantes de STX. Em suma, contribuímos para ampliar o conhecimento sobre a fisiologia de *C. raciborskii*, mais especificamente sobre uma linhagem produtora de STXs, até o presente, aspecto exclusivo de linhagens brasileiras. Chegamos, então, ao final do estudo como era de se esperar, com mais perguntas pendentes que precisarão ser respondidas e deverão ser conduzidas em experimentações futuras:

- (i) Todas as variantes de saxitoxinas em diferentes linhagens de *C. raciborskii* apresentam um ritmo circadiano de produção?
- (ii) Em caso positivo, que tipo de sistema vem a ser o relógio biológico da espécie, seria similar ao observado em outras cianobactérias?
- (iii) O entendimento do tempo é mediado por sinalizadores celulares do tipo *quorum sensing*¹, expressos diferencialmente nos horários de máximo ou mínimo de produção?
- (iv) O zooplâncton é afetado pelo pico de produção de STXs ao longo do dia?
- (vi) Que tipo de mecanismos celulares atua nas controle das concentrações intracelulares de íons?;

(vii) Os efeitos de luz e íons observados são 'sentidos externamente' e traduzidos internamente na forma de mudança do metabolismo por outras proteínas-transmembrana não envolvidas necessariamente com o transporte dos íons? Quem seriam estas proteínas?

(viii) A diferença na concentração intracelular dos diferentes íons promoveria diferentes respostas metabólicas? De que tipo?

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, A., Louzão, M.C., Vieytes, M.R., Botana, L. M. (1994). Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples. *Toxicon*, **32** (12), 1593-1598.
- Allakhverdiev, S.I., Murata, N. (2008). Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, **98**, 529-539.
- Andersen, J.S., Mann, M. (2000). Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS letters*, **480**, 25-31.
- Andersen, R.A. (ed.) (2005). *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press, USA. 578p.
- Anderson, N.G. e Anderson, N.L. (1996). Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, **17**, 443-453.
- Anderson, D.C., Campbell, e.L., Meeks, J.C. (2006). A soluble 3D Lc/Ms?ms proteome of the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Journal of Proteome Research*, **5**(11), 3096-3104..
- American Public Health Association (APHA) (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.
- Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R., Cox, P.A. (2007). Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium. *Marine Drugs*, **5**(4), 180-196.
- Bhadauriya, P, Gupta, R., Singh, S., Bisen, P.S. (2007). Physiological and Biochemical Alterations in a Diazotrophic Cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Under NaCl Stress. *Current Microbiology* **55**, 334-338.
- Bittencourt-Oliveira, M.C, Kujbida, P., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Moura, A. N., Colepicolo, P., Pinto, E. (2004). A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komarék *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**, 687-694.
- Boczar, B.A., Beitler, M.K., Liston, J., Sullivan, J.J., Cattolico, R.A. (1988). Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant Physiology*, **88**, 1285-1290.
- Borics, G., Grigorszky, I. Szabo, S. Padisák, J. (2000). Phytoplankton associations in a small hypertrophic fishpond in East Hungary during a change from bottom-up to top-down control. *Hydrobiologia*, **424** (1-3), 79-90.
- Bouvy, M., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M., Moura, A., (2000). Ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology*, **23**, 13-27

- Bouvy, M., Molica, R.J.R., De oliveira, S., Marinho, M., Becker, B. (1999). Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 285-297
- Bouvy, M., Nascimento, S.M., Molica, R.J.R., Ferreira, A., Huszar, V., Azevedo, S.M.F.O. (2003). Limnological features in Tapucurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. *Hydrobiologia*, **493**, 115-130.
- Boyer, G.L., Sullivan, J.J., Andersen, R.J., Harrison, P.J., Taylor, F.J.R. (1987). Effects of nutrient limitation on toxin production in *Protophycolax tamarensis*. *Marine Biology*, **96**, 123-128.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J-F., Beranrd, C. and Dufour, P. (2004). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming?. *Journal of Phycology*, **40**, 231-238.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quilbier-Llobéras, C., Humbert, J. F., Couté, A., Bernard, C. (2002). Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research*, **36**, 3183-3192.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A.M., Cohen-Bazire, G. (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, **123**, 113–127.
- Carmichael, W. W. (1992). *A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins*. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati. 141p.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., Na, 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** (7), 663-668.
- Carneiro, R.L., dos Santos, M.E.V., Pacheco, A.B.F. and Azevedo, S.M.F.O. (2009). Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Journal of Plankton Research*, **31**(5), 481- 488.
- Castenholz, R.W. (1973). Ecology of blue-green algae in hot springs. Oxford: Blackwell Scientific Publications. United Kingdom. 656p.
- Celis, J.E., Kruhoffer, M., Gromova, I., Frederiksen, C., Ostergaard, M., Thykjaer, T., Gromov, P., Yu, J., Palsdottir, H., Magnusson, N., Orntoft, T.F. (2000). Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS letters*, **480** (1), 2-16.

Chapman, A.D., Schelske, C.L. (1997). Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. *Journal of Phycology*, **33**, 191-195.

Chellapa, N.T., Chellapa, S. L., Chellapa, S. (2008a). Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of northeast Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51(4)**, 833-841

Chellappa, N.T., Borba, J.M., Rocha, O. (2008b). Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **68(3)**, 477-494.

Chellappa, N.T., Costa, M.A.M. (2003). Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica*, **24**, S3-S10.

Chew, A.G.M., Bryant, D. A. (2007). Chlorophyll Biosynthesis in Bacteria: The Origins of Structural and Functional Diversity. *Annual Review of Microbiology*, **61**, 113-129.

Chorus, I., Bartram, J. (eds.) (1999). *Toxic Cyanobacteria in water*. A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London, 416p.

Christoffersen, G.M. (1996). Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* **35**, 42-50.

Codd, G.A. (2000). Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecological Engineering*. **16**, 51-62.

Costa I.A.S., Cunha, S.R.S., Panosso, R., Araújo, M.F.F., Melo, J.L.S., Eskinazi-Sant'Anna, E.M. (2009). Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos so semi-árido do Rio Grande do Norte. *Oecologia Brasiliensis*, **13(2)**, 382-401.

Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O, Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., Chellapa, N.T. (2006). Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology*, **66(1B)**, 211-219.

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, 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 beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academic Science USA*, **102**, 5074–5078.

Crosseti, L.O, Bicudo, C.E.M. (2008). Adptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrphic reservoir, Garças reservoir, Over 8 years. *Hydrobiologia*, **614**, 91-105.

Delazari-Barroso, A. (2007). *Fatores controladores do desenvolvimento do fitoplâncton em um reservatório de abastecimento público no Espírito Santo, com ênfase em cianobactérias*. Tese de Doutorado. Programa de Biofísica

Ambiental. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Dias, E., Pereira, P., Franca, S. (2002). Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, **38**, 705 – 712.

Dismukes, G.C., Klimov, V.V., Baranov, S.V., Kozlov, Y.N., DasGupta, J., Tyryshkin, A. (2001). The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *The proceedings of the national Academy of Sciences Online*, USA, 98, 2170-2175.

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

Dokulil, M.T., Mayer, J., (1996). Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* – *Limnithrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Austria. *Algological Studies*, **83**, 179-195.

Dominguez, D. C. (2004). Calcium signaling in bacteria. *Molecular Microbiology*, **54**(2), 291-297.

Dufour, P., Sarazin, G., Quiblier, C., Sane, S., Lebouranger, C. (2006). Cascading nutrient limitation of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Sahelian lake (North Senegal). *Aquatic Microbial Ecology*, **44**, 219-230

Dyble, J., Paerl, H.W., Neilan, B.A. (2002). Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (5), 2567-2571.

Ehling-Schulz M, Schulz S, Wait R, Görg A, Scherer S. (2002). The UV-B stimulon of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* comprises early shock proteins and late acclimation proteins. *Molecular Microbiology*, **46**(3), 827-43.

Etheridge, S.M. Roesler, C.S. (2005). Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy. *Deep-Sea Research II*, **52**, 2491-2500.

Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I. (2003). Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon*, **42**, 313-241.

Ferrão-Filho, A.S., Costa, S.M., Ribeiro, M.G.L., Azevedo, S.M.F.O. (2008). Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*

(Cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*, **23**, 161-168.

Ferrão-Filho, A.S., Suzuki, B.K, Azevedo, S.M.F.O. (2002). Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology*, **59**, 201-208.

Figueiredo, C.C., Giani, A., Bird, D.F. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geography expansion?. *Journal of Phycology*, **43**, 256-265.

Fleming, J.J., Dubois, J. (2006). A synthesis of (+)-Saxitoxin. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 3926-3927.

Fogg, G.E., Thake, B. (1987). *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p.

Fonseca, B.M., Bicudo, C.E.M. (2008). Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garças Pond, Brazil). *Hydrobiologia*, **600**, 267-282

Fundação Nacional de Saúde – FUNASA (2003). *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Brasília, Ministério da Saúde, Brasil. 51p.

Fulda, S., Mikkat, S., Huang, F., Huckauf J., Marin, K., Norling, B., Hagemann, M. (2006). Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics*, **6**(9):2733-45.

Gao, Y., Xiong, W., Li XB, Gao, C.F., Zhang, Y.L., Li, H., Wu, Q.Y. (2009). Identification of the proteomic changes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 following prolonged UV-B irradiation. *Journal of Experimental Botany*, **60**(4), 1141-1154.

GE-Healthcare (2000). GeneBio, Swiss-Institute-of-Bioinformatics, ImageMaster 2D Platinum Software version 5.0, User manual, GE Healthcare.

Golden, S.S., Canales, S.R. (2003). Cyanobacterial circadian clocks: Timing is everything. *Nature Reviews Microbiology*, **1**, 191-199.

Golden, S.S., Ishiura, M., Johnson, C.H., Kondo, T. (1997). Cyanobacterial circadian rhythms. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 327-354.

Gomes, A.M.A., Marinho, M.M., Azevedo, S.M.F.O. (2007). In: *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Rio de Janeiro, Brazil, p.10.

Gorhan, P. , Maclachlav, J R., Hammer, V.T., Kim, W.K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie*, **15**, 796-804.

- Graves, P.R., Haystead, T.A.J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**(1), 39-63.
- Griffiths, D.J., Saker, M.L. (2003). The palm island mystery disease 20 years on: a review or research on the cyanotoxins cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, **18**(2), 78-93.
- Gugger, M., Molica, R.J.R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., Humbert, J-F (2005). Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(2), 1097-1100.
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Roberg, K., Skulberg, R., Beck, M., Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*, **7**, 692-701.
- Hamilton, P.B., Ley L. , Dean, S., Pick, F.R. (2005). The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycologia*, **44**(1),17-25.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2001). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, **290**, 2110-2113.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T. C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R. (1985). Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied Environmental Microbiology*, **50**, 1292-1295.
- Henry, R. (ed.) (1999). *Ecologia de Reservatórios: Estrutura, Função e Aspectos Sociais*. Fundibio: FAPESP, 799p.
- Hindák F., Moustaka M. (1988). Planktic cyanophytes of lake Volvi. Greece. *Archives für Hydrobiologie Supplies, Algological Studies*, **80** (50-53), 497-528.
- Hoeger, S.J., Shaw, G., Hitzfeld, C., Dietrich, D.R., (2004). Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon*, **43**, 639-649.
- Hong, Y., Steinman, A., Biddanda, B., Rediske, R., Fahnenstiel, G. (2006). Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. *Journal of Great Lakes Research*, **32**, 645-652.
- Hudnell, H.K. (ed.) (2008). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of science and research needs*. Advances in Experimental Medicine and Biology, v.619, Springer, USA, 950p.

Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S. (1999). Cinco décadas de estudos sobre ecologia do fitoplâncton no Brasil. In: Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Limnologia. *Limnotemas*, **2**, 1-22

Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S., Marinho, M., Domingos, P., Sant'Anna, C.L. (2000). Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian Waters. *Hydrobiologia*, **424**, 67–77.

Iwasaki, H., Kondo, T. (2004). Circadian timing mechanism in prokaryotic clock system of cyanobacteria. *Journal of Biological Rhythms*, **19** (5), 436-444.

Jones, G.J., Negri, A.P., (1997). Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research*, **31**(3), 525-533.

Jones, H.E., Holland, I.B., Baker, H.L., Champbell, A.K. (1999). Slow changes in cytosolic free Ca^{2+} in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in intracellular calcium. *Cell Calcium*, **25**, 265-274.

Jungblut, A-D., Neilan, B.A. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of microbiology*, **185** (2), 107-114.

Kaebnick, M., Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigation of cyanotoxin production. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, **35**, 1-9.

Kaebnick, M.K., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(8), 3387-3392.

Katircioglu, H., Akin, B.S., Atici, T. (2004). Microalgal toxins: characteristics and importance. *African Journal of Biotechnology*, **3**, 667-664.

Kellman, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neila, B.A. (2008a). Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(13), 4044-4053.

Kellman, R. Michali, T.K., Neilan, B.A. (2008b). Identification of a Saxitoxin Biosynthesis Gene with a History of Frequent Horizontal Gene Transfers. *Journal of Molecular Evolution*, **67**, 526–538.

Kellman, R., Neilan, B.A (2007). Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis in vitro. *Journal of Phycology*, **43**, 497-508.

Koschek, P.R. (2008). *Interação entre Monoraphidium e Microcystis em meio com matéria orgânica excretada e em cultivo misto*. Dissertação de Mestrado, Ciências Biológicas-Biofísica, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Koropatkin, N.M., Koppelaar, D.W., Pakrasi, H.B., Smith, T.J. (2007). The structure of a cyanobacterial bicarbonate transport protein, CmpA. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(4), 2606-2614.

Kurmayer, R., Gumpenberger, M. (2006). Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* e *P. agardhii*. *Molecular Ecology*, **15**, 3849-3861.

Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, 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.

Lee, B.D., Apel, A.W., Walton, M.R. (2006). Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresource Technology*, **97**, 2427-2434.

Leganés, F., Forchhammer, K, Fernández-Piñas, F. (2009). Role of calcium in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to nitrogen starvation. *Microbiology*, **155**, 25-34.

Lehane, L. (2000). *Paralytic shellfish poisoning: A review*. National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry – Australia.

Lery, L.M.S. (2007). *Análise proteômica da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*: estabelecimento de um banco proteômico, análise diferencial e implicações na anotação do genoma*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Lim, P-T, Leaw, C-P, Usup, G., Kobiyama, A., Koike, K., Ogata, T. (2006). Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, **42**, 786-799.

Long, B.M., Jones, G.J., Orr, P.T. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 278-283.

Lorne, J., Scheffer, J., Lee, A., Painter, M., Miao, V.P.W. (2000). Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, **189**, 129-133.

Magalhães, V. F., Soares, R. M., Azevedo, S.M.F.O. (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* **39**, 1077-1085.

Magalhães, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C.P., Costa, S.M., Azevedo, L.O., AZEVEDO, S.M.F.O. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brazil, RJ). *Toxicon*, **42**, 289-295.

Maia, C.E., Morais, E.R.C., Oliveira, M. (2001). Estimativa de carbonato de cálcio aplicado via água de irrigação nas regiões da Chapada do Apodi e Baixo Açu, RN. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e ambiental*, **5**(1), 71-75.

Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C. (2005). Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, **245**, 229-306.

McClung, C.R. (2001). Circadian rhythms in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 139-162.

McGregor, G.B., Fabbro, L.D. 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokariota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, **5**, 195-205.

Michiels, J. Chuanwu, X., Verhaert, J., Vanderleyden, J. 2002. The functions of Ca²⁺ in bacteria: a role of EF-hand proteins? *TRENDS in Microbiology*, **10** (2), 87-93

Mihalcescu, I., Hsing, W., Leibler, S. (2004). Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria. *Nature*, **430**, 81-85.

Mihali, T.K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K.D., Neilan, B.A. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Applied Environmental Microbiology*, **74**, 716-722.

Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Arai, T. (1986). Strategy by which nitrogen fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, **323**, 720-722.

Mohamed, Z.A (2007). First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology*, **59**, 749-761.

Moisander, P.H., McClinton III, E., Paerl, H.W. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecology*, **43**, 432-442.

Molica, R. J. R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Merguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S. M. F. O., Lagos, N. (2002). Toxins in freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, **41**, 606-611.

Molica, R.J.R. (2003). Contribuição ao conhecimento da ecologia, toxicologia e filogenia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cianobactéria). Tese de doutorado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.P.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O. (2005). Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*, **4**, 743-753.

Moore, D., O'Donohue, M., Granett, C., Critchley, C., Shaw, G. (2005). Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). *Freshwater Biology*, **50**, 345-352.

Morais, E.R.C., Maia, C.E., Oliveira, M. (1998). Qualidade da água para irrigação em amostras analíticas do banco de dados do departamento de solos e geologia da escola superior de agricultura de Mossoró, Mossoró-RN. *Caatinga*, **11** (1/2), 75-83.

Moreira, A. A., Bizi, R. (2007). Analysis of cylindrospermopsin in water with liquid chromatography –mass spectrometry (LC-MS/MS). In: *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Rio de Janeiro, Brazil, p.10.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA (2004a) A Mechanism for Slow Release of Biomagnified Cyanobacterial Neurotoxins and Neurodegenerative Disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 12228–12231.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW (2004b) Occurrence of Beta–Methylamino–L–Alanine (BMAA) in AIs/Pdc Patients From Guam. *Acta Neurologica Scandinavica*, **110**, 267–269.

Nazarenko, L.V., Andreev, I.M., LyukevichPisareva, A.A., T.V., Los, D.A. 2003. Calcium release from *Synechocystis* cells induced by depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca²⁺ channel. *Microbiology*, **149**, 1147-11-53.

Negri, A.P., Jones, G.J., Blackburn, S.I., Oshima, Y., Onodera, H. (1997). Effect of culture and bloom development of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Journal of Phycology*, **33**, 26-35.

Negri, A.P., Jones, G.J., Hindmarsh, M. (1995). Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisoning toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon*, **33**, 1321-1329.

Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Töröknés, A., Burns, B.P. (2003). Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology*, **12**, 133-140

Nelson, D.L., Cox, M.M. (eds) (2002). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third edition (translated to Portuguese), São Paulo, Sarvier.

O'Brien, K.R., Burford, M.A., Brookes, J.D. (2009). Effects of light history on primary productivity in a phytoplankton community dominated by the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Freshwater Biology*, **54**, 272-282.

Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992). Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 7941-7942.

Omata, (1999).

Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC International*, **78**, 528-532.

Ow SY, Cardona T, Taton A, Magnuson A, Lindblad P, Stensjö K, Wright PC. (2008). Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from *Nostoc* sp. PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags. *Journal of Proteome Research*, **7**(4), 1615-28.

Padisák, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv fur Hydrobiologie*, **107**, 563-593.

Paerl, H.W. (1988). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnology Oceanography* **33**(4): 823-847.

Paerl, H.W., Millie, .F.. (1996). Physiological ecology of toxic cyanobacteria. *Phycologia* **35**(6):160-167.

Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H., Dyble, J. (2001). Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria . *The Scientific World* **1**, 76-113.

Paiva, A.S., Medeiros, J.F., Silva, M.C.C., Alves, L.P., Sarmiento, D.H.A., Silva-Junior, M.J. (2004). Salinidade e reação do solo numa área cultivadas com melão sob mulch e irrigado com água de diferentes níveis de sais. *Caatinga*, **17**(1), 57-63.

Panosso, R., Costa, I.A.S., Souza, N.R., Attayde, J.L., Cunha, S.R.S., Gomes, F.C.F. (2007). Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecologia Brasiliensis*, **11**(3), 433-449.

Parkhill. J.P., Cembella, A.D. (1999). Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *Journal of Plankton Research*, **21**, 939-955.

Pedrosa, P., Calazans, C.V.C., Rezende, C.E. (1999). Particulate and dissolved phases as indicators of limnological and ecophysiological spatial variation in Cima Lake system, Brazil: a case of study. *Hydrobiologia*, **411**, 89-101.

Pomati, F., Rosseti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A. (2004). Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* **150**, 455-461.

Ragelis, E.P. (ed.) (1984). *Seafood toxins*. ACS Symposium Series 262. America chemical Society, Washington, DC.

Rajahlati, T., Huang, F., Klement, M.R., Pisareva T., Edman, M., Sjöström, M, Wieslander, A., Norling, B. (2007). Proteins in different *Synechocystis* compartments have distinguishing N-terminal features: a combined proteomics and multivariate sequence analysis. *Journal of Proteome Research*, **6**(7), 2420-2434.

Rantala, A., Fewer, D.P., Hisburgues, M., Rouhianen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K.. (2003). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *PNAS (Proceedings of the national Academy Of Sciences of the USA)*, **101**(2), 568-573.

Reynolds, C.S. (ed.) (2006). *Ecology of Phytoplankton: Ecology, Biodiversity and Conservation*. Cambridge University Press, New York, USA. 535p.

Rocha, M.I.A. (2007). *Estudo da variação sazonal do fitoplâncton e zooplâncton e da concentração de microcistinas nesses dois níveis tróficos no Reservatório do Funil (Resende-RJ)*. Dissertação de Mestrado. Programa de Biofísica Ambiental. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Saker, M.L., Neilan, B.A. (2001). Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1839-1845.

Saker, M.L., Nogueira, I.R., Vasconcelos, V.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G. K. and Pereira, P. (2003). First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 243-250.

Santos, M.E.V. (2009). Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de *Microcystis* sp. Dissertação de mestrado – Ciências Biológicas - Biofísica - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Sambrook, J., Russell, D.W. (eds) (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual* 3rd ed. -- New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sant' Anna, C.L, Azevedo, M.T. de P., Agujaro, L.F., Carvalho, M.C., Carvalho, L.R., Souza, R.C.R. (2006). Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Editora Interciência - Rio de Janeiro. 1-15 pp.

Sazuka, T., Ohara, O. (1997). Towards a proteome project of cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803: linking 130 protein spots with their respective genes. *Electrophoresis*, **18**(8),1252-1258.

Shafik, H. M. (2003). Morphological characteristics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynka) Seenaya et Subba Raju in laboratory cultures. *Acta Biologica Hungarica*, **54** (1), 121-136.

Shafik, H. M., Herodek, S., Presing, M., Voros, L. (2001). Factors affecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju. *Archiv fuer Hydrobiologie, Algological Studies*, **140**(1/4), 75-93.

Shapiro, J. (1990). Currents briefs regarding dominance by blue-greens: the case of the importance of CO₂ and pH. *Verhandlungen des Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **24**, 38-54.

Shimizu, Y. (1993). Microalgal Metabolites. *Chemical Reviews*, **93**, 1885-1698.

Silva, R.C. (2008). *Acúmulo e Depuração de Cylindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (Oreochromis niloticus)*. Dissertação Mestrado. Programa de Biofísica Ambiental. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, **280**, 5-20.

Soares, M.C.S. (2008). *Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: uma batalha pelágica*. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica, Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Roland, F. (2007). Phytoplankton dynamics in two tropical Rivers with different degrees of human impact (Southeast Brazil). *River Research and Applications*, **23**, 698-714.

Sobotka, R., Dühring, U., Komenda, J., Peter, E., Gardian, Z., Tichy, M., Grimm, B., Wilde, A. (2008). Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**(38), 25794-25802.

Souza, R.C.R., Carvalho, M.C., Truzzi, A.C. (1998). *Cylindrospermopsis raciborskii* (wołosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) Dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings reservoir, Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **13**, 73-81.

Srivastava, R., Pisareva, T., Norling, B. (2005). Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*, **5**(18), 4905-4916.

Stensjö, K., Ow, S.Y., Barrios-Llerena, M.E., Lindblad, P., Wright, P.C. (2007). An iTRAQ-based quantitative analysis to elaborate the proteomic response of *Nostoc* sp. PCC 7120 under N₂ fixing conditions. *Journal of Proteome Research*, **6**(2), 621-635.

Straskaba, M. Tundisi, J.G., Duncan, A. (eds.) (1993). *Comparative Reservoir Limnology and Water Quality Management*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers. 291p.

Stucken, K., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valde, J.J., Méndez, M.A., Vásquez, M. (2009). Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Systematic and Applied Microbiology*, **32**, 37–48.

Suzuki, L., Johnson, C.H. (2001). Algae know the time of the day: circadian and photoperiodic programs. *Journal of Phycology*, **37**, 933-942.

Sweeney, B.M. (1987). *Rhythmic phenomena in plants*. Academic Press, London, 172p.

Taroncher-Oldenburg, G., Anderson, D.M. (2005). Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding S-adenosylhomocysteine hydrolase, methinine aminopeptidase, and a histone-like protein, in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Applied and environmental Microbiology*, **66** (5), 2105-2112.

Tucci, A., Sant'Anna, C.L. (2003). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **26**(1), 97-112.

Torrecilla, I., Leganés, F., Bonilla, I. & Fernández-Piñas, F. (2000). Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria. *Plant Physiology*, **123**, 161–176.

Torrecilla, I., Leganés, F., Bonilla, I. & Fernández-Piñas, F. (2004). Light-to-dark transitions trigger a transient increase in intracellular Ca^{2+} modulated by the redox state of the photosynthetic electron transport chain in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Plant Cell and Environment*, **27**, 810–819

Waditee, R., Hossain, G.S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, T., Takabe, T. (2004). Isolation and Functional Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporters from Cyanobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 4330-4338.

Weber, B., Wessels, D.C.J., Budel, B. (1996). Biology and ecology of cryptoendolithic cyanobacteria of a sandstone outcrop in the Northern Province, South Africa. *Algological studies*, **117**, 565-579.

Whiton, B.A., Potts, M. (eds.) (2000). *The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1-45pp.

Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R., Nixdorf, B. (2007). Climate changes affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*, **153**(3), 473-48.

Wilkins, M.R., Sanchez, J-C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. (1995). Progress with proteome projects: why

all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **13**, 19-50.

Wilson, K.M., Schembri, M.A., Baker, P.D., Saint, P.C. (2000). Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(1), 332-338.

Yin, Q., Carmichael, W.W., Evans, W.R. (1997). Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *Journal of Applied Phycology*, **9**, 55-63.

Young, M.W., Kay, S.A. (2001). Time zones: comparative genetics of circadian clocks. *Nature Reviews Genetics*, **2**, 702-715.

Anexo 1

EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA E DA QUALIDADE DA LUZ SOBRE O CRESCIMENTO E O RITMO CIRCADIANO DE PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS POR *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria).

“Carneiro, RL, Santos, MEV, Pacheco, ABF, Azevedo, SMFO. Effects of Light Intensity and Light Quality on Growth and Circadian Rhythm of Saxitoxins Production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* 31(5), 481-488, 2009.”

Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria)

RONALDO LEAL GARNIERO^{1,2*}, MARIA ELISÂN GELAVENÂN CDO DOS SANTOS², ANA BEATRIZ FURLANETTO PADRIGIO² AND SANDRA MARIA FELICIANO DE OLIVEIRA KAZEVEDO²

¹LABORATORY OF CYANOBACTERIAL BIOLOGY AND TOXICOLOGY, INSTITUTE OF BIOSCIENCES CARLOS CHAGAS FILHO, HEALTH RESEARCH CENTER, FEDERAL UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, BRAZIL AND ²BIOSCIENCE UNIT, INSTITUTE OF BIOSCIENCES CARLOS CHAGAS FILHO, HEALTH RESEARCH CENTER, FEDERAL UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, BRAZIL

*Corresponding author: rleal@biof.ufrj.br

Received September 3, 2008; accepted in principle December 10, 2008; accepted for publication January 9, 2009; published online 6 February 2009

Corresponding editor: William Li

*Effects of light intensity and light quality in saxitoxin and neosaxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woronin) Sengwa and Sibba Raju (strain TX) over 12 days in batch culture conditions. Three light intensities (50, 100 and 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and three light qualities (white and blue 470 nm and red 630 nm) were used. Growth rates were higher under 100 and 150 than compared to 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (control condition). Saxitoxin (STX) and neosaxitoxin (NSTX) production showed an increase during the early stationary phase under 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12 days). High concentrations of STX and NSTX were observed in all under 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Production of these toxins showed a circadian rhythm synchronized with light/dark (L:D) cycle and also with a period of 24 h under the three light intensities tested. The circadian rhythm of STX and NSTX production under white light conditions was conferred. Red light induced the loss of circadian rhythm in NSTX production. These data demonstrate a circadian rhythm in saxitoxin production regulated by light.*

INTRODUCTION

Saxitoxin (STX) and neosaxitoxin (NSTX) are neurotoxins of the paralytic shellfish poisoning (PSP) group. The PSP name was initially proposed because these toxins are frequently associated with accidental consumption of contaminated seafood (Schantz, 1984). These toxins interfere with the function of at least three types of voltage-gated channels: neuronal sodium channels and calcium and potassium channels important for heart muscle function in mammals (Kao and Levinson, 1985; Wang *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2004; Kellmann and Nelson, 2007). Several species of marine dinoflagellates such as *Alexandrium*, *Cyrodinium* and *Pyrodinium* and species of freshwater cyanobacteria such as *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* and *Lyngbya* have been

described as saxitoxin producers (Choma and Hartman, 1999; Lehane, 2000).

Cylindrospermopsis raciborskii is widely distributed and has been frequently described as adapted to low light intensities with optimal growth in 121 and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Dokulil and Mayer, 1996) or 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Padisák, 1997; Briand *et al.*, 2004). According to Bouvy *et al.* (Bouvy *et al.*, 1999), 31 of 39 (80%) reservoirs located in North-eastern Brazil were characterized by dominance (>50%) of *C. raciborskii*. An interesting fact is that most *C. raciborskii* blooms in north-eastern Brazilian reservoirs occurred under unsteady light intensities, from 14 to 830 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 0.5 m deep (Bouvy *et al.*, 1999; Bouvy *et al.*, 2002). Some Brazilian *C. raciborskii* strains have been described

as saxitoxin producers (Lagos *et al.*, 1999; Molicca *et al.*, 2002).

Cylindrocapsa raciborikii is a filamentous cyanobacterium with gas vacuoles, able to migrate to deeper water layers (Shufik, 2003), usually during periods of high light intensity. There is a selective absorption of light in pure water. Photons with wavelengths from 400 to 480 nm (blue) are poorly captured by water molecules while wavelengths of ~ 700 nm (red) have a higher probability (around 30 times higher) of absorption (Reynolds, 2006). Considering this observation, it is reasonable to suggest that during vertical migration, *C. raciborikii* could be exposed to changes in light intensity as well as light quality. The effects of light quality on the metabolism of cyanobacteria have been described. For example, exposure to red light changed microcystin gene transcription in *Microcystis aeruginosa*, but this phenomenon was not observed when the same species was exposed to blue light (Kachernick *et al.*, 2007). However, according to a recent literature review, there is no information on the influence of light quality on saxitoxin production by *C. raciborikii*.

Light-perceiving organisms can exhibit circadian rhythms which are reflected in gene activity, metabolism, physiology and behavior (Gao *et al.*, 2007). According to Andersen (Andersen, 2005), chronobiologists define circadian rhythms as the time needed to complete one cycle of any behavior. An entrained rhythm is the rhythm to which the period is synchronized by the environmental LD (light/dark) cycles and occurs in exactly 24 h. The free-running rhythm is a rhythm that occurs in LL (light/light) cycles in which the periods oscillate from 23 to 25 h. Circadian rhythms have been reported for nitrogen fixation, photosynthesis, amino acid uptake, carbohydrate synthesis, cell division cycle and toxin production by cyanobacteria (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2004; Iwanaki and Kondo, 2004). Recently, Kellmann and Neilan (Kellmann and Neilan, 2007) reported that "in vitro" synthesis of saxitoxin is light-dependent. According to these authors, the synthesis of saxitoxin was reduced in the dark and increased in light conditions.

This report seeks to extend our knowledge of the effects of light intensity and light quality on growth and the circadian rhythm of STX and NSTX production by *C. raciborikii*.

METHOD

Strain maintenance and growth conditions

The T3 *C. raciborikii* strain was used. This strain was isolated from a toxic cyanobacterial bloom in the Bilings

reservoir in São Paulo State, Brazil (Lagos *et al.*, 1999). The strain has been maintained in the culture collection at the Laboratory of Cyanobacterial Ecophysiology and Toxicology (IBC/CF-UFRJ). Previous analysis by LC-MS showed that the T3 strain can produce STX, NSTX, decarbamoyl-STX and decarbamoyl-NSTX (data not shown). A non-toxic batch culture of this strain was maintained in ASM-1 medium (Korhan *et al.*, 1964) with aeration, at $24 \pm 2^\circ\text{C}$, with a 12 h LD cycle and photon flux of $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (provided by common day light fluorescent lamps). The light in the maintenance conditions and in all experiments was measured with a quantum sensor (QST-100 Box—Biophysical Instruments Inc.).

Growth, STX and NSTX production

A culture of the T3 strain was maintained in conditions described above until the end of the exponential phase. This culture was then sub-divided to be exposed to 50, 100 or $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over five generations. These adapted cultures were then used as inocula for growth, initiated with 5.0×10^6 cells per mL. Cells were inoculated into 3-L glass balloons (straight bottom) with 2 L of ASM-1 medium and exposed to 50, 100 or $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 12 h of LD cycle. These culture conditions were established according to the environmental conditions from which this strain was isolated. Each condition was performed in triplicate. Sampling of each experimental culture condition was done every 3 days for 15 days under sterilized conditions. A few milliliters of each culture was harvested and used to determine the length of 30 cells, measured by light microscopy using an ocular rule. Filaments lengths were measured on a Fuchs-Rosenthal hemocytometer using an ocular rule during the same period. The number of cells per milliliter was obtained from the total length of filaments measured, divided by the average cellular length. 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 and Thake (Fogg and Thake, 1987). Growth rates measurements represent an important way of expressing the relative ecological success of a species or strain in adapting to its natural environment or the experimental environment imposed upon it.

To determine STX and NSTX concentrations during the growth period, samples of 500 mL were harvested on the 6th day (exponential phase) and 12th day (early stationary phase) of cultures under $50 \mu\text{mol}$

photons $m^{-2} s^{-1}$, considered as control conditions. STX and NSTX analyses were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Oshima (Oshima, 1995).

Chromatographic conditions

Samples for saxitoxin analyses were filtered on a boresilicate filter (45 mm diameter—Millipore) and stored at $-20^{\circ}C$ until HPLC analysis, which was performed not longer than 24 h after the extraction procedure. After filtration, or if held in filters were analyzed as intracellular saxitoxins samples and media passed through filters were analyzed as extracellular saxitoxins samples. For toxin extraction from cells held on the filters, 5 ml of 500 mM acetic acid were added. Material was shaken for 2 h in a wristed shaker and then centrifuged (30 min, 10 000g). Supernatant was collected and filtered on 0.45 μm nylon filters (33 mm diameter—Millipore) and analyzed according to Oshima (Oshima, 1995). Samples of extracellular organic matter released to culture medium were lyophilized and toxin extraction was performed by the same procedure described for intracellular samples.

STX and NSTX were analyzed using a Shimadzu HPLC system with a silica-base reversed phase column (125 mm \times 4.0 mm, 5 μm , Lichrospher 100 RP 18). The chromatographic condition was mobile phase—2 mM heptanesulfonate in 30 mM ammonium phosphate and 6% acetonitrile, pH 7.1. Toxins were detected using a fluorescence detector, with excitation at 330 nm and emission at 390 nm. Toxins were identified and quantified by comparison with known retention time and integrated areas of standards. The standards were purchased from the Institute of Marine Bioscience, National Research Council of Canada (Halifax, Canada).

Effect of light intensity on STX and NSTX production

A T3 strain culture was maintained in conditions already described until the end of the exponential phase (approximately 9 days). This culture was sub-divided to be exposed to 50, 100 or 150 μmol photons $m^{-2} s^{-1}$ over the course of five generations. These adapted cultures were used as inocula for experimental tests, initiated with 5.0×10^6 cells per mL. Cells were inoculated into 3-L glass balloons (straight bottom) with 2.5 L of ASM-1 medium and exposed to 50, 100 or 150 μmol photons $m^{-2} s^{-1}$, at $24 \pm 2^{\circ}C$ and a 12 h of L:D cycle. Each condition was performed in triplicate. After 12 days (early stationary phase), samples of

100 ml were collected for STX, NSTX and cell density determinations in intervals of 2 h or 4 h for 36 h. STX and NSTX analyses were performed by HPLC and cell counting was done as previously described.

Effect of blue and red light on STX and NSTX production

A culture of the T3 strain was maintained in 100 μmol photons $m^{-2} s^{-1}$ for five generations. This adapted culture was used as an inoculum into glass containers of 13.5 L with 12 L of ASM-1 medium with an initial concentration of 5.0×10^6 cells per mL. Cells were maintained under 100 μmol photons $m^{-2} s^{-1}$ until the early stationary phase (12 days) and subsequently these cultures were sub-divided and exposed to three different qualities of light: (i) white (provided by common daylight fluorescent lamps) (ii) red (630 nm, provided by Sylvania®/color lamps, red, F-20, T-12/AQ) and (iii) blue (470 nm, provided by Sylvania®/color lamps, blue, F-20, T-12/AQ), in a 12 h L:D cycle for 36 h. Each condition was performed in triplicate. Samples of 100 ml were collected for STX, NSTX and cell density determinations at intervals of 2 h or 4 h, for 36 h. STX and NSTX analyses were performed by HPLC and cell counting was done as previously described.

Statistical analyses

Data were expressed as mean values \pm standard error (SE). Data for each experimental variable were tested for normality. Differences among standard deviations were determined using Kolmogorov-Smirnov test and Bartlett test, respectively. As these data were classified as nonparametric, ANOVA was performed using the Kruskal-Wallis (KW) test for multiple comparisons. Dunn's test was used to determine the specific differences between two treatments. For specific comparisons of saxitoxin production between two different phases of growth, the nonparametric Mann-Whitney U-test was performed. All tests were performed with significance of 95% ($P < 0.05$) using the GraphPad Instat 3.0 application.

RESULTS

Cellular growth

At all light intensities tested, the *Gyrodinium aureolum* T3 strain had an exponential growth phase around 9 days (Fig. 1). Growth rates (Table 1) at 100 and 150 μmol photons $m^{-2} s^{-1}$ were significantly

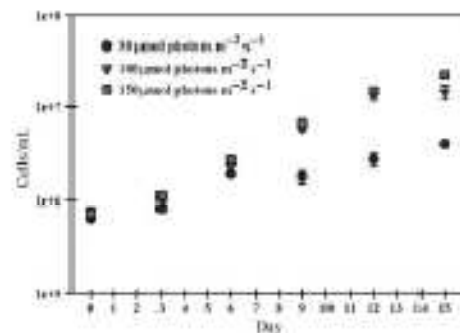


Fig. 1. Growth curves of *C. rostratum* (T3) cells exposed to three different light intensities. The error bars represent standard error ($n = 3$).

different from those observed under 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ after 6 days (Dunn test, $P < 0.01$). However, when comparing 100 and 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no difference in growth rate was detected (Dunn test, $P > 0.05$).

Effect of light intensity on STX and NSTX production

Extracellular STX and NSTX contents were not measurable because values were below the detection limit of the method used in this work. The detection limits is 0.3 ng for STX and 0.04 ng for NSTX.

Intracellular STX and NSTX contents were normalized to 10^6 cells. The production of both toxins under 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ showed a significant separation (Dunn test, $P < 0.05$) according to growth phase (Fig. 2). The intracellular NSTX content in the early stationary phase was 52 times greater than during the exponential phase (U -test, $P < 0.005$; exponential phase 6 days, mean = 0.014 ng/ 10^6 cells, early stationary phase 12 days, mean = 0.740 ng/ 10^6 cells). For STX, the difference was 5.25 times (U -test, $P < 0.05$; exponential phase = 0.002 ng/ 10^6 cells and stationary phase = 0.016 ng/ 10^6 cells).

Table 1. Growth rates of *C. rostratum* (T3) cells exposed to three different light intensities

Treatment	μ , day ⁻¹	D (days, day ⁻¹)
50 ^a	0.126 ± 0.06	0.162 ± 0.06
100 ^b	0.201 ± 0.02	0.426 ± 0.10
150 ^b	0.201 ± 0.01	0.428 ± 0.01

μ is relative growth rate and D is mean doubling time (day). Data are presented as average ± standard deviation ($n = 3$). ^aLight intensity in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

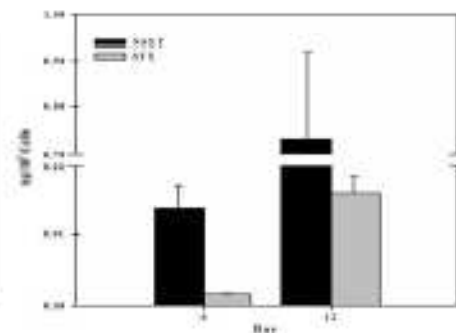


Fig. 2. Saxitoxin and neosaxitoxin variation between exponential phase (6 days) and early stationary phase (12 days). The error bars represent standard error ($n = 3$).

Production of both toxins in the stationary phase exhibited a circadian rhythm (Figs 3 and 4). The highest values determined during circadian oscillation are expressed in Table II. STX and NSTX production were significantly higher (Dunn test, $P < 0.01$) at a photon flux of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and significantly lower (Dunn test, $P < 0.001$) at a photon flux of 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ when compared to toxin production under 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The highest production of STX and NSTX occurred during the light phase with a period of exactly 24 h, in the middle of the day (Figs 3 and 4). Furthermore, the ratios (Table III) between the highest (light phase) and lowest (dark phase) concentrations of STX and NSTX were more prominent under 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ than at 100 or 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Dunn test, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively).

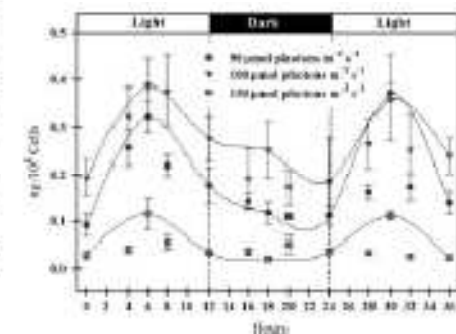


Fig. 3. Saxitoxin variation over 36 h in *C. rostratum* (T3) cells exposed to three different light intensities (50, 100 and 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The error bars represent standard error ($n = 3$).

Effect of quality of light on STX and NSTX production

We determined the effect of different light qualities on *C. naxiberkii* circadian rhythm-mediated toxin production. When cells were exposed to red or blue lights, changes in circadian rhythm were observed (Figs 5

and 6). In red light conditions, the NSTX production rhythm was lost before 12 h of exposure (Fig. 6). No changes were observed in the entrained rhythm of STX production in red light conditions (Fig. 5). In addition, the period of acrophase (maximum production) of STX and NSTX in cells under blue light conditions increased to 26 h (Fig. 5 and 6).

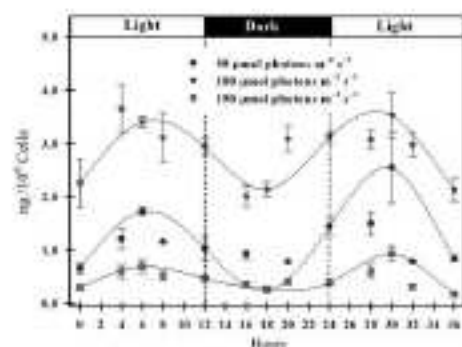


Fig. 4. Neosaxitoxin variation over 36 h in *C. naxiberkii* (T3) cells exposed to three different light intensities (50, 100 and 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The error bars represent standard error ($n=3$).

Table II: Highest concentration values of neosaxitoxin and saxitoxin production per 10^6 cells of *C. naxiberkii*

Treatment	Neosaxitoxin ^a	Saxitoxin ^b
50P	2.56 \pm 0.66	0.37 \pm 0.01
100P	2.52 \pm 0.43	0.26 \pm 0.05
150P	0.69 \pm 0.12	0.11 \pm 0.01
White	4.31 \pm 0.15	0.35 \pm 0.03
Red	4.56 \pm 0.29	0.40 \pm 0.13
Blue	4.58 \pm 0.57	0.46 \pm 0.14

The T3 strain was exposed to three light intensities and three light qualities during the stationary phase of growth. Data are presented as average concentration \pm standard deviation ($n=3$).

^aValues are expressed in $\text{ng } 10^6$ cells.

^bLight intensity in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Table III: Ratio between highest and lowest concentration of saxitoxins obtained during light and dark phases^a

Time variation ^b	Neosaxitoxin			Saxitoxin		
	50P	100P	150P	50P	100P	150P
From 6 to 0	2.70 \pm 0.90	1.65 \pm 0.66	2.43 \pm 1.02	4.47 \pm 3.06	2.05 \pm 0.22	4.29 \pm 1.75
From 6 to 18	7.13 \pm 1.54	0.05 \pm 0.11	0.92 \pm 0.44	1.47 \pm 1.100	1.160 \pm 0.02	1.35 \pm 0.15
From 30 to 18	10.02 \pm 2.02	1.64 \pm 0.29	3.22 \pm 0.65	1.43 \pm 1.55	0.712 \pm 1.56	0.40 \pm 0.17
From 30 to 36	3.03 \pm 1.57	1.65 \pm 0.08	5.49 \pm 2.24	1.40 \pm 1.204	0.49 \pm 0.14	0.67 \pm 0.07

Data are presented as average concentration \pm standard deviation ($n=3$).

^aRatio was determined by dividing the highest concentration (light phase) by the lowest concentration (dark phase) in each period.

^bLight intensity in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

^cTime variation refers to sampling time (in hours) for both toxins (Figs 4 and 5).

DISCUSSION

Cylindrocapsa naxiberkii was initially described as typical of tropical to subtropical environments (Pádelak, 1997). In the last decade, an increasing number of studies have shown that it can be considered to be a species with a worldwide distribution (Briand *et al.*, 2004). Many laboratory studies have elucidated the ecophysiology of this species (Saker and Griffiths, 2000; Hawkins *et al.*, 2001; Saker and Neilan, 2001; Briand *et al.*, 2004; Dylbe *et al.*, 2005). Although some studies have already investigated the influence of light intensity or light quality on the growth of *C. naxiberkii*, no publication examining the influence of light on saxitoxin production by this cyanobacterium was found. In Brazil, *C. naxiberkii* blooms have been reported to occur in conditions ranging from 14 to 830 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 0.5-m deep, light intensities many times higher than the 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ used as maximum light intensity in the present work (Bouvy *et al.*, 1999; Bouvy *et al.*, 2003). Briand *et al.* (Briand *et al.*, 2004) analyzed 10 toxic and non-toxic strains of *C. naxiberkii* and found maximum growth rates from 0.4 to 0.8 μday^{-1} in cultures grown under 50 to 125 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In a previous study by our group, we documented two *C. naxiberkii* cylindrocapsopain producer strains with growth rates ranging from 0.34 to 0.35 μday^{-1} under light intensities from 40 to 348 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (data not published). In this study, the maximum growth rate (0.30) was lower than those reported for other

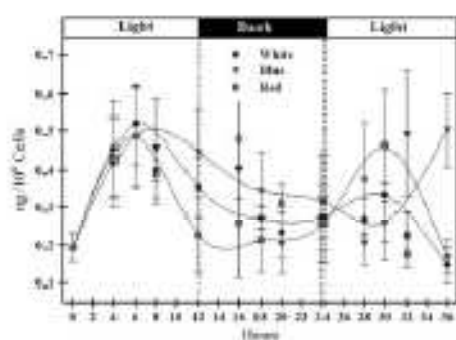


Fig. 5. Saxitoxin variation over 36 h in *C. saxitoxin* (T3) cells exposed to white, red and blue light (photon flux of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The error bars represent standard error ($n = 3$).

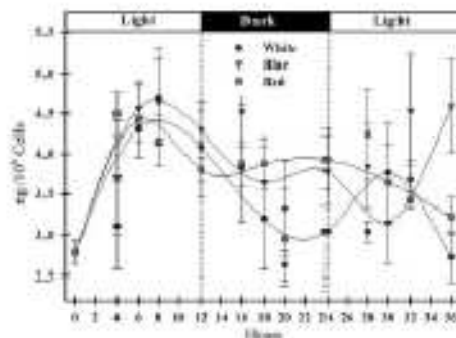


Fig. 6. Neosaxitoxin variation over 36 h in *C. saxitoxin* (T3) cells exposed to white, red and blue light (photon flux of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The error bars represent standard error ($n = 3$).

C. saxitoxin strains in batch cultures. However, after 10 years of maintenance of this T3 strain in our culture collection, we are confident that these results do not reflect limitation of these specific growth conditions but rather the typical growth rate of this strain.

Studies of the influence of light on growth and saxitoxin production are more extensive for dinoflagellates when compared with cyanobacteria species (Boyer *et al.*, 1987; Boczar *et al.*, 1988; Parkhill and Cembella, 1999; Etheridge and Roessler, 2003; Tarascher-Oldehans and Anderson, 2005; Lim *et al.*, 2006). Dinoflagellate production of saxitoxins can vary with growth phase and light intensity, but these relations are complex and contradictory. Higher concentrations of saxitoxin production have been observed during the exponential phase (Boczar *et al.*, 1988) as well as the stationary phase (Parkhill and Cembella, 1999; Lim *et al.*, 2006). For cyanobacteria, Negri *et al.* (Negri *et al.*, 1997) described the

highest total saxitoxin concentration (intracellular+extracellular) as occurring during the late stationary phase of *Anabaena ananias*. Similar results were observed by Dias *et al.* (Dias *et al.*, 2002) in *Aphanizomenon* sp. who reported that the highest saxitoxin production per cell occurs during the late stationary phase. Our results also showed an increase in intracellular STX and NSTX during the early stationary phase or at the end of the exponential phase (Fig. 2). Despite these results, saxitoxin accumulation in cyanobacteria during the stationary phase remains to be elucidated.

Some studies with dinoflagellates have related light intensity to saxitoxin production. According to Parkhill and Cembella (Parkhill and Cembella, 1999), the highest cellular toxicity was observed in light intensity around 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Etheridge and Roessler (Etheridge and Roessler, 2003) reported the highest concentrations of these toxins to be around 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Researchers have also observed a positive correlation between saxitoxin production by dinoflagellates and light intensity (Lim *et al.*, 2006). For *Lyngbya rotula* (cyanobacteria), the highest toxicity in MLU (mouse unit) was observed for cells cultured under 11 and 22 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, from a range of 1.1 to 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Yin *et al.*, 1997). In general, the highest levels of saxitoxin production were described around 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. This is in accordance with our study that determined a significant increase of intracellular STX and NSTX content at the same light intensity (Figs 4 and 5).

In a recent work describing "in vitro" biosynthesis of saxitoxin performed by Kellmann and Neilan (Kellmann and Neilan, 2007) the authors demonstrated STX biosynthesis induced by light. The authors hypothesize that some steps in saxitoxin synthesis can be regulated by disulfide enzymes such as photoreductase or succinyl-phosphate synthase, which in turn are regulated by light. These enzymes may be regulated similarly to certain enzymes involved in the Calvin cycle, such as ribulose-5-phosphate kinase, fructose-1,5-bisphosphate or sedoheptulose-1,7-bisphosphate, which are also activated by light-induced reductions of disulfide bonds (Nelson and Cox, 2002). If light intensities around 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ are conducive to STX biosynthesis under "in vivo" conditions, it would be reasonable to expect that they represent the optimal conditions for the abovementioned enzyme activities.

Circadian rhythms have been described for various metabolic activities in a wide variety of photoautotrophic eukaryotes such as algae and plants, as well as in prokaryotes (Anderson, 2005). Tarascher-Oldehans and Anderson (Tarascher-Oldehans and Anderson, 2005) described an hourly variation of STX production

Anexo 2

A DUREZA DA ÁGUA AFETA O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE SAXITOXINAS POR *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria)

“Carneiro, RL, Pacheco, ABF, Azevedo, SMFO. The water hardness affects growth and saxitoxins production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). Manuscrito à ser submetido ao periódico *Journal of Plankton Researc*

1 **THE WATER HARDNESS AFFECTS GROWTH AND SAXITOXINS**
2 **PRODUCTION BY *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA)**

3 **Ronaldo Leal Carneiro^{1*}, Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo¹ and Ana**
4 **Beatriz Furlanetto Pacheco²**

5 ¹ Laboratory of Cyanobacterial Ecophysiology and Toxicology, Institute of Biophysics Carlos
6 Chagas Filho, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
7 Brazil and ² Genomic unit, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Health Sciences
8 Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

9 *Corresponding Author: rleal@biof.ufrj.br

10 **ABSTRACT**

11 Effect of water hardness as salinity, conductivity and different ions common in Brazilian
12 water environments on growth and saxitoxin and neosaxitoxin production by
13 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (strain T3) was
14 investigated in batch culture conditions. With the aim to understand effects of carbonate salts,
15 the CO_3^{-2} , 5mM of this ion was added in ASM-1 medium at three forms: (i) CaCO_3 , (ii)
16 MgCO_3 or (iii) Na_2CO_3 . Then, ASM-1 medium was added with chloride salts with the same
17 positive ions added with carbonate salts. Ca^{+2} , Mg^{+2} or Na^+ was added at two concentrations:
18 (i) 5mM or (ii) 10mM. Growth of *C. raciborskii* (T3) cells is positively related to
19 conductivity or salinity. Saxitoxins production was also positively related to salinity and
20 conductivity, in the major of treatments. These data demonstrated that increase in salinity and
21 conductivity can increase growth and saxitoxins production by *C. raciborskii* cells.

22 Key words: Salinity, conductivity CO_3^{-2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , *Cylindrospermopsis raciborskii*,
23 saxitoxin, growth.

24 **INTRODUCTION**

25 *Cylindrospermopsis raciborskii* is being increasingly recognized as a cyanobacterium species
26 with a global distribution in freshwater environments (Pádisak et al., 1997; Briand et al.,
27 2004; Figueiredo et al., 2007). Several strains of this species are toxic, producing
28 cylindrospermopsin, an alkaloid hepatotoxin (Othani et al., 1995; Hudnell, 2008). Brazilian
29 toxic *C. raciborskii* isolates, differently from those of other geographic regions, produce
30 saxitoxin (STX), neosaxitoxin (NSTX), Gonyautoxins (GTX1-4) and others STX analogues,
31 as well as other unidentified toxins (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2005). These toxins
32 interfere with the function of neuronal sodium channels and calcium and potassium channels

33 important for heart muscle function in mammals (Su et al., 2004; Kellmann and Neilan,
34 2007).

35 The North-eastern region of Brazil presents a semi-arid climate characterized by elevated
36 temperatures ($>26^{\circ}\text{C}$), long periods of drought and occasional rainy events, with evaporation
37 rates exceeding the total low precipitation (750 mm/year) (Maia et al., 2001). The soil in this
38 region is rich in salts (with calcium, magnesium and sodium carbonates present in millimolar
39 range), which are precipitated by intense evaporation and can be liberated by rainfall and
40 irrigation eventually concentrating in reservoirs waters (Morais et al., 1998; Maia et al., 2001;
41 Costa et al., 2009). Interestingly, dominance ($> 50\%$) of *C. raciborskii* has been frequently
42 described in water reservoirs in this region and blooms can occur under varying conductivities
43 (from 198 to $25000\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) and alkalinities (from 217 to $5567\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$) (Souza et al., 1998;
44 Bouvy et al., 1999; Costa et al., 2006; Panosso et al., 2007; Costa et al., 2009).

45 The constant presence of *C. raciborskii* in such diverse environmental conditions in Brazilian
46 water bodies (whether as a dominant phytoplankton component or not) is in accordance with
47 the notion that this is a highly adaptable organism showing diverse morphological and
48 physiological traits, besides the variable toxigenic potential (Pádisak et al., 1997; Istvánovics
49 et al., 2000; Briand et al., 2004; Castro et al., 2004; Dufour et al., 2006; Wiedner et al., 2007;
50 Carneiro et al., 2009; O'Brien et al., 2009). Among other characteristics, this species is
51 tolerant to high salinity (NaCl 100mM) (Moisander et al., 2002). Studying a STX producing
52 strain, Pomati et al. (2004) described that exposure to 10mM NaCl increased cellular Na⁺
53 concentration, with a proportional accumulation of STX in cells of *C. raciborskii*. No
54 additional studies were performed in order to investigate the effects of conductivity or salinity
55 on the physiology of *C. raciborski*. Considering the environmental conditions of water
56 reservoirs from Brazilian north-eastern region where recurrent blooms of *C. raciborskii* are
57 documented, in this study we investigate the effect of different ions (CO_3^{-2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} and
58 Na^{+}) on growth and toxigenicity of a STX producer strain, as a contribution to the knowledge
59 of environmental physicochemical factors that lead to dominance and STX production of this
60 species in Brazil.

61

62 **MATERIALS AND METHODS**

63 **Strain maintenance and growth conditions**

64 The *C. raciborskii* T3 strain used in this study was isolated in Brazil, from a toxic
65 cyanobacterial bloom in the Billings reservoir in São Paulo State (Lagos et al., 1999). This

66 strain is maintained in the culture collection at the Laboratory of Cyanobacterial
67 Ecophysiology and Toxicology (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The T3 strain can produce
68 STX, NSTX, decarbamoil-STX and decarbamoil-NSTX (Carneiro et al., 2009). A non-axenic
69 batch culture of this strain was maintained in ASM-1 medium (Gorhan et al., 1964) with
70 aeration, at $24\pm 2^\circ\text{C}$, with a 12 hour L:D cycle and photon flux of $50\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
71 (provided by common day light fluorescent lamps). These culture conditions were established
72 according to the environmental conditions from which this strain was isolated. Light intensity
73 was measured with a quanta sensor (QST-100 Box – Biospherical Instruments Inc.).

74 **Formulation of culture medium with added ions**

75 Cultivation in ASM-1 was used as the control condition; as this medium contains micromolar
76 amounts of the ions added in experimental tests (Table 1), they were taken into account in the
77 calculations for the final concentrations of Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ and CO_3^{-2} . Carbonates were
78 added at form of CaCO_3 , MgCO_3 or Na_2CO_3 to ASM-1 medium, to obtain a final
79 concentration of 5mM CO_3^{-2} ion. This fixed concentration of the CO_3^{-2} ion provided different
80 concentrations of the associated calcium, magnesium or sodium ions in each case. Thus, in
81 order to test for the effect of the latter, ASM-1 medium was added with the salts CaCl_2 ,
82 MgCl_2 or NaCl , to obtain concentrations of (i) 5mM or (ii) 10mM of Ca^{+2} , Mg^{+2} or Na^+ .
83 After addition of the ions and before inoculation, the pH of culture media was adjusted to 8.0
84 with KOH and conductivity and salinity were measured by a portable conductivimeter
85 resistivimeter (Yellow Springs model 30/25FT). Experimental tests were performed with a
86 culture of T3 strain maintained as previously described, until the end of the exponential phase
87 (12 days). It was used as inoculum for the experimental cultures, which were initiated with
88 7.0×10^5 cells per milliliter. Cells were cultivated in 3-liter glass balloons (straight bottom)
89 with 2 liters of ASM-1 medium (control) or ASM-1 added with different ion sources. Each
90 condition was performed in triplicates. Sampling was done every 3 days during 15 days,
91 under sterilized conditions, for estimation of cellular concentrations, according to Carneiro et
92 al. (2009). Growth rates were calculated during the exponential phase and are presented as
93 relative growth rate ($\mu\cdot\text{day}^{-1}$) according to Fogg and Thake (1987). To evaluate final net
94 growth after 15 days in culture, the difference between the total number of cells per millilitre
95 at day 0 and day 15 was calculated.

96 **STX and NSTX analysis**

97 To determine STX and NSTX concentrations, samples of 500mL were harvested on the 6th
98 day (exponential phase of control condition) and 12th day (early stationary phase of control

99 condition), filtered on borosilicate filter (45mm diameter – Millipore) and stored at -20°C.
100 HPLC analysis was performed not after 24h from the extraction procedure. Extraction of
101 toxins from samples was performed according to Carneiro et al. (2009) and toxin content was
102 analyzed as intracellular or extracellular fraction.
103 STX and NSTX were analyzed according Oshima (1995), using a Shimadzu HPLC system
104 with a silica-base reversed phase column (125mm x 4.0mm, 5µm; Lichrospher 100 RP 18).
105 The chromatographic condition was: mobile phase - 2mM heptanesulfonate in 30mM
106 ammonium phosphate and 6% acetonitrile, pH 7.1. Toxins were detected using a fluorometric
107 detector, with excitation at 330nm and emission at 390nm. Toxins were identified e quantified
108 by comparison with known retention time and integrated areas of standards. The standards
109 were purchased from the Institute of Marine Bioscience – National Research Council of
110 Canada (Halifax, Canada).

111 **Statistical analysis**

112 Data were expressed as mean values ± standard error (SE). Data for each experimental
113 variable were tested for normality. Differences among standard deviations were determined
114 using Kolmogorov and Smirnov's test and Barlett's test, respectively. As these data were
115 classified as nonparametric, ANOVA was performed using the Kruskal-Wallis (KW) test for
116 multiple comparisons. Dunn's test was used to determine the specific differences between two
117 treatments. For specific comparisons of saxitoxin production between two different phases of
118 growth, the nonparametric Mann-Whitney U-test was performed. All tests were performed
119 with significance of 95% (p<0.05) using the GraphPad Instat 3.0 application.

120 **RESULTS**

121 **pH variation during cellular growth**

122 Salinity and conductivity values of ASM-1 culture medium after the addition of different salts
123 are shown in Table 2. Prior to inoculation with *C. raciborskii* T3, the pH values of the
124 modified ASM-1 media were adjusted to 8.0 and possible subsequently variations in pH were
125 followed during cellular growth. However, no difference in pH was observed comparing
126 control and media added with the different salts (KW test, P>0.05, data not shown).

127 **Cellular Growth**

128 The growth curves of this strain at the different treatments are shown in figure 1 and 2.
129 Analysis of variance revealed that all ion treatments have affected growth rates (table 2) of the
130 *C. raciborskii* T3 strain (KW test; P<0.01). Growth rates of *C. raciborskii* (T3) are positively
131 related to increase in salinity and conductivity (table 2). Exception were made to CaCO₃

132 (Dunn test, $P < 0.05$) that it is lower than control and to Na_2CO_3 treatments (Dunn test,
133 $P > 0.05$).

134 The exponential phase varies among different salt treatments (table 2). In control condition
135 exponential phase lasted 9 days. Cells at CaCO_3 , MgCl_2 (5mM) and CaCl_2 (10mM) presented
136 the exponential phase until 3rd, 6th and 6th day, respectively. Cells at MgCO_3 , Na_2CO_3 and
137 NaCl (5mM or 10mM) presented the exponential phase until 15th, 12th, 12th and 12th day,
138 respectively. The different duration of exponential phase is in accordance with the increase of
139 biomass after 15 days, in the major of treatments. According these results, all salt treatments
140 stimulated cell growth of *C. raciborskii* (T3). Exceptions were made at CaCO_3 and CaCl_2
141 (10mM) treatment that shown a significantly decrease in cellular ratio (table 2). Clear
142 relations did not could be observed between pH variation and cellular ratio at different salt
143 treatments,

144 **Total saxitoxins (STX + NSTX) production by *C. raciborskii* (T3) cells**

145 Extracellular STX and NSTX contents were no measurable because values were below the
146 detection limit of the method used in this work. The detection limit is 0.3 ng for STX and 0.04
147 ng for NSTX. To understanding the effects of exposure to different salt treatments on
148 intracellular total saxitoxins (STX + NSTX) production by *C. raciborskii* data were
149 normalized to 10^6 cells (Figs 3 and 4). In figure 3 is shown the variation in total saxitoxins
150 concentration after 6 days (corresponding to exponential phase of the control condition) of
151 exposure. In Figure 4 is shown the variation in total saxitoxins concentrations after 12 days
152 (corresponding to stationary phase of the control condition) of exposure. The total saxitoxins
153 values per 10^6 cells determined during this study are also expressed in Table 3.

154 After 6 days of exposure, total saxitoxins production was positively related to conductivity
155 and salinity (KW test, $P < 0.001$). Exception was made at CaCO_3 treatment, that saxitoxins
156 production per 10^6 cells decrease in comparison to control (Dunn test, $P < 0.05$).

157 After 12 days of exposure, a clear tendency to increase in total saxitoxins production per 10^6
158 cells was also observed (KW test, $P < 0.01$), and this tendency was also positively related to
159 conductivity and salinity. However, only at NaCl (5 or 10mM) and MgCl_2 10mM treatments,
160 the total saxitoxins per 10^6 cells were significantly lower than control treatment. An other
161 hand, at CaCO_3 treatment saxitoxins production per 10^6 cells decreases, in comparison to
162 control, as observed at 6 days of exposure (Dunn test, $P < 0.01$).

163 Production of total saxitoxin per 10^6 cells at 6th day was significantly different to this
164 production at 12th day of exposure (KW test, $P < 0.01$). At control condition the total saxitoxin

165 production at 12th day (stationary phase) was 1.2 fold higher than at 6th day (exponential
166 phase). Only at MgCO₃, Na₂CO₃, CaCl₂ (5mM) and MgCl₂ (5mM) significantly decreases in
167 this production was observed (table 4).

168 **DISCUSSION**

169 Variations in physical and chemical factors as light, temperature, salinity, inorganic nutrients
170 and trace metals or ion composition constitute the environmental stimuli for which
171 cyanobacteria exhibit a wide range of adaptive response (Tandeau de Marsac and Houmard,
172 1993; Whitton and Potts, 2000; Paerl and Fulton III, 2006). Hypothesis of *C. raciborskii* have
173 ability to growing in a range from low to higher conditions of salinity (Pádisak, 1997; Briand
174 et al., 2002; Moisander et al., 2002; Dufour et al., 2006) was confirmed by observations of our
175 study. In general, in this study, the increase in conductivity and salinity caused the increase in
176 the growth of *C. raciborskii* (T3) strain. This appointment could be observed in six of eight
177 treatments where the conductivity is effectively higher than the conductivity in control
178 condition. Same, it could be observed in six of the seven conditions with higher salinity than
179 control (table 2).

180 Moisander et al. (2002) study growth tolerance of *C. raciborskii* to salinity treatments
181 represented by addition of NaCl in a range of 0 to 20g.l⁻¹ (~0.36M) and showed that the
182 growth limit for the salinity tolerance of *C. raciborskii* was observed at 6g.l⁻¹ (~0.10M) of
183 NaCl (Moisander et al., 2002). These authors used concentrations around 10 fold higher than
184 the highest concentration used in this study and explain the hypothesis of salinity could be a
185 bloom controlling factor of this species. A global analysis of our results allows with this
186 hypothesis. This hypothesis also agrees with Brazilian environments observations. Blooms of
187 *C. raciborskii* were frequent in several reservoirs with salinity similar to marine
188 environments, principally in north-eastern region of Brazil (Souza *et al.*, 1998; Bouvy *et al.*,
189 1999; Costa *et al.*, 2006; Panosso *et al.*, 2007). Additionally, in this study, we used
190 concentrations of 5 or 10mM to define a high concentration of some ion in medium. These
191 concentrations was established based on these ion content of some Brazilian reservoir waters
192 in which the dominance of *C. raciborskii* is common (Bouvy et al., 2000; Chellapa et al. 2008
193 a and b; Chellappa and Costa, 2003; Costa et al., 2009).

194 Cyanobacteria had to adapt to a environmental gaseous changes, where level of CO₂ declining
195 and O₂ increasing (Badger and Price, 2003). Because O₂ can compete with CO₂ for binding to
196 the carbon-fixing enzyme Rubisco, cyanobacteria developed a highest effective CO₂-
197 concentrating mechanism (CCM) whit CO₂ concentration 1000 fold higher than Rubisco

198 concentration (Koropatkin et al. 2007). The CCM involves the import and accumulation of
199 inorganic carbon as HCO_3^- in the cytoplasm, by the CmpABCD protein transporter (Omata et
200 al., 1999). In the cyanobacterium *Synechocystis*, the CmpA protein, a component of
201 CmpABCD transporter complex, have high affinity with Ca^{+2} . This cation would be a co-
202 enzyme that facilitates the affinity to HCO_3^- anion and also raise complex affinity with some
203 nutrients as nitrate (Koropatkin et al., 2007). Additionally, in pure water, at high
204 concentration of gaseous CO_2 , carbonate salts can be soluble and dissociate in bicarbonate
205 anion and equivalent free cation. However, the microorganism's activity as photosynthesis
206 promotes decrease in free gaseous CO_2 level, and this ion return to carbonate salts formation
207 (Esteves, 1988; Morais et al., 1998; Maia et al., 2001; Lee et al., 2006). The CaCO_3 salt is
208 practically insoluble (Esteves, 1988). Thus, the decrease in HCO_3^- anion and Ca^{+2} levels could
209 be contributed to decrease in growth of *C. raciborskii* (T3) cells at CaCO_3 condition.
210 However, it is interesting that using the salt at MgCO_3 and Na_2CO_3 form stimulated the
211 growth of *C. raciborskii* (T3) cells (table 2). The ASM-1 medium is already supplied with
212 $20\mu\text{m}$ concentration of calcium (table 1), although this ion could be reduced also at MgCO_3
213 and Na_2CO_3 treatments, as discussed above, this other cation (Mg^{+2} and Na^+) proportionally
214 seems be favorable to growth of *C. raciborskii* (T3). These last salts are proportionally higher
215 soluble than CaCO_3 (Morais et al., 1998; Maia et al., 2001). Despite the gaseous CO_2 levels
216 could be reduced by photosynthetic activity and precipitated the free Ca^{+2} , the solubility of the
217 MgCO_3 and Na_2CO_3 salts could be contribute to increase in bicarbonate anion and
218 corresponding free cation. Furthermore, these free Mg^{+2} and Na^+ could be responsible to
219 results observed. To testing this hypothesis, new assays were performed with addition into
220 ASM-1 medium of CaCl_2 , MgCl_2 and NaCl salts.
221 The use of CaCl_2 treatments caused different responses of *C. raciborskii* (T3) cells growth.
222 Surprisingly, at the lowest concentration *C. raciborskii* (T3) cells had increase growth while
223 at the highest concentration the growth of cells decreased (table 2). The lowest concentration
224 of Ca^{+2} at CaCl_2 form is equivalent to concentration at CaCO_3 form (5mM and 5.20mM,
225 respectively). This result agree with the hypothesis of insolubility of the last salt could be
226 responsible to reduction of *C. raciborskii* (T3) cells.
227 Some studies were already developed to understanding the Ca^{+2} effects on growth of some
228 cyanobacteria species. Yin et al (1991) used *Lyngbia wollei* strains isolated from a water
229 reservoir in which Ca^{+2} was present at 0.1 to 0.85 mM. Testing ion concentrations up to 1.25
230 mM in culture medium, they observed that dry weight increased in Ca^{+2} concentrations of 0.2

231 and 1.25 mM (Yin et al., 1991). Another study reported massive growth of *L. wollei* in
232 sediments in a pond containing 0.1 to 0.4 mM Ca^{+2} (Speziale et al, 1991). In an investigation
233 on limiting nutrients for the growth of *C. raciborskii* in a lake in Senegal, Dufour et al. (2006)
234 concluded that a concentration of 0.2 mM of Ca^{+2} present in lake water was sufficient to
235 sustain growth of this cyanobacterium. This is in according that Ca^{+2} concentration in ASM-1
236 medium (table 1). According our results, *C. raciborskii* (T3) cells present higher tolerance
237 than other cyanobacteria cells to a higher Ca^{+2} (5mM) concentration. The concentration of
238 free Ca^{+2} at CaCl_2 condition probably is sufficient to stimuli bicarbonate anion and nutrients
239 uptake as discussed by Koropatkin et al. (2007).

240 Cytosolic free Ca^{+2} concentrations are controlled by a balance between influx of external
241 calcium via calcium channels and efflux mechanisms such as ATP-requiring Ca^{+2} pumps and
242 $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$ or $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^+$ antiporters in prokaryotic cells (Dominguez, 2004). It was shown that
243 cold or heat shock treatments caused an increase in $[\text{Ca}^{+2}]_i$ up to threefold that of resting cells.
244 Since then, Ca^{+2} transients were observed in response to diverse environmental stimuli
245 (salinity and osmotic stress and light to dark transitions) in *Anabaena* sp. PCC 7120
246 (Torrecilla et al., 2001; Torrecilla et al., 2004). The fact that bacteria maintain a tight control
247 of cytosolic free Ca^{+2} over a wide range of external free Ca^{+2} concentrations (nanomolar to
248 millimolar) and uses transient increases in intracellular free Ca^{+2} as signaling, suggests that
249 cytosolic free Ca^{+2} above micromolar may be toxic in prokaryotes, as is the case in eukaryotes
250 (Dominguez, 2004). Thus, prokaryotic cells growing in the presence of high Ca^{+2}
251 concentrations possibly limit growth rate due to the extra energetic demand required to
252 maintain Ca^{+2} homeostasis (Dominguez, 2004). Probably a long exposure to the high levels
253 of Ca^{+2} However, the knowledge about Ca^{+2} in cyanobacteria is awfull. The effect of highest
254 concentration of free Ca^{+2} (10mM) imposed to *C. raciborskii* (T3) cells in this study probably
255 is a stress due to the extra energetic demand required to maintain Ca^{+2} homeostasis.

256 According Nelson and Cox (2002), magnesium is an important ion to some metabolism
257 enzymes and compounds with phosphorus can bind to Mg^{+2} . For example, at 2mM of Mg^{+2} ,
258 ATP has found at form of ATP^{-4} , HATP^{-3} , $\text{H}_2\text{ATP}^{-2}$, MgHATP^- , and Mg_2ATP . Additionally,
259 assimilation of CO_2 (carbon fixation) require ATP and ATP concentration improve in light
260 and the Mg^{+2} presence at pH above 7.0 to supporting the active complex of RUBISCO
261 enzyme. Additionally, protoporphyrin IX (P_{IX}) is an enzyme involved in the insertion of Mg^{+2}
262 into tetrapyrroles in Chlorophyll synthesis, that activities is directly linked to Mg^{+2}
263 concentrations (Chew and Bryant, 2007; Sobotka et al., 2008). Magnesium containing

264 tetrapyrrole prosthetic groups is essential cofactors for light capture that improving the global
265 metabolism (Chew and Bryant, 2007). Therefore, the fact of MgCO_3 present high solubility in
266 water, probably could explain the increases in relative growth rate in cells supplied with this
267 salt, by increasing in free Mg^{+2} could be used by improving the cell metabolism, as discussed
268 early. The equivalent free Mg^{+2} levels at MgCl_2 condition also support this hypothesis,
269 evidenced by increase in cellular ratio before 15 days of exposure (table 2).

270 In literature are common studies on inhibition of growth of some cyanobacteria species by
271 salinity. Major of this studies is developing using NaCl to increase medium salinity.
272 Inhibition of photosynthetic and respiratory systems that reduced growth of *Anabaena*
273 *cylindrica*, *Synechocystis sp* and *Synechococcus sp* was reported in as an effect of a high
274 concentration (from 0.5 to 40mM) of NaCl (Bhadauriya et al., 2007; Allakhverdiev and
275 Murata, 2008). The highest concentration of NaCl used in this study probably is lower to
276 inhibit the photosynthetic or respiratory systems of *C. raciborskii* (T3) cells.

277 Sodium is an important ion to different cell functions, for example, to maintenance of
278 cytoplasmatic pH (Nelson and Cox, 2002; Pomati et al. 2004). Ionic gradient of ions as Na^+
279 could provide the transportation power to some solutes that maintain homeostasis or can be
280 used to cell functions (Nelson and Cox, 2002). Na^+ used as at Na_2CO_3 form as NaCl form
281 stimulated growth of of *C. raciborskii* (T3) cells, with increases in duration of exponential
282 phase. In a previously study, use of Na^+ 10mM decreased growth rates of *C. raciborskii* (T3)
283 strain before 6 days of exposure (Pomati et al., 2004). These results disagree with our results.
284 However, these authors described effect of Na^+ levels on growth of *C. raciborskii* (T3)
285 measured by cell density data ($\text{OD}_{750\text{nm}}$ NaCl ample/ $\text{OD}_{750\text{nm}}$ sample control). Nevertheless,
286 we studied effect of Na^+ on growth of *C. raciborskii* measured by cell counts and the our
287 conception of growth rates is different to authors above. Probably, the differences are due
288 these different conceptions of growth. Moisander et al. (2002) described decreases in growth
289 rates of two *C. raciborskii* strains at 2 or 6 g.l^{-1} of NaCl (36 mM or 108 mM). Our results also
290 did not confirm these last authors' observations, probably due they calculated growth rates
291 from Chlorophyll-*a* data and use the lowest concentration of NaCl higher than that the highest
292 concentration used by us.

293 The effects of some ion tested in our study on saxitoxin synthesis were already studied. For
294 example, Yin et al. (1997) studied effect of Ca^{+2} concentrations on toxicity of *L. wollei*
295 (measured in mouse units), a saxitoxin producer cyanobacterium. Increase in Ca^{+2} at 10 or 50
296 mg.l^{-1} (Ca^{+2} 0.2 mM or 1.2mM) increased toxicity, while at low concentration 1 mg.l^{-1} (Ca^{+2}

297 0.025mM) decreased toxicity of *L. wollei*. Kellman and Neilan (2007) studied *C. raciborskii*
298 saxitoxins biosynthesis “in vitro” and showed that STXs synthesis was affected by some ions
299 as Ca^{+2} 1mM, that inhibited 2% of saxitoxin biosynthesis. The use of CaCO_3 salt inhibited the
300 total saxitoxins (STX + NSTX) production by *C. raciborskii* (T3) cells, at 6th day (92,51% of
301 inhibition) as well as at 12th day of exposure (81,39% of inhibition) in comparison to control
302 condition (Figs 3 and 4). However *C. raciborskii* (T3) cells at Ca^{+2} 5mM or 10mM with
303 CaCl_2 treatments stimulated total saxitoxins production (48,12% e 84,83%, respectively) after
304 6 days of exposure, in comparison to control. An other hand, at 12th of exposure the total
305 saxitoxins production reduced (60.22%) at Ca^{+2} 5mM, while at the highest concentration
306 (10mM) the stimuli was 1,94%, only, in comparison to control (Figs 3 and 4).

307 According our results, cells at CaCO_3 stayed at stationary phase at 6th day (table 4.2). As
308 already discussed to growth, the saxitoxins production inhibition, at this condition, probably
309 is a consequence of a stress by using of this salt. However, at CaCl_2 conditions the advantages
310 by free Ca^{+2} levels, as increase in nutrient uptake (Koropatkin et al., 2007) could be
311 favourable to cellular metabolism, at 6th day of exposure, since in this time the cells at both
312 treatments (5 or 10mM) were in exponential phase (table 2). Furthermore, the long exposure
313 to these conditions (12 days) seemed stressful to cells, as already discussed early, at cells in
314 the highest condition of Ca^{+2} as well as at CaCO_3 condition. At these conditions, at 12th day of
315 exposure, saxitoxins production per cells increase in relation to those concentrations observed
316 at 6th of exposure (table 4). Because these condition are higher stressful than Ca^{+2} 5mM, as
317 already discussed, the saxitoxin synthesis by *C. raciborskii* (T3) cells are positively linked to
318 cell stress caused by a long exposure of CaCO_3 or Ca^{+2} (10mM). However, the role of Ca^{+2} on
319 saxitoxin synthesis remains unknown.

320 Pomati et al. (2004) related no effects of addition of MgCl_2 at 5mM on saxitoxin production
321 by *C. raciborskii* (T3) exposed to this condition during 6 days. However, Mg^{+2} at 1mM was
322 reported as a saxitoxin biosynthesis stimulator “in vitro”, in the order of 11% (Kellman and
323 Neilan, 2007). In this work, when Mg^{+2} was added as different salts and concentrations, high
324 stimulation of total saxitoxins production by (T3) cells was observed in a dose-dependent
325 level (MgCO_3 , 490.33%; MgCl_2 5mM, 321.55%; MgCl_2 10mM, 728.17%), after 6 days of
326 exposure as well as 12 days of exposure (MgCO_3 , 8.81%; MgCl_2 5mM, 20.42%; MgCl_2
327 10mM, 76.70%). Probably, advantages to global metabolism of *C. raciborskii* (T3) cells by
328 free Mg^{+2} , as discussed above, seemed reflect on saxitoxins synthesis. This increasing in

329 saxitoxins production by *C. raciborskii* (T3) cells under Mg^{+2} disagrees with Pomati *et al.*
330 (2004) observations.

331 Pomati *et al.* (2004) analyzed STX production per optical density of cells (STX/OD_{750nm}).
332 Probably, this conception of saxitoxin production was not sufficiently sensitive to observe
333 real effect of Mg^{+2} .

334 As already discussed, in our study, the saxitoxins synthesis continued to be stimulated, before
335 12 days of exposure to Mg^{+2} at different forms or concentrations (table 2). However,
336 comparisons of saxitoxins production between 6th and 12th days of exposure to Mg^{+2} revealed
337 the decrease of this production at 12th day, at $MgCO_3$ or $MgCl_2$ (5mM) conditions (table 4).
338 These responses suggest a stressful condition on *C. raciborskii* (T3) cells. This hypothesis
339 could be sustained only by the cells at $MgCO_3$ where there are a reduction in exponential
340 phase to 6th day (table 2). However, the cellular ratios at all Mg^{+2} treatments, higher than
341 control, contradict this hypothesis (table 2). The significance of these results remains
342 unknown.

343 Pomati *et al.* (2004) also studied effect of NaCl on saxitoxin production. These authors related
344 a dose-dependent increase in saxitoxin production per optic density of cells (STX/OD_{750nm}).
345 Our results agree with these authors' observations. Total saxitoxin production per 10⁶ cells of
346 *C. raciborskii* (T3) is also dose dependet to Na^+ levels. The stimuli of saxitoxins production
347 was: Na_2CO_3 , 91.71%; NaCl 5mM, 48.12%; NaCl 10mM, 70.76%, after 6 days of exposure;
348 Na_2CO_3 , 23.45%; NaCl 5mM, 38.96%; NaCl 10mM, 56.66%, after 12 days of exposure).
349 Advantages in Na^+ uses to global metabolism as discussed previously, seemed also be
350 reflectd in saxitoxins synthesis. Increase in exponential phase of cells at all Na^+ treatments
351 was observed (table 2). However, a decrease in saxitoxins production was observed at
352 Na_2CO_3 treatments before 12 days of exposure when cells were in final to exponential phase.
353 In literature lacks any study that possibilities clarify this observation.

354 In a general trend, the saxitoxins synthesis was stimulated at the majority of the treatments
355 adopted to test the effects of water hardness in this study. At 6 day of exposure when the
356 majority of cultures stayed with cells in exponential phase, there is a proportional increase in
357 the saxitoxin synthesis in seven of the nine experimental conditions, where the conductivity is
358 higher than 800 μS (table 2). Furthermore, the long exposure to these conditions elicited the
359 significantly decrease, in comparison to control condition, only at two treatments ($CaCO_3$ e
360 $CaCl_2$ 5mM).

361 The majority of tested ion stimulated the growth of *C. raciborskii* (T3) and the saxitoxins
362 synthesis was also stimulated in this condition. Of course, the real ecological significance of
363 these observations need to be better studied, with other experiments, with different saxitoxins
364 producing strains of *C. raciborskii*. Meanwhile, this study show that the increase in
365 conductivity by availability of cations as Ca^{+2} , Mg^{+2} and Na^{+} , common in Brazilian water
366 environments with recurrent blooms occurrence of neurotoxic *C. raciborskii* (Bouvy et al.,
367 2000; Chellapa et al. 2008 a and b; Chellappa and Costa, 2003; Costa et al., 2009), could be
368 influencing the increase in saxitoxins synthesis contributing to the most efficient monitoring
369 of this species growth and toxicity of blooms. Thus, this knowledge could allow a basis to
370 studies that seek to minimize the potential risks arising from the multiple water uses.

371 **ACKNOWLEDGEMENTS**

372 The first author wishes to thank the CAPES for their fellowship support his Ph.D. studies.

373 **FUNDING**

374 Financial support was also provide by CNPq (grants no. 410765/2006-6) and FAPERJ (grants
375 no. E26/100.613/2007).

376 **REFERENCES**

377

- 378 Allakhverdiev, S. I. and Murata, N. (2008). Salt stress inhibits photosystems II and I in
379 cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, **98**, 529-539.
- 380 Badger, M. R., and Price, G.D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria:
381 molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, **54**
382 (383), 609-622
- 383 Bhadauriya, P, Gupta, R., Singh, S. and Bisen, P. S. (2007). Physiological and Biochemical
384 Alterations in a Diazotrophic Cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Under NaCl Stress.
385 *Current Microbiology*, **55**, 334-338.
- 386 Bouvy, M., M. Falcão, M. Marinho, M. Pagano, and A. Moura. (2000). Occurrence of
387 *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 tropical reservoirs during the 1998 drought.
388 *Aquatic Microbial Ecology*, **23**,13-27.
- 389 Bouvy, M., Molica, R. J. R., De oliveira, S., Marinho, M. and Becker, B. (1999). Dynamics of
390 a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shalow reservoir in the
391 semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 285-297.

392 Briand, J. F., Leboulanger, C., Humbert, J-F., Beranrd, C. and Dufour, P. (2004).
393 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid latitudes, selection, wide
394 physiological tolerance, or global warming?. *Journal of Phycology*, **40**, 231-238.

395 Briand, J. F., Robillot, C., Quilbier-Llobéras, C., Humbert, J. F., Couté, A. and Bernard, C.
396 (2002). Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in
397 a shallow pond in France. *Water Research*, **36**, 3183-3192.

398 Carneiro, R. L., dos Santos, M. E. V., Pacheco, A. B. F. and Azevedo, S. M. F. O. (2009).
399 Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins
400 production in *cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Journal of Plankton Research*,
401 **31**(5),481-488.

402 Chellapa, N.T., S. L. Chellapa, and S. Chellapa. 2008a. Harmful phytoplankton blooms and
403 fish mortality in a eutrophicated reservoir of northeast Brazil. *Brazilian Archives of Biology*
404 *and Technology*, **51**(4),833-841.

405 Chellappa, N.T. and M.A.M. Costa. 2003. Dominant and co-existing species of Cyanobacteria
406 from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica* **24**,S3-
407 S10.

408 Chellappa, N.T., J.M. Borba, and O.Rocha. (2008b). Phytoplankton community and physical-
409 chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. *Brazilian*
410 *Journal of Biology* **68**(3),477-494.

411 Chew, A. G M. and Bryant, D. A. (2007). Chlorophyll Biosynthesis in Bacteria, The Origins
412 of Structural and Functional Diversity. *Annual Review of Microbiology*, **61**, 113-129.

413 Costa I.A.S., S.R.S. Cunha, R. Panosso, M.F.F. Araújo, J.L.S.Melo and E.M. Eskinazi-
414 Sant'Anna. 2009. Dynamics of cyanobacteria in eutrophic water research of a semi-arid
415 region in Brazil. *Oecologia Brasiliensis*, **13**(2),382-401.

416 Costa, I. A. S., Azevedo, S. M. F. O., Senna, P. A. C., Bernardo, R. R., Costa, S. M. and
417 Chellapa, N. T. (2006). Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian
418 semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology*, **66**(1B), 211-219.

419 Dominguez, D. C. (2004). Calcium signaling in bacteria. *Molecular Microbiology*, **54**(2),
420 291-297.

421 Dufour, P., Sarazin, G., Quilbier, C., Sane, S. and Leboulanger, C. (2006). Cascading nutrient
422 limitation of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Sahelian lake (North
423 Senegal). *Aquatic Microbial Ecology*, **44**, 219-230

424 Esteves, F. A. (ed) (1988). *Fundamentos de Limnologia*. Interciência, 2^a edição, Rio de
425 janeiro, Brazil.

426 Figueiredo, C. F., Giani, A. and Bird, D. F. (2007). Does allelopathy contribute to
427 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Caynobacteria) bloom occurrence and geographic
428 expansion? *Journal of Phycology* **43**, 256-265.

429 Fogg, G. E. and Thake, B. (1987). *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The
430 University of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p.

431 Gorhan, P. R., Maclachlav, J. R., Hammer, V. T. and Kim, W. K. (1964). Isolation and
432 culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen der*
433 *Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie.*, **15**, 796-804.

434 Istvánovics, V., Shafik, H. M., Présing M. And Juhos S. (2000). Growth and phosphate
435 uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in
436 throughflow cultures. *Freshwater Biology*, **43**, 257-275.

437 Kao, C. Y. and Levinson, S. R. (1986). *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of*
438 *Sodium channel*. The New York Academy of Science, New York.

439 Kellman, R., Mihali, T. K., Jeon, J. Y., Pickford, R., Pomati, F. and Neilan B. A. (2008).
440 Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in
441 Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (13), 4044-4053.

442 Kellmann, R. and Neilan, B. A. (2007). Biochemical characterization of paralytic shellfish
443 toxin biosynthesis in vitro. *Journal of Phycology*, **43**, 497-508.

444 Koropatkin, N. M., Koppenaar, D. W., Pakrasi, H. B. and Smith, T. J. (2007). The structure of
445 a cyanobacterial bicarbonate transport protein, CmpA. *The Journal of Biological Chemistry*,
446 **282**(4), 2606-2614.

447 Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. O. and Oshima, Y.
448 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium
449 *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon*, **37**, 1359-1373.

450 Lee, B. D., Apel, A. W. and Walton, M. R. (2006). Calcium carbonate formation by
451 *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresource*
452 *Technology*, **97**, 2427-2434.

453 Maia, C., C., Morais, E. R. C. and Oliveira, M. (2001). Estimativa de carbonato de cálcio
454 aplicado via água de irrigação nas regiões da Chapada do Apodi e Baixo Açu, RN. *Revista*
455 *Brasileira de Engenharia Agrícola e ambiental*, **5**(1), 71-75.

456 Moisander, P. H., McClinton III, E. and Paerl, H. W. (2002). Salinity effects on growth,
457 photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria.
458 *Microbial Ecology*, **43**, 432-442.

459 Molica, R. J. R., Oliveira, E. J. A., Carvalho, P. V. V. C., Costa, A. P. N. S. F., Cunha, M. C.
460 C., Melo, G. L. and Azevedo S.M.F.O. (2005). Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-
461 like anticholinesterase in Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*, **4**, 743-753.

462 Morais, E. R. C., Maia, C. E. and Oliveira, M. (1998). Qualidade da água para irrigação em
463 amostras analíticas do banco de dados do departamento de solos e geologia da escola superior
464 de agricultura de Mossoró, Mossoró-RN. *Caatinga*, **11** (1/2), 75-83.

465 Nelson, D. L. and Cox, M. M. (eds) (2002). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third
466 edition (translated to Portuguese), São Paulo, Sarvier.

467 Omata, T., Price G.D., Badger, M. R., Okamura M., Gohta S. and Ogawa, T. (1999).
468 Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the
469 cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC7942. *Proceedings of the National Academy of*
470 *Sciences*, **96**, 13571-13576.

471 Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic
472 shellfish toxins. *Journal of AOAC International*, **78**, 528-532.

473 Pádisak, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosynska) Seenaya et Subba Raju, an
474 expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology.
475 *Archiv fur Hydrobiologie*, **107**, 563-593.

476 Paerl, H.W. and Fulton III, R. S. (2006). Ecology of harmful cyanobacteria. In Granéli, E. and
477 Turner, J. T. (Eds.). *Ecology of harmful algae. Ecological Studies*, Vol. 189, Springer-Verlag
478 Berlin Heidelberg, pp 95-109.

479 Panosso, R., Costa, I. A. S., de Souza, N. R., Attayde, J. L., Cunha, S. R. S. And Gomes, F. C.
480 F. (2007). Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e
481 o potencial controle das florações pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecologia*
482 *Brasiliensis*, **11**(3), 433-449.

483 Pomati, F., Rosseti, C., Manarolla, G., Burns, B. P. and Neilan, B. A. (2004). Interactions
484 between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii*
485 T3. *Microbiology*, **150**, 455-461.

486 Sobotka, R., Dühring, U., Komenda, J., Peter, E., Gardian, Z., Tichy, M., Grimm, B. and
487 Wilde, A. (2008). Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism

488 and assembly of photosynthetic complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**(38),
489 25794-25802.

490 Souza, R. C. R., Carvalho, M. C. and Truzzi, A. C. (1998). *Cylindrospermopsis raciborskii*
491 (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) Dominance and a contribution to the
492 knowledge of Rio Pequeno arm, Billings Reservoir, Brazil. *Environmental Toxicology and*
493 *Water Quality*, **13**(1), 73-81

494 Speziale, B. J., Turner, E. G. and Dyck, L. R. (1991). Physiological characteristics of vertically
495 stratified *Lyngbya wollei* mats. *Lake Reservoir Management*, **7**, 107-114.

496 Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F. and Barry, W. H. (2004). Saxitoxin blocks L-type ICa.
497 *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **308**, 324- 329.

498 Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to
499 environmental stimuli: New steps towards molecular mechanisms. *Federation of European*
500 *Microbiological Societies Microbiology Reviews*, **104**, 119-190.

501 Torrecilla, I., F. Leganés, I. Bonilla, and F. Fernández-Piñas (2001). Calcium transients in
502 response to salinity and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp.
503 PCC7120, expressing cytosolic apoaequorin. *Plant, Cell & Environment*, **24**,641–648.

504 Torrecilla, I., F. Leganés, I. Bonilla, and F. Fernández-Piñas (2004). Light-to-dark transitions
505 trigger a transient increase in intracellular Ca²⁺ modulated by the redox state of the
506 photosynthetic electron transport chain in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Plant,*
507 *Cell & Environment*, **27**,810–819.

508 Wang, J., Salata, J. J. and Bennett, P. B. (2003). Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺
509 channels. *Journal of General Physiology*, **26**, 4535-4540.

510 Whitton, B. A. and Potts, M. (Eds.) (2000). *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic
511 Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

512 Yin, Q., Carmichael, W. W., and Evans, W. R. (1997). Factors influencing growth and toxin
513 production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont.
514 *Journal of Applied Phycology*, **9**, 55-63.

515

516 Table 1 – Initial concentration into ASM-1 medium of some ions used in experimental testes.

Ion	Concentration (μM)
Ca^{+2}	20,00
Mg^{+2}	40,00
Na^{+}	2,24
CO_3^{-2}	0,00

517 Table 2 – Growth rates, cellular ratio and duration of exponential phase of *C. raciborskii* (T3) cells exposed to different salt treatments; salinity
 518 and conductivity of ASM-1 medium and ASM-1 added to different carbonate or chloride salt treatments.

Treatment	Relative growth rates ($\mu\cdot\text{day}^{-1}$) ^a	Cellular ratio ^{a,b}	Duration of the exponential phase	Conductivity (μS)	Salinity (ppt)
Control	0.224 \pm 0.03	8.209 \pm 0.36	9	568	0.3
CaCO ₃	0.117 \pm 0.02*	4.514 \pm 0.47*	3	656	0.3
MgCO ₃	0.316 \pm 0.01*	31.777 \pm 10.31*	15	1196	0.6
Na ₂ CO ₃	0.254 \pm 0.02*	9.663 \pm 1.50	12	1401	0.7
CaCl ₂ (5mM)	0.550 \pm 0.03*	14.238 \pm 3.02*	9	1436	0.7
MgCl ₂ (5mM)	0.361 \pm 0.13**	20.049 \pm 3.61**	6	2550	1.3
NaCl (5mM)	0.657 \pm 0.08*	17.638 \pm 4.71**	12	1484	0.7
CaCl ₂ (10mM)	0.233 \pm 0.22	1.585 \pm 0.17*	6	2475	1.3
MgCl ₂ (10mM)	0.347 \pm 0.19*	12.223 \pm 2.30*	9	808	0.4
NaCl (10mM)	0.487 \pm 0.14*	10.292 \pm 1.79*	12	1350	0.7

519 ^aData are presented as average \pm standard deviation (n=3).

520 ^bCellular ratio was determined by dividing the final cell number.ml⁻¹ by the initial cell number.ml⁻¹, in each condition.

521 Statistical differences are reported in relation to control: * Dunn test, P<0.05; ** Dunn test, P<0.01.

Table 3 – Concentration values of total saxitoxins (STX + NSTX) production per 10⁶ cells of *C. raciborskii* (T3) exposed to different carbonate or chloride salt treatments.

Treatment	Day ^a	Total STX saxitoxins (STX + NSTX) ^b
Control	6	1.036 ± 1.40
	12	3.206 ± 1.53
CaCO ₃	6	0.077 ± 0.01*
	12	0.596 ± 0.01**
MgCO ₃	6	6.119 ± 1.69**
	12	3.516 ± 0,56
Na ₂ CO ₃	6	12.517 ± 6.20***
	12	4.188 ± 0.53
CaCl ₂ (5mM)	6	3.598 ± 0.52**
	12	1.311 ± 0.18***
MgCl ₂ (5mM)	6	4.369 ± 1.71**
	12	4.029 ± 0.40
NaCl (5mM)	6	1.998 ± 0.14
	12	5.253 ± 2.08*
CaCl ₂ (10mM)	6	2.490 ± 0.84*
	12	3.268 ± 0.30
MgCl ₂ (10mM)	6	8.584 ± 3.30***
	12	13.767 ± 4.48***
NaCl (10mM)	6	6.835 ± 2.59***
	12	7.398 ± 2.40**

^aDay is corresponding to exponential phase (6th day) and stationary (12th day) in control condition.

^bData are presented as average ± standard deviation (n=3).

Statistical differences are reported in relation to control: * Dunn test, P<0.05; ** Dunn test, P<0.01; *** Dunn test, P<0.001.

Table 4 - Percentages of increase or decrease in saxitoxins production by *C. raciborskii* (T3) cells exposed to different carbonate or chloride salt treatments, at stationary phase^a.

Treatment	Percentage (%) of increase	Percentage (%) of decrease
Controle	18,34	-
CaCO ₃	668,65**	-
MgCO ₃	-	42,53*
Na ₂ CO ₃	-	66,53*
CaCl ₂ (5mM)	-	63,53*
MgCl ₂ (5mM)	-	7,78*
NaCl (5mM)	162,90**	-
CaCl ₂ (10mM)	31,23*	-
MgCl ₂ (10mM)	60,36*	-
NaCl (10mM)	8,22*	-

^aPercentages were calculated between total saxitoxins production at 12th day (exponential phase of control condition) and total saxitoxins production at 6th day (stationary phase of control condition).

Statistical differences are reported in relation to control: *U-test, P<0.05; **U-test, P<0.01.

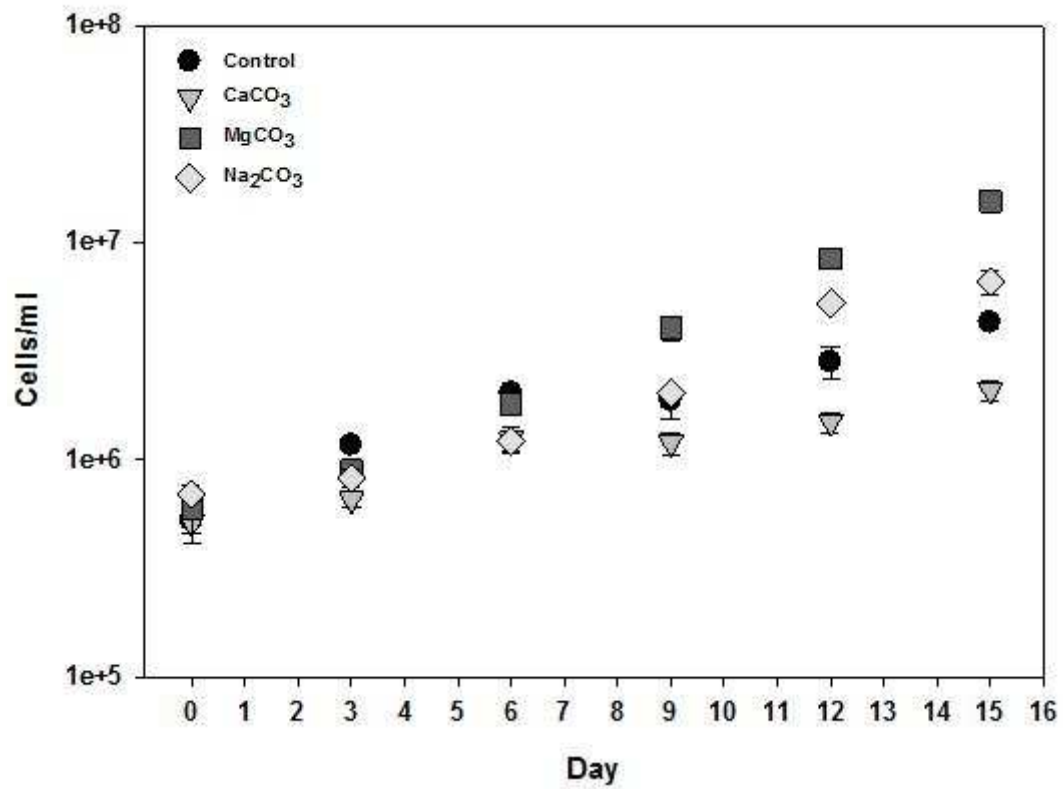


Figure 1 – Growth curves of *C. raciborskii* (T3) cells exposed to carbonate, magnesium or sodium carbonate salts. The error bars are standard errors (n=3).

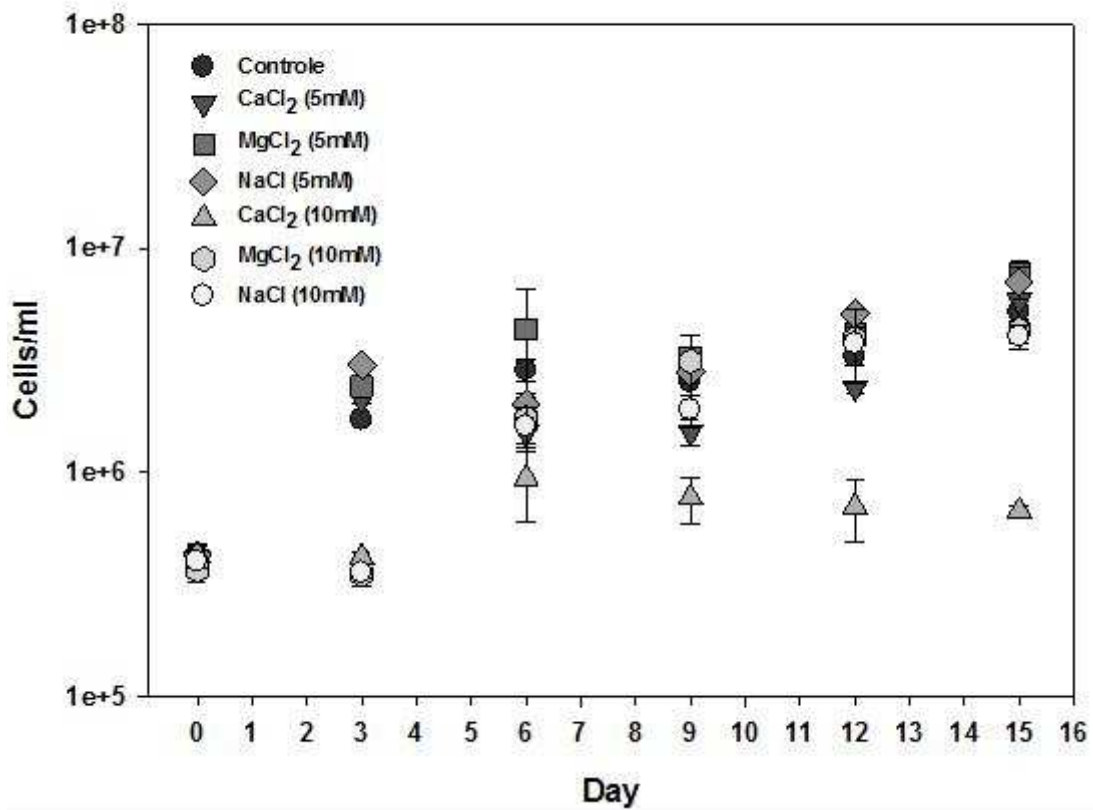


Figure 2 – Growth curves of *C. raciborskii* (T3) cells exposed to carbonate, magnesium or sodium chloride salts at 5 or 10mM of concentration. The error bars are standard errors (n=3).

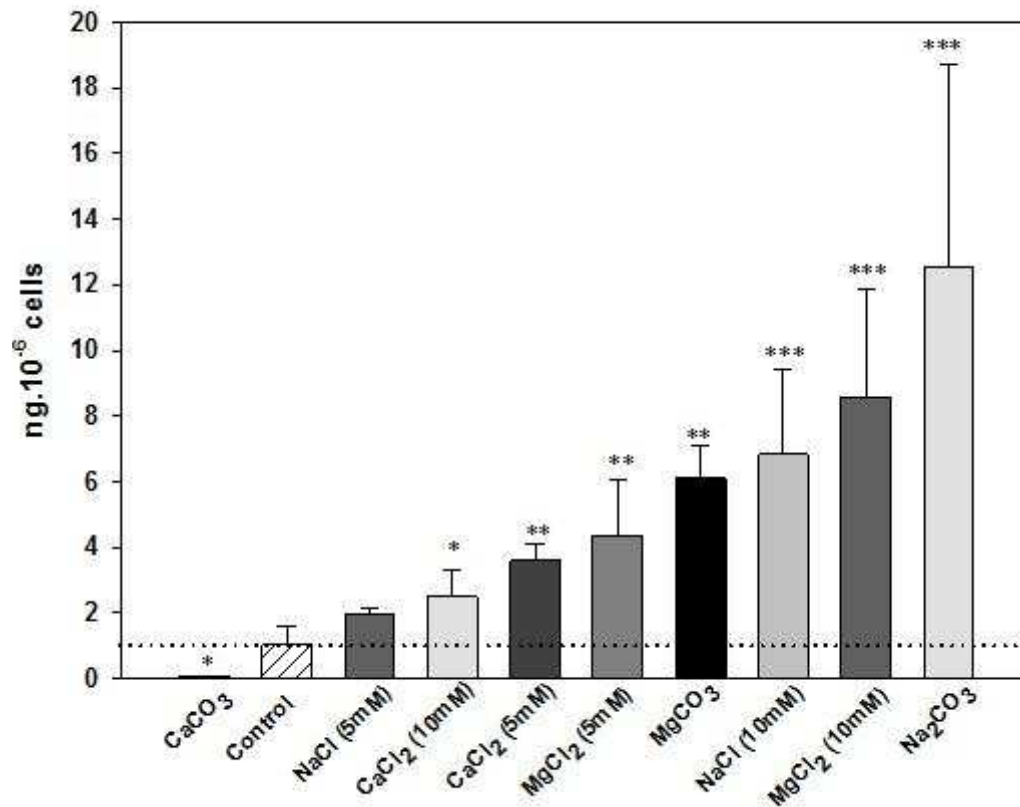


Figure 3 – Total saxitoxins (STX + NSTX) variation in *C. raciborskii* (T3) after 6 days of exposure to different Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ salt treatments. The 6th day is corresponding to exponential phase of cells at control condition. The error bars are standard errors (n=3). The dashed line marks the saxitoxins production in control condition. Statistical differences are reported in relation to control: *Dunn test, P<0.05; **Dunn, P<0.01; ***Dunn, P<0.01.

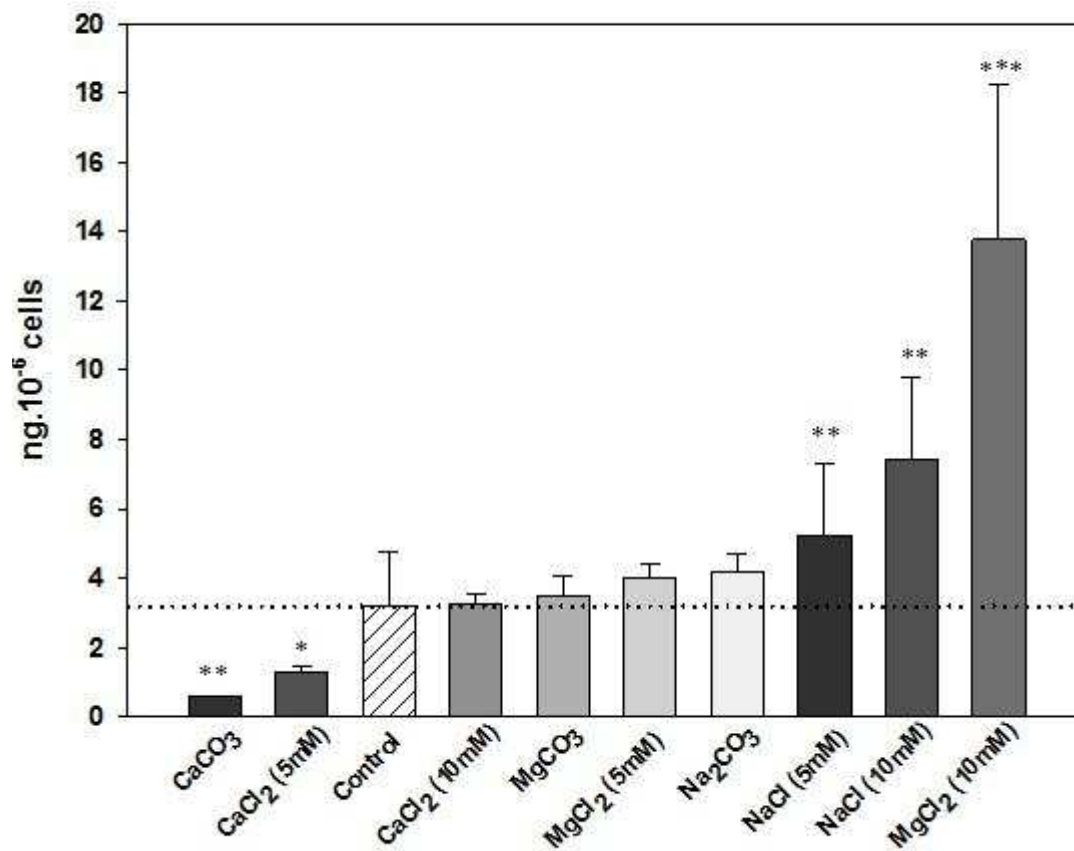


Figure 4 – Total saxitoxins (STX + NSTX) variation in *C. raciborskii* (T3) after 12 days of exposure to different Ca²⁺, Mg²⁺ or Na⁺ salt treatments. The 12th day is corresponding to stationary phase of cells at control condition. The error bars are standard errors (n=3). The dashed line marks the saxitoxins production in control condition. Statistical differences are reported in relation to control: *Dunn test, P<0.05; **Dunn, P<0.01; ***Dunn, P<0.01.

Anexo 3

**EFEITO INIBITÓRIO DO CÁLCIO SOBRE O METABOLISMO DE
Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria)**

**“Carneiro, RL, Alípio, ACN, Bisch, PM, Azevedo, SMFO, Pacheco, ABF.
The Inhibitory Effect of Calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii*
(CYANOBACTERIA) Metabolism. Submetido ao periódico Applied and
Environmental Microbiology**

1 **The Inhibitory Effect of Calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii***
2 **(*CYANOBACTERIA*) Metabolism**

3 **Ronaldo Leal Carneiro^{1*}, Ana Carla Nascimento Alípio², Paulo Mascarello Bisch²,**
4 **Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo¹and Ana Beatriz Furlanetto**
5 **Pacheco^{2*}**

6 ¹ Laboratory of Cyanobacterial Ecophysiology and Toxicology, Institute of Biophysics
7 Carlos Chagas Filho, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio
8 de Janeiro, Brazil and ²Genomic Unit, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho,
9 Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

10 *Corresponding Author: rleal@biof.ufrj.br, Instituto de Biofísica, Universidade Federal
11 do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Av. Carlos Chagas Filho s/n,
12 Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro RJ, Brazil, 21941-902, tel 55 21
13 25626647 fax 55 21 22808193

14 **Abstract**

15 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju is a freshwater
16 cyanobacterium of worldwide distribution. In the North-eastern region of Brazil many
17 eutrophic water reservoirs are characterized by the dominance of *C. raciborskii*, with
18 recurrent occurrence of blooms. These water bodies have characteristically high
19 conductivity due to a high ionic concentration, and are defined as hard (with high values
20 of CaCO₃). All toxic strains from this species isolated in Brazil were characterized as
21 saxitoxin producers. In this study, we investigated the effect of high calcium
22 concentration (10 mM Ca²⁺) on *C. raciborskii* (T3 strain) growth, saxitoxin production
23 and protein expression. The relative growth rates at the exponential phase did not
24 change between high Ca²⁺ and control conditions, but the number of cells ml⁻¹ at
25 stationary phase was lower in the presence of high calcium due to a shorter exponential

26 phase. Saxitoxin production was inhibited (36.7 %) by exposure to calcium after 12
27 days. Changes in protein expression profiles were investigated by proteomic analysis
28 using 2D gel electrophoresis and mass spectrometry. Among differently expressed
29 proteins, those related to primary metabolism (energy and carbohydrate metabolism)
30 were less abundant in cells exposed to the high calcium concentration. These results
31 indicate that a continued exposure to calcium represents a stressful condition to *C.*
32 *raciborskii* cells, which is reflected in the inhibition of growth and saxitoxin production.
33 Therefore, a high Ca^{2+} concentration cannot justify the toxigenic phenotype of some *C.*
34 *raciborskii* strains.

35 **Key words:** Ca^{2+} , *Cylindrospermopsis raciborskii*, stress, proteome, saxitoxin.

36 **Introduction**

37 *Cylindrospermopsis raciborskii* is a filamentous diazotrophic freshwater
38 cyanobacterium. It is a cosmopolitan species, showing diverse morphological and
39 physiological traits and is recognized as highly adaptable to diverse environments (6,
40 15, 19, 35, 43). The presence of *C. raciborskii* in water supplies used by humans or
41 livestock is potentially harmful since several strains can produce the hepatotoxic
42 alkaloid cylindrospermopsin and other yet unidentified toxins (6, 29). Besides,
43 differently from other geographic regions, several toxic strains isolated from Brazilian
44 water supplies produce saxitoxins and analogue toxins (22, 29, 30).
45 *C. raciborskii* is consistently recorded as a dominant phytoplankton component in
46 eutrophic and hypereutrophic reservoirs of the semi-arid North-eastern region of Brazil
47 (3, 4, 9, 10-13). In this region, soil composition and climate contribute to the
48 characteristic high ionic composition of water (Na^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- and HCO_3^- in
49 millimolar range) yielding conductivities up to $25000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (3, 26). These reservoir
50 waters are also defined as hard, routinely evaluated by calcium carbonate content, with

51 high CaCO₃ concentration (> 100 ppm) (13). Water hardness implies high Ca²⁺
52 concentrations, reported as up to 40 mM in those environments (12).

53 **The** influence of salinity (represented by high NaCl concentration) on *C. raciborskii*
54 metabolism has been previously reported and its effect on saxitoxin production has been
55 investigated using a Brazilian strain (T3) (36). However, there is no report on the effect
56 of Ca²⁺ on *C. raciborskii* growth and toxin production. Therefore, considering the
57 common incidence of *C. raciborskii* blooms in water supplies presenting high
58 concentrations of Ca²⁺ in this study we verify the effect of a continued exposure to this
59 ion on the physiology of *C. raciborskii* T3 strain, evaluating cellular growth, production
60 of STX and protein expression profiles.

61 **Material and Methods**

62 **Strain maintenance and experimental conditions**

63 **In** this study, the *C. raciborskii* T3 strain was used. This strain was isolated from a
64 Brazilian toxic cyanobacterial bloom (7) and has been maintained in the culture
65 collection of the Laboratory of Cyanobacterial Ecophysiology and Toxicology (UFRJ,
66 Brazil). The T3 strain produces STX, neosaxitoxin (NSTX), decarbamoil-STX and
67 decarbamoil-NSTX (7). Non-axenic batch cultures of this strain were maintained in
68 ASM-1 medium (18) at 24 ± 2°C, with a 12 hour L:D cycle and photon flux of 50 μmol
69 photons.m⁻².s⁻¹ (provided by common day light fluorescent lamps). Aeration with
70 filtered atmospheric air was produced by a compressed air pump (60 cycles.min⁻¹).
71 These culture conditions were established according to the environmental conditions
72 from which this strain was isolated.

73 **ASM-1** medium composition has a calcium concentration of 20 μM. In order to
74 simulate a Brazilian water condition where *C. raciborskii* occurs, CaCl₂ was added to
75 obtain 10 mM of the ion calcium. The pH of the culture media was adjusted to 8.0 and

76 the turbidity of both media (ASM-1 and ASM-1 10 mM Ca²⁺) was measured using a
77 turbidimeter (2100P - HACH). It is expected that part of the added Ca²⁺ will precipitate
78 as CaCO₃, which can increase turbidity. Thus, light intensity was measured with a
79 quantum sensor (QST-100 Box – Biospherical Instruments Inc.) immersed in the same
80 volume of culture medium used in the experiments. In order to determine the actual
81 initial concentrations of free Ca²⁺ in ASM-1 and ASM-1 10 mM Ca²⁺, 10 ml of each
82 medium were analyzed by ion chromatography using a Dionex ISC-1000 system to
83 separate cations. Analysis was performed suppressing conductivity by use of a CS12A
84 column (250 mm, 4 mm internal diameter), preceded by a CG12A column (50 mm, 4
85 mm internal diameter) and a suppressor pump (CSRS 300 – 4 mm). An isocratic
86 elution with 21 mM metasulfonic acid was performed online using the software
87 Chromeleon 6.80. The sample (ASM-1 or ASM-1 10 mM Ca²⁺) injection volume was
88 set to 500 µl (loop 500 µl) and the total run time was 15 min. Concentrations were
89 determined considering the retention time and according to a calibration curve of cation
90 standards (Six cation II- Standard, Dionex).

91 A culture of *C. raciborskii* (T3) strain was maintained in the conditions described above
92 until the end of the exponential phase (from 9 to 12 days). Aliquots of this culture were
93 used as inoculum to experimental tests, which were initiated with 7.0 x 10⁵ cells .ml⁻¹.
94 Cells were inoculated into 3-liter glass vessels (flat bottom) with 2 l of ASM-1 medium
95 (control) or ASM-1 with high calcium concentration, in triplicates. Sampling of each
96 experimental culture condition was done every 3 days during 15 days, under sterilized
97 conditions. Estimation of cellular concentration during growth was performed according
98 to Carneiro *et al.* (7). Briefly, the length of 30 cells was measured by light microscopy
99 using an ocular rule. Filaments' lengths were measured on a Fuchs-Rosenthal
100 hemocytometer. The number of cells.ml⁻¹ was obtained from the total length of

101 filaments divided by the average cellular length. Growth rates were calculated during
102 the exponential phase and are presented as relative growth rate ($\mu\cdot\text{day}^{-1}$) according to
103 Fogg and Thake (16).

104 **STX analysis**

105 **STX** concentrations were determined from the intracellular fraction. Culture samples of
106 500 ml were harvested on the 12th day (stationary phase). These samples were filtered
107 on borosilicate filter (45 mm diameter, Millipore) and stored at -20°C until the moment
108 of HPLC analysis, which was performed within 24h from the extraction procedure.
109 Extraction of toxins was performed using acetic acid according to Carneiro *et al.* (7).
110 STX was analyzed according to Oshima (34), using a Shimadzu HPLC system with a
111 silica-base reversed phase column (125 mm x 4.0 mm, 5 μm ; Lichrospher 100 RP 18).
112 The chromatographic condition was: mobile phase – 2 mM heptanesulfonate in 30 mM
113 ammonium phosphate and 6% acetonitrile, pH 7.1. STX was detected using a
114 fluorometric detector, with excitation at 330 nm and emission at 390 nm. STX was
115 identified and quantified by comparison with known retention time and integrated areas
116 of STX standard. The standard was purchased from the Institute of Marine Bioscience –
117 National Research Council of Canada (Halifax, Canada).

118 **Protein purification**

119 **Samples** of soluble proteins were obtained from stationary phase cultures (12th day).
120 Cells were harvested from a volume of 500ml by centrifugation (10000 g, 15 min, 4° C)
121 and stored at -20°C. For protein extraction, cells were defrosted in ice; 0.5 M acetic acid
122 was added and samples were incubated at 25° C for 1h. An aliquot of 2 ml of the
123 resulting suspension was combined with 18 ml of a solution containing 90% acetone,
124 10% trichloroacetic acid and 0.07% β -mercaptoethanol, mixed, and maintained at -20°C
125 overnight. The precipitated proteins were recovered by centrifugation (15000 g, 45 min,

126 4°C) and the resulting pellet was washed three times with 90% acetone. Proteins were
127 solubilized at 25°C for 1h in a solution of 2 M thiourea, 7 M urea, 4% Chaps, 40 mM
128 DTT, 0.5% Pharmalyte 3-10, 1 mM PMSF. After centrifugation (10000 g, 45 min, 4° C)
129 the supernatant was collected and proteins were further purified using the 2D-Clean up
130 kit (GE Healthcare). The resulting sample had its protein content determined (5) and
131 was stored in liquid nitrogen until use.

132 **2D gel eletrophoresis (2D-PAGE)**

133 **Samples** containing 150 µg of soluble proteins (in 200 µl of 2 M thiourea, 7M urea, 4%
134 Chaps, 40 mM DTT, 0.5% Pharmalyte 3-10, 0.002% bromophenol blue) were used to
135 rehydrate strips of 11 cm, pH 4-7 (Immobiline Dry Strip; GE Healthcare) for 16 hours
136 at room temperature. Proteins were focused using the Multiphor II equipment (GE
137 Healthcare) according to the manufacturer recommendations. After focusing, proteins
138 were reduced and alkylated (strips were equilibrated in DTT and iodoacetamide
139 solutions) and the strips were placed on a 12% SDS-PAGE gel (38). For separation of
140 proteins on the second dimension, electrophoresis was carried out on the Multiphor II
141 equipment (GE Healthcare) as a flatbed system, following the conditions recommended
142 by the manufacturer. The gels were stained with Coomassie blue G-250, digitalized, and
143 images were analyzed using the ImageMaster 2D Platinum v5.0 software (GE
144 Healthcare). For each condition tested (control or calcium) three gels were produced,
145 two of them loaded with protein samples extracted from the same culture and a third
146 one with a protein sample extracted from a different culture. Isoelectric point (pI) values
147 of the proteins of interest were determined using a linear 4–7 distribution and the
148 molecular mass (MM) was estimated based on protein low molecular mass markers (GE
149 Healthcare).

150 **Spots** on 2D gels were initially detected automatically with ImageMaster 2D Platinum
151 v5.0 software and then manually confirmed. In each gel class (control or calcium) spots
152 intensities were normalized and the three replicate gels were matched (17). A set of
153 spots characteristic of each experimental condition was defined selecting those spots
154 consistently present in replicate gels, thus generating one control master gel and one
155 calcium master gel.

156 In order to identify differently expressed proteins, images of the two master gels were
157 matched. Spot intensity was evaluated using the relative volume parameter, expressed
158 as:

$$159 \quad \%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vol_s} \times 100$$

160 **Where**, Vol_s is the volume of spot S in a gel containing n spots.

161 **This** is a normalized value which minimizes experimental variations between replicate
162 gels (Image Master 2D Platinum software version 5.0 User Manual). Spots were
163 considered differentially expressed (i) if the mean of $\%Vol$ differed more than two fold
164 between the control and calcium conditions (ii) if the $\%Vol$ values showed little
165 dispersion (mean squared deviation) in replicate gels, and if (iii) dispersion of $\%Vol$
166 values in each condition did not overlap for more than 25%.

167 **Protein identification by mass spectrometry**

168 **Protein** spots were cut from gels, washed twice in 50% acetonitrile (ACN) in 25 mM
169 NH_4HCO_3 , placed in 100% ACN, and dried under vacuum. Gel fragments were treated
170 with porcine trypsin ($15 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (Promega) and peptides were extracted with 50 μl of
171 50% ACN, 5% trifluoroacetic acid (TFA), vacuum dried, and added to 3 μl of 50%
172 ACN, 0.1% TFA. An aliquot of 0.5 μl of sample was mixed with an equal volume of a
173 saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in 50% ACN, 0.1% TFA.
174 The mix was spotted onto a MALDI-TOF sample plate and allowed to crystallize at

175 room temperature. MALDI-TOF-TOF analysis was performed in a 4700 Explorer
176 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Precursor ion fragmentation was obtained
177 using N₂ as collision-induced dissociation gas and collision cell pressure was kept at 2.8
178 × 10⁻⁶ Torr. Trypsin autolysis peptide masses 842.5 and 2211.1 and calibration mixture
179 1 or 2 (Sequazyme Peptide Mass Standard kit, PerSeptive Biosystems) were used,
180 respectively, as internal and external standards. The resulting spectra were used to
181 search the NCBI database (version available on 09/30/2008) using the MASCOT
182 program interface (www.matrixscience.com). The search parameters allowed for
183 oxidation of methionine, carbamidomethylation of cysteine and one mis-cleavage of
184 trypsin. A mass tolerance of 100 ppm was used. The criteria for identification were a
185 Mascot score above 50 (P<0.05), and a minimum of 2 peptides from the mass spectra
186 with hits in the database. In those cases where identification was provided by a MS/MS
187 spectrum of good quality, the other criteria were not considered.

188 **Statistical analysis**

189 **Growth** and STX data were expressed as mean values ± standard error (SE). Data for
190 each experimental variable were tested for normality. Differences among standard
191 deviations were determined using Kolmogorov and Smirnov's test and Barlett's test,
192 respectively. As these data were classified as nonparametric, ANOVA was performed
193 using the Kruskal-Wallis (KW) test for multiple comparisons. Dunn's test was used to
194 determine the specific differences between two treatments. For specific comparisons of
195 STX production, the nonparametric Mann-Whitney U-test was performed. All tests
196 were performed with significance of 95% (P<0.05) using the GraphPad InStat 3.0
197 application. Protein data were analyzed using t-test to compare the relative volume of
198 spots on gel images with significance of 80% (P<0.2) using the ImageMaster 2D
199 Platinum software version 5.0 (GE Healthcare).

200 **Results**

201 **Effect of calcium on cellular growth**

202 *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3) presented an exponential growth phase until the
203 9th day, at control condition. The addition of CaCl₂ (10 mM Ca²⁺) to the medium
204 reduced cellular growth and an exponential growth phase was observed until the 6th day
205 of culturing (Fig. 1). Relative growth rates (μ), measured during exponential growth,
206 did not present any significant difference between control ($\mu = 0.26 \pm 0.04$) and calcium
207 ($\mu = 0.23 \pm 0.22$) treatment (U-test; P>0.05). However, when considering the ratio
208 between final and initial cell numbers per millilitre, it is evident that cell growth was
209 inhibited by high Ca²⁺ (control = 12.30 ± 1.37 and 10 mM Ca²⁺ = 1.58 ± 0.31 ; U-test;
210 P<0.01). Thus, at the stationary phase, the total cell number was significantly lower in
211 the presence of 10 mM Ca²⁺ as in comparison to control (days 12 and 15; U-test; P<0.05
212 and P<0.01, respectively).

213 **Effect of calcium on STX production by *C. raciborskii* (T3)**

214 **In** order to evaluate the effect of exposure to calcium on STX production by *C.*
215 *raciborskii* (T3), intracellular STX content was measured from cells collected at the 12th
216 day of growth, corresponding to the stationary phase, and data were normalized to 10⁶
217 cells. Exposure to 10 mM Ca²⁺ inhibited the production of STX by 2.7 fold in
218 comparison to the control condition (20 μ M Ca²⁺) (U-test; P<0.001). The STX values
219 measured were 0.49 ± 0.08 ng.10⁻⁶ cells in control and 0.18 ± 0.02 ng.10⁻⁶ cells in 10
220 mM Ca²⁺ condition.

221 **Differently expressed proteins**

222 **For** the analysis of differently expressed proteins comparing calcium and control
223 conditions, 2D gels were done in triplicate for each condition. On average 135 spots

224 were clearly resolved on each gel. Representative 2D gels from both conditions are
225 shown in Figure 2.

226 **Considering** those spots representing a difference of at least two fold in expression
227 between the two conditions, a total of 35 proteins were defined as differently expressed
228 and selected for identification. From these 35 proteins, only 5 were more abundant in
229 the presence of calcium than in the control condition. Fifteen proteins were identified by
230 MS analysis; some proteins were identified from multiple spots (spots 33 and 34; spots
231 63, 64 and 67, Table 1, Figure 2). These proteins appeared as spots of variable pI values
232 but same MM, possibly resulting from post translational modifications. The remaining
233 proteins could not be identified due to their low amount in the gel spots or to mixture of
234 proteins, resulting in poor quality of mass spectra.

235 A homology based search in protein databases provided in all cases proteins of
236 cyanobacterial origin as the best results. For each protein, the values of MM and pI
237 estimated from the spot position on the gel and those of the homologous protein
238 retrieved were compared (Table 1). In most cases these values were similar. Putative
239 functions and patterns of differential expression are also presented on Table 1. Most of
240 the proteins were assigned to primary metabolism (energetic metabolism, protein
241 synthesis, photosynthesis). Except for phycocyanin, all the identified proteins were
242 more expressed under control in comparison to calcium condition.

243 **The** most intense signal in all gels corresponded to a group of clustered spots with MM
244 of approximately 20 kDa and pI between 4 and 5, probably containing a few co-
245 migrating proteins. A corresponding gel fragment was processed for peptide
246 identification by MS analysis, which indicated the presence of a phycocyanin subunit
247 (Table 1, Figure 2).

248 **Discussion**

249 **In** Bacteria, Ca^{2+} is involved in many different processes such as maintenance of cell
250 structure, motility, transport, competence, pathogenesis, cell differentiation and gene
251 expression (14, 27). The intracellular Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *Escherichia coli* is
252 tightly regulated (from 170 to 300 nM), and these values change in response to various
253 external Ca^{+2} concentrations (20). Upon exposure to 10 mM Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased to
254 5.4 μM while depletion of Ca^{2+} reduced free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to levels lower than the resting
255 values. In general $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is maintained at 1000 times less than the concentration outside
256 the cell (20). Cytosolic free- Ca^{+2} concentrations are controlled by a balance between
257 influx of external calcium via calcium channels and efflux mechanisms such as ATP-
258 requiring Ca^{+2} pumps and $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$ or $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^{+}$ antiporters in prokaryotic cells (14, 20,
259 27, 42).

260 **In** this study, a concentration of 10 mM defined a high calcium medium. This
261 concentration was established based on the calcium content of some Brazilian water
262 reservoirs in which the dominance of *C. raciborskii* is common (3, 8, 9, 10-13), and is
263 significantly higher than those reported in other studies with cyanobacteria. For
264 example, 0.2 mM Ca^{2+} for *C. raciborskii* (15) and up to 1.25 mM Ca^{2+} for *Lyngbia*
265 *wollei* (44) were demonstrated as favorable to growth.

266 In the present study, the addition of 10 mM Ca^{2+} did not modify relative growth rate
267 during exponential growth of *C. raciborskii* (T3). However, cells entered stationary
268 phase earlier than in control condition and a significant reduction in the final number of
269 cells. ml^{-1} was observed. Reduced growth in response to salinity was reported for
270 cyanobacteria as an effect of NaCl concentration (up to 40 mM), with inhibition of
271 photosynthetic and respiratory systems (1, 2). Moisander and colleagues (28) described
272 a decrease in growth rates of two *C. raciborskii* strains at NaCl concentrations of 36 to
273 108 mM, and Pomati and colleagues (36) showed that 10 mM NaCl reduced growth of

274 the T3 strain after 6 days of exposure. These authors suggest that excess of NaCl
275 impose an energy dispend due to the intense activity of Na⁺/H⁺ antiporters to maintain
276 cellular homeostasis. Similarly, the required activity of Ca²⁺ efflux mechanisms would
277 imply an extra energetic demand to maintain Ca²⁺ homeostasis, which could explain the
278 limited growth rate of cells maintained in the presence of high Ca²⁺ concentrations.

279 **Cultivation** of *C. raciborskii* (T3) in the presence of 10 mM NaCl caused an increase in
280 cellular Na⁺, coupled with accumulation of STX (36). The authors considered the
281 possibility of regulation of STX metabolism in response to cellular Na⁺ concentration
282 and suggested that STX biosynthesis can be related to cellular homeostasis. We
283 observed that exposure to a high Ca²⁺ concentration inhibited STX production by 36.7
284 %. Recently, Kellman and Neilan (21) studied *C. raciborskii* saxitoxin biosynthesis *in*
285 *vitro* and showed that it was inhibited by Ca²⁺ at 1 mM. Alternatively, it is possible that
286 the accentuated decrease in saxitoxin production observed in the presence of Ca²⁺ (2.7
287 fold) is a consequence of the lower cellular growth and reduced metabolic activity
288 found in this condition, rather than a direct effect of the ion on the toxin synthesis. In
289 another investigation done by our group on the effect of different ions on growth and
290 toxicity of *C. raciborskii* (T3) strain (8), calcium was added in the medium as CaCO₃ (5
291 mM). After 12 days, cellular growth was inhibited and STX production was reduced as
292 compared to control (8). In other toxic cyanobacterial species such as *Microcystis*
293 *aeruginosa* and *L. wollei* biomass production and toxicity are also correlated (24, 44).

294 **The** analysis of protein expression profiles comparing control (20 μM Ca²⁺) and high
295 Ca²⁺ (10 mM) conditions was performed in order to evaluate the physiological response
296 of the cyanobacterium to the presence of different concentrations of this ion. From the
297 35 proteins differently expressed, only five were more abundant in Ca²⁺ in comparison
298 to control. Among the identified proteins, those involved in energy metabolism

299 represented the majority and all of them were more abundant in control conditions than
300 upon exposure to Ca^{2+} . This picture indicates that exposure to Ca^{2+} is a stressful
301 condition which decreases expression of a number of enzymes involved in the basal
302 metabolism. In fact, the proteins which showed the highest difference in expression
303 between control and Ca^{2+} conditions were ATPase beta subunit (10 fold higher in
304 control), pyruvate dehydrogenase subunit E1 (10 fold higher in control) and
305 phosphoglycerate kinase (6 fold higher in control). As already mentioned, the reduction
306 in the basal metabolism of *C. raciborskii* in high Ca^{2+} can be due to the extra demand
307 used for the efflux of Ca^{2+} , using systems that transport this ion across the membrane at
308 the expense of ATP. It must also be considered that under high Ca^{2+} cells entered
309 stationary phase earlier than in control condition, thus at the moment of sampling (12th
310 day of culturing) it is expected that cells exposed to Ca^{2+} will show a general reduction
311 in metabolism in comparison to control, even if some specific enzymes related to Ca^{2+}
312 efflux could be more active.

313 **Two** proteins with higher expression in the control condition (2-3 folds higher) were
314 DnaK and superoxide dismutase. In bacteria superoxide dismutase is constitutively
315 expressed, protecting the cell against oxidative stress, and it is also regulated, increasing
316 as a function of oxygen in stationary phase (39). In the present study, *C. raciborskii*
317 cells were collected on the 12th day, thus oxygen and phase of growth were similar on
318 both experimental conditions. DnaK is a member of the Hsp70 family of heat shock
319 induced proteins. These proteins are involved in protein folding, secretion and
320 degradation and prevention of protein aggregation. The main signal for the induction of
321 these proteins is a stressful condition, but they are also constitutively expressed in the
322 cell (25). Sod and DnaK were possibly more expressed in control conditions due to the

323 highest growth rate and metabolic activity of the cells in comparison to cultures exposed
324 to Ca^{2+} .

325 **Another** protein preferentially expressed in control cultures was a homologue of a
326 TonB dependent receptor. TonB dependent receptors are membrane associated proteins
327 that participate in the active transport of siderophores and nutrients (37). The presence
328 of this protein was not expected in a soluble protein fraction as that used for our
329 analysis and may represent a contamination with the membrane fraction during the
330 procedure of protein isolation. Finally, a protein homologous to a hypothetical protein
331 from *Nostoc* was also more abundant in control than in high Ca^{2+} medium.

332 **The** only identified protein more abundant in high Ca^{2+} than control was a *C.*
333 *raciborskii* phycocyanin. Phycocyanin is an accessory pigment that participates in the
334 antenna complex, responsible for light harvesting in cyanobacteria (33). In waters with
335 CO_2 , carbonate precipitation can occur, so it is expected that a fraction of added Ca^{2+}
336 will precipitate as CaCO_3 , which is highly insoluble and increases water turbidity (23,
337 26, 31). Measurements of free Ca^{2+} concentrations in the culture media, before
338 inoculation, indeed showed a decreased amount of this ion in relation to the original
339 concentrations, both in ASM-1 (from 20 μM to $17.93 \pm 0.01 \mu\text{M}$) and in ASM-1 with
340 added Ca^{2+} (from 10 mM to $7.86 \pm 0.88 \text{ mM}$). Addition of CaCl_2 to the culture medium
341 increased turbidity from 3.25 ± 0.38 turbidity units in ASM-1 to 7.28 ± 0.35 turbidity
342 units in ASM-1 added Ca^{2+} . The synthesis of pigments may be a response to this
343 situation to improve light capture by the antenna complex providing extra energy to
344 compensate for the reduced light intensity.

345 **The** present work showed that a high Ca^{2+} concentration (10 mM) limits the growth of
346 *C. raciborskii* (T3), decreases STX content and affects the expression of proteins related
347 to primary metabolism, indicating that a continued exposure to Ca^{2+} represents a

348 stressful condition to these cells, probably due to the charge to maintain Ca^{2+}
349 homeostasis. Little is known about Ca^{2+} transport in cyanobacteria. In *Synechocystis* sp.
350 PCC6803 a mechanosensitive ion channel in the plasma membrane can be involved in
351 Ca^{2+} homeostasis under temperature stress conditions (32) and a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter was
352 identified that catalyzes the efflux of Ca^{2+} and is essential for salt tolerance at alkaline
353 pH (42). The control of cytosolic free Ca^{2+} concentration and the use of transient
354 increases in intracellular free Ca^{2+} as signalling (40, 41), suggests that cytosolic free
355 Ca^{2+} above micromolar may be toxic in bacteria, as is the case in eukaryotes (14).

356 **While** extrapolation from laboratory conditions to a natural environment should be
357 considered with caution, it can be postulated that in hard waters as those described as
358 natural habitats of *C. raciborskii* in Brazil, cells use active Ca^{2+} transport to cope with
359 Ca^{2+} overload, which possibly poses a considerable stress to the cyanobacterium. It
360 would be interesting to test in environmental samples if high Ca^{2+} concentrations can
361 act as a limiting factor for growth, bloom formation or persistence and toxigenicity.

362 **Studies** relating limnologic features with composition and temporal dynamics of
363 phytoplankton usually evaluate conductivity, salinity or hardness (3, 12). Such
364 parameters however only poorly define water in terms of specific ionic composition.
365 The work presented here is a preliminary step in investigating, under culture conditions,
366 the effect of different ions individually on the physiology of a toxic *C. raciborskii*
367 strain, which may contribute to identify physicochemical factors that can be related to
368 the dominance and toxigenicity of this species in the environment.

369 **Acknowledgments**

370 The first author wishes to thank CAPES for the fellowship during his Ph.D. studies.
371 A.C.N. Alípio received a fellowship from CNPq. This work was supported by FAPERJ
372 (grant no. E26/100.613/2007) and CNPq (grant no. 410765/2006-6).

373 We thank W.M.A. von Kruger for helpful advice, L. Ayres de Sá for technical
374 assistance with proteomic experiments and P.R. Koscheck for assistance with cell counts.

375 **References**

- 376 1. **Allakhverdiev, S. I., and N. Murata.** 2008. Salt stress inhibits
377 photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **98**:529-539.
- 378 2. **Bhadauriya, P., R. Gupta, S. Singh, and P. S. Bisen.** 2007. Physiological
379 and Biochemical Alterations in a Diazotrophic Cyanobacterium *Anabaena*
380 *cylindrica* Under NaCl Stress. *Curr. Microbiol.* **55**:334-338.
- 381 3. **Bouvy, M., M. Falcão, M. Marinho, M. Pagano, and A. Moura.** 2000.
382 Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 tropical reservoirs
383 during the 1998 drought. *Aq. Microbiol. Ecol.* **23**:13-27.
- 384 4. **Bouvy, M., R. J. R. Molica, S. De Oliveira, M. Marinho, and B. Becker.**
385 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis*
386 *raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil.
387 *Aq. Microbiol. Ecol.* **20**:285-297.
- 388 5. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification
389 of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
390 binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- 391 6. **Briand, J. F., C. Leboulanger, J. F. Humbert, C. Beranrd, and P.**
392 **Dufour.** 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at
393 mid latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J.*
394 *Phycol.* **40**:231-238.
- 395 7. **Carneiro, R. L., M. E. V. dos Santos, A. B. F. Pacheco, and S. M. F. O.**
396 **Azevedo.** 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and
397 circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii*

- 398 (cyanobacteria). J. Plank. Res. **31**:481- 488.
- 399 8. **Carneiro, R. L.** 2009. Ph.D. Thesis. Federal University of Rio de Janeiro,
400 Rio de Janeiro, Brazil.
- 401 9. **Chellappa, N. T., and M. A. M. Costa.** 2003. Dominant and co-existing
402 species of Cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do
403 Norte State, Brazil. Acta Oecol. **24**: S3-S10.
- 404 10. **Chellappa, N. T., J. M. Borba, and O. Rocha.** 2008. Phytoplankton
405 community and physical-chemical characteristics of water in the public
406 reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. Braz. J. Biol. **68**:477-494.
- 407 11. **Chellappa, N. T., S. L. Chellappa, and S. Chellappa.** 2008. Harmful
408 phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of
409 northeast Brazil. Braz. Arch. Biol. Technol. **51**:833-841
- 410 12. **Costa I. A. S., S. R. S. Cunha, R. Panosso, M. F. F. Araújo, J. L. S. Melo,**
411 **and E. M. Eskinazi-Sant'Anna.** 2009. Dynamics of cyanobacteria in
412 eutrophic water research of a semi-arid region in Brazil. Oecol. Bras.
413 **13**:382-401.
- 414 13. **Costa, I. A. S., S. M. F. O. Azevedo, P. A. C. Senna, R. R. Bernardo, S.**
415 **M. Costa, and N. T. Chellappa.** 2006. Ocurrence of toxin-producing
416 cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. Brazil. J. Biol.
417 **66**:211-219.
- 418 14. **Dominguez, D. C.** 2004. Calcium signalling in bacteria. Mol. Microbiol.
419 **54**:291-297.
- 420 15. **Dufour, P., G. Sarazin, C. Quiblier, S. Sane, and C. Leboulanger.** 2006.
421 Cascading nutrient limitation of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis*
422 *raciborskii* in a Sahelian lake (North Senegal). Aq. Microb. Ecol. **44**:219-

- 423 230.
- 424 16. **Fogg, G. E., and B. A. Thake.** 1987. Algal cultures and phytoplankton
425 ecology. 3rd ed. The University of Wisconsin Press, Madison, WI.
- 426 17. **GE Healthcare.** 2000. GeneBio, Swiss-Institute-of-Bioinformatics,
427 ImageMaster 2D Platinum Software version 5.0 User manual, GE
428 Healthcare.
- 429 18. **Gorhan, P., J. R. Maclachlav, V. T. Hammer, and W. K. Kim.** 1964.
430 Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de
431 Bréb. Verh. Intern. Ver. fur Theor. Ang. Limnol. **15**:796-804.
- 432 19. **Gugger, M., R. J. R. Molica, B. Le Berre, P. Dufour, C. Bernard, and J.**
433 **F. Humbert.** 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains
434 (Cyanobacteria) isolated from four continents. Appl. Environ. Microbiol.
435 **71**:1097-1100.
- 436 20. **Jones, H. E., I. B. Holland, H. L. Baker, and A. K. Champbell.** 1999.
437 Slow changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Escherichia coli* highlight two
438 putative influx mechanisms in response to changes in intracellular calcium.
439 Cell Calcium **25**:265-274.
- 440 21. **Kellman, R., and B. A. Neilan.** 2007. Biochemical characterization of
441 paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. J. Phycol. **43**: 497-508.
- 442 22. **Lagos, N., H. Onodera, P. A. Zagatto, D. Andrinolo, S. M. F. O.**
443 **Azevedo, and Y. Oshima.** 1999. The first evidence of paralytic shellfish
444 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*
445 isolated from Brazil. Toxicon. **37**:1359-1373.
- 446 23. **Lee, B. D., A. W. Apel, and M. R. Walton.** 2006. Calcium carbonate
447 formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp.

- 448 strain PCC 8807. *Biores. Technol.* **97**:2427-2434.
- 449 24. **Long, B. M., G. J. Jones, and P. T. Orr.** 2001. Cellular microcystin
450 content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth
451 rate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:278-283.
- 452 25. **Lund, P.** 2001. *Molecular chaperones in the cell.* Oxford University Press,
453 N.Y.
- 454 26. **Maia, C. E., E. R. C. Morais, and M. Oliveira.** 2001. Estimate of the
455 calcium carbonate applied through irrigation water in Chapada do Apodi and
456 Baixo Açu regions of Rio Grande do Norte, Brazil. *R. Bras. Eng. Agríc.*
457 *Ambiental.* **5**:71-75.
- 458 27. **Michiels, J., X. Chuanwu, J. Verhaert, and J. Vanderleyden.** 2002. The
459 functions of Ca²⁺ in bacteria: a role of EF-hand proteins? *Trends in*
460 *Microbiology.* **10**:87-93.
- 461 28. **Moisander, P. H., E. McClinton III, and H. W. Paerl.** 2002. Salinity
462 effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in
463 estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecol.* **43**:432-442.
- 464 29. **Molica, R. J. R., E. J. A. Oliveira, P. V. V. C. Carvalho, A. P. N. S. F.**
465 **Costa, M. C. C. Cunha, G. L. Melo, and S. M. F. O. Azevedo.** 2005.
466 Ocurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in
467 Brazilian drinking water supply. *Harmfull Algae.* **4**:743-753.
- 468 30. **Molica, R. J. R., H. Onodera, C. Garcia, M. Rivas, D. Andrinolo, S.**
469 **Nascimento, H. Merguro, Y. Oshima, S. M. F. O. Azevedo, and N.**
470 **Lagos.** 2002. Toxins in freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis*
471 *raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru,
472 Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycol.*

- 473 **41**:606-611.
- 474 31. **Morais, E. R. C., C. E. Maia, and M. Oliveira.** 1998. Irrigation water
475 quality in analytical samples of the soil and geology department database,
476 Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró-RN. *Caatinga* **11**:75-
477 83.
- 478 32. **Nazarenko, L.V., I. M. Andreev, A. A. Lyukevich, T. V. Pisareva, and D.**
479 **A. Los.** 2003. Calcium release from *Synechocystis* cells induced by
480 depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca²⁺ channel.
481 *Microbiol.* **149**:1147-11-53
- 482 33. **Nelson, D. L., and M. M. Cox.** 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry.*
483 4th ed. W.H Freeman and Company, N.Y.
- 484 34. **Oshima, Y.** 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method
485 for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Intern.* **78**:528-532.
- 486 35. **Padisák, J.** 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosynska) Seenaya et
487 Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide
488 distribution and review of its ecology. *Archiv fur Hydrobiologie.* **107**:563-
489 593.
- 490 36. **Pomati, F., C. Rosseti, G. Manarolla, B. P. Burns, and B. A. Neilan.**
491 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production
492 in *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3). *Microbiol.* **150**: 455-461.
- 493 37. **Postle, K., and R. J. Kadner.** 2003. Touch and go: tying TonB to transport.
494 *Mol. Microbiol.* **47**:903-915.
- 495 38. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory*
496 *manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 497 39. **Shirkey, B., D. P. Kovarcik, D. J. Wright, G. Wilmoth, T. F. Prickett, R.**

- 498 **F. Helm, E. M. Gregory, and M. Potts.** 2000. Active Fe-Containing
499 Superoxide Dismutase and Abundant *sodF* mRNA in *Nostoc commune*
500 (Cyanobacteria) after Years of Desiccation. *J. Bacteriol.* **182**:189-197.
- 501 40. **Torrecilla, I., F. Leganés, I. Bonilla, and F. Fernández-Piñas.** 2004. A
502 calcium signal is involved in heterocyst differentiation in the
503 cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiol.* **150**:3731-3739.
- 504 41. **Torrecilla, I., F. Leganés, I. Bonilla, and F. Fernández-Piñas.** 2004.
505 Light-to-dark transitions trigger a transient increase in intracellular Ca^{2+}
506 modulated by the redox state of the photosynthetic electron transport chain
507 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Plant Cell Environ.* **27**:810-
508 819.
- 509 42. **Waditee, R., G. S.Hossain, Y. Tanaka, T. Nakamura, M. Shikata, J.**
510 **Takano, T. Takabe, and T. Takabe.** 2004. Isolation and Functional
511 Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporters from Cyanobacteria. *J. Biol. Chem.*
512 **279**:4330-4338.
- 513 43. **Wiedner, C., J. Rücker, R. Brüggemann, and B. Nixdorf.** 2007. Climate
514 changes affect timing and size of populations of an invasive cyanobacterium
515 in temperate regions. *Oecol.* **153**: 473-48.
- 516 44. **Yin, Q., W. W. Carmichael, and W. R. Evans.** 1997. Factors influencing
517 growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium
518 *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *J. Appl. Phycol.* **9**:55-63.
519

520 Figure 1 - *C. raciborskii* (T3 strain) growth variation in batch cultures in ASM-1
521 medium or ASM-1 with Ca²⁺ (10 mM), during 15 days. Error bars are standard errors.
522 Figure 2 - 2D protein patterns of *C. raciborskii* (T3 strain) grown in ASM-1 medium
523 (A) or in ASM-1 with 10 mM Ca²⁺ (B) for 12 days. Soluble proteins were separated
524 using a linear pH 4-7 gradient and a 12% SDS-PAGE; gels were stained with
525 Coomassie G250. Protein spots are identified by the same numbers presented on Table
526 1.

Table 1- *C. raciborskii* (T3 strain) proteins differently expressed (at least 2 fold) at stationary phase (12 days) comparing growth in ASM-1 medium and ASM-1 medium supplied with Ca²⁺ at 10 mM.

Spot no.	Accession	Protein identification (based on homology)	Apparent MM ^b (KDa)/pI ^c	MM ^b (KDa)/pI ^c of homologue protein	Functional category	Most expressed condition
39 ^a	gi 142006	ATPase beta-subunit	56/5.10	50.8/5.10		
28	gi 17227501	F0F1 ATP synthase subunit alpha	64/5.1	54.4/5.11		
124	gi 113475215	Inorganic diphosphatase	24/4.9	19.3/4.84	Energy metabolism	Control
93 ^a	gi 119509590	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	39/5.6	36.4/5.31		
60 ^a	gi 17231623	Phosphoglycerate kinase	50/5	42.5/5.15		

63	gi 17232055	Fructose-1,6- biphosphate aldolase	45/5.3	38.7/5.49	
64	gi 17232055	Fructose-1,6- biphosphate aldolase	45/5.6	38.7/5.49	
67	gi 17232055	Fructose-1,6- biphosphate aldolase	45/5.5	38.7/5.49	
99 ^a	gi 186683980	Transketolase, central region	39/5.6	36.3/5.31	
119	gi 22299912	Ribulose-phosphate 3- epimerase	27/5.9	25.1/5.37	Photosynthesis
33	gi 417058	Glutamine synthetase	62/5.7	53.5/5.22	Biosynthesis of
34	gi 417058	Glutamine synthetase	58/5.6	53.5/5.22	amino acids
65	gi 159154294	Elongation factor Tu	45/5.0	30.1/4.76	Protein synthesis
3	gi 17229234	Molecular chaperone DnaK	78/4.8	68.0/4.84	Chaperone

132	gi 6693856	Superoxide dismutase	23/5.5	22.3/5.48	Detoxification
4	gi 186681644	TonB-dependent receptor, plug	78/5.6	76/4.68	Transport, membrane receptor
115	gi 17232471	Hypothetical protein alr4979	28/5.5	24.2/5.70	Unknown
147	gi 20136749	Phycocyanin beta subunit	17/6.3	18.4/5.02	Photosynthesis Calcium

^aProteins with most prominent differential expression, 6 to 10 fold more abundant in control as compared to calcium treatment.

^bMolecular mass.

^cIsoelectric

point.

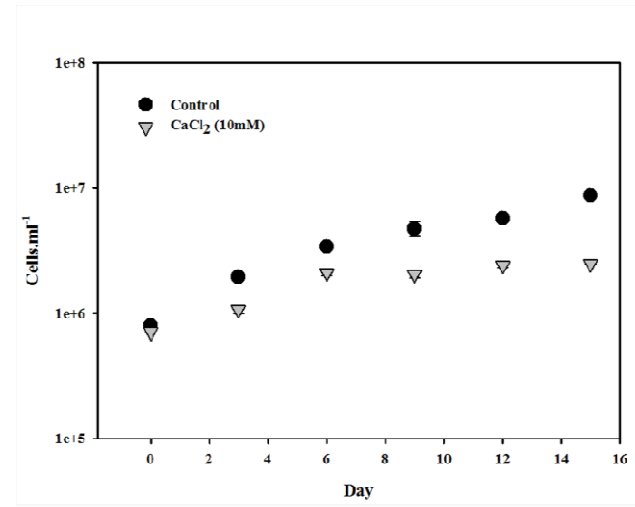


Figure 1

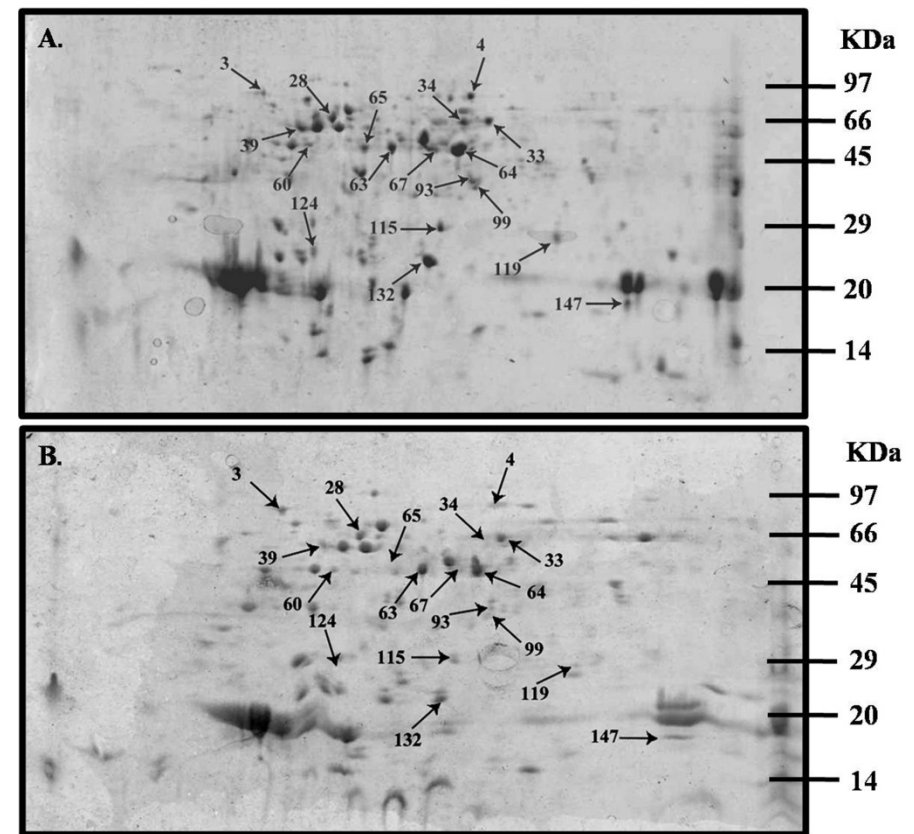


Figure 2

Anexo 4

O crescimento e a produção de cilindropermopsina por *Cylindropermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) são afetados pela luz?

“Carneiro, RL, Magalhães, VF, Azevedo, SMFO. Are growth and cylindropermopsin production by affected by light?. Manuscrito à ser submetido ao periódico Phycologia.

1 Are growth and cylindrospermopsin production in *Cylindrospermopsis raciborskii*
2 (Cyanobacteria) affected by high light intensity?

3 Ronaldo Leal Carneiro*, Valéria Freitas de Magalhães and Sandra Maria Feliciano de
4 Oliveira e Azevedo

5 Laboratory of Cyanobacterial Ecophysiology and Toxicology, Institute of Biophysics Carlos
6 Chagas Filho, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
7 Brazil

8 *Corresponding author (rleal@biof.ufrj.br)

9 **Abstract**

10 Low light intensity is reported as an important factor responsible to *Cylindrospermopsis*
11 *raciborskii* success, and cylindrospermopsin production can be affected by light intensity .
12 Effects of light intensity on growth and cylindrospermopsin production by two *C. raciborskii*
13 strains (strains CYP 011K and CYP 030A) was investigated in batch cultures conditions. Four
14 light intensities 40, 60, 100 and 348 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ were used. CYP011K strain
15 (maintained at 40, 60 or 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) presented the highest relative growth rate
16 at 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and CYP030A strain (maintained at 100 or 348 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
17 did not show any difference in growth rates. Cells of CYP011K presented highest
18 Chlorophyll-*a* (Chl-*a*) concentrations at 40 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and when compared to
19 CYP030A strain produce twice higher concentration of Chl-*a*, at 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at
20 exponential as well as at stationary phase. Different interpretations could be done when CYN
21 production was normalized per 10^6 cells or per Chl-*a* content. However, the two strains
22 studied did not present any statistical differences in cylindrospermopsin (CYN) production
23 per cell or per Chl-*a* (μg) at different light treatments or between exponential and stationary
24 phases. These observations are important because no effects of light intensity on
25 cylindrospermopsin production by CYP011K and CYP030A strains can be considered. A

26 better definition on analysis of CYN production by *C. raciborskii* is requested to explain the
27 physiology of *C. raciborskii* under different environmental stimuli.

28 Key words: *Cylindrospermopsis raciborskii*, chlorophyll-*a*, cylindrospermopsin per cell,
29 cylindrospermopsin per Chlorophyll-*a*, growth, light intensity.

30 Introduction

31 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju is a planktonic,
32 nitrogen-fixing, bloom-forming, freshwater cyanobacterium. *C. raciborskii* has become a
33 notorious cyanobacterium, due to its invasive capacity associated to global warming and
34 being described worldwide (Hawkins *et al.*, 1985; Dokulil & Mayer, 1996; Chapman &
35 Schelske, 1997; Padisák, 1997; Bouvy *et al.*, 1999; Lagos *et al.*, 1999; McGregor & Fabbro,
36 2000; Saker *et al.*, 2003; Briand *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2004; Burford *et al.*, 2006;
37 Wiedner *et al.*, 2007; Haande *et al.*, 2008). The increased proliferation of *C. raciborskii* is of
38 particular concern due to the ability to produce toxins (Haande *et al.*, 2008). This species was
39 first associated with a human poisoning incident on Palm Island, Australia, in 1979 (Hawkins
40 *et al.*, 1985). Subsequently, Ohtani and colleagues indentified a potent hepatotoxic alkaloid
41 containing a cyclic guanidine named cylindrospermopsin (CYN) from *C. raciborskii* strains
42 (Othani *et al.*, 1992). Since 1992, several strains of *C. raciborskii* from Australia and Asia
43 have been frequently described as CYN producers (Li *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 1997;
44 Saker *et al.*, 1999; Griffiths & Saker, 2003).

45 *C. raciborskii* can grow under different nutrient conditions, with different sources of nitrogen
46 and low phosphate concentrations (Saker & Neilan, 2001; Padisák, 1997). Optimal growth is
47 reported at temperatures usually above 25°C (Griffiths & Saker, 2003; Masten, 2000). It also
48 has reported as shade-tolerant, low light intensities and optically deep mixing are thought to
49 increase its dominance (Padisák, 1997; Padisák & Reynolds, 1998; Wiedner *et al.*, 2007;
50 O'Brien *et al.*, 2009). However, some authors have assumed that in different water bodies

51 there is not a strong correlation between *C. raciborskii* bloom and CYN concentration
52 samples and furthermore associations between growth and CYN concentrations are variable
53 and unpredictable (Griffiths & Saker, 2003).

54 Despite of *C. raciborskii* has described as adapted to low light intensities, these cells have
55 acquired advantages both in low and high light intensities (Briand *et al.*, 2002). Blooms of
56 this species have occurred under unsteady light intensities in Brazilian reservoirs from 14 to
57 830 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at 0.5 meters of deep (Bouvy *et al.*, 1999; Bouvy *et al.*, 2003). Light
58 intensity can be considered as growth and metabolism regulator of phytoplankton species and
59 have major importance for regulating the dynamics of populations of *C. raciborskii*
60 (Reynolds, 2006; Wiedner *et al.*, 2007). Considering this observations, it is reasonable to
61 admit light intensity as a regulator of *C. raciborskii* growth and its ability to produce toxins.
62 Although few studies have been developed to understand the relation between light intensity
63 and CYN production by *C. raciborskii* in controlled conditions, results have revealed some
64 contradictions.

65 This report was developed to extend the knowledge of the effects of light intensity on growth
66 and CYN production by two *C. raciborskii* strains.

67 Materials and Methods

68 **Strain maintenance and growth conditions**

69 CYP011K and CYP030A *C. raciborskii* strains were used. These strains were kindly provided
70 by Dr. Andrew Humpage (Australian Water Quality Centre, Australia) and confirmed as CYN
71 producers by high performance liquid chromatographic (HPLC) techniques. The strains have
72 been maintained in the culture collection at the Laboratory of Cyanobacterial Ecophysiology
73 and Toxicology (IBCCF^o - UFRJ). Nonaxenic batch cultures of these strains were maintained
74 in ASM-1 medium (Gorhan *et al.*, 1964) with aeration, at $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, with a 12 hours L:D cycle
75 and photon flux of $40\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (provided by common day light fluorescent

76 lamps). The light in maintenance conditions and in all experiments was measured with a
77 quanta sensor (QST-100 Box – Biospherical Instruments Inc.).

78 **Growth, Chlorophyll -a and CYN production**

79 CYP011K and CYP030A strains were maintained at different high light intensities before
80 experimental tests to verify the highest light intensity they could survive. Cultures of
81 CYP011K maintained at light intensities above $100\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ presented great
82 number of cell lysis. Same was occurred with CYP030A at light intensities above $348\mu\text{mol}$
83 $\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (data not shown). According to these observations the highest light intensity to
84 each strain has chosen. CYP011K culture in stationary phase was maintained in conditions
85 described above until the end of the exponential phase. This culture was then sub-divided to
86 be exposed to 40, 60 and $100\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ over 5 generations. These adapted cultures
87 were used as inocula for experimental tests. Cultures were initiated with approximately $1.0 \times$
88 10^6 cells per milliliter inoculated into 3-liter glass balloons (straight bottom) with 2 liters of
89 ASM-1 medium. Then, these cultures was exposed to 40, 60 and $100\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, at
90 $24\pm 2^\circ\text{C}$ with a 12 hours of L:D cycle. Light and temperature reflect those that would be
91 expected in natural environments where several *C. raciborskii* populations are found. Same
92 procedure was performed to adapt and to do experimental test with CYP030A strain. Light
93 intensities used in experiments with CYP030A strain were 100 and $348\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.
94 Each condition was performed in triplicate.

95 To determine cellular growth, samples were harvested every day during 12 days, under
96 sterilized conditions. A few milliliters of each culture was harvested and used to determine the
97 length of thirty cells, measured under light microscopy using an ocular rule. Filaments lengths
98 were measured on a Fuchs Rosenthal hemocytometer using an ocular rule during the same
99 period. The number of cells per milliliter was obtained from the total length of filaments
100 measured, divided by the average cellular length. Growth rates were calculated during the

101 exponential phase and are presented as relative growth rate ($\mu \cdot \text{day}^{-1}$), estimated according to
102 Fogg & Thake (1987).

103 To determine chlorophyll-*a* (Chl-*a*) production, samples were harvested every 3 days during
104 12 days, under sterilized conditions. Ten milliliters of each culture were filtered onto
105 borosilicate filter (13mm diameter – Millipore). Extraction of Chl-*a* was performed using
106 methanol (100%) added to filters during 30 min. Chl-*a* concentration was determined by
107 spectrophotometer method and calculated by the use of Mackiney's extinction coefficient
108 (Mackiney, 1941).

109 To determine CYN concentrations during the growth period, samples of 500mL were
110 harvested on the 6th day (exponential phase) and 12th day (early stationary phase) of all
111 cultures at different conditions.

112 **CYN Analysis**

113 Samples for CYN analyses were filtered onto a borosilicate filter (45mm diameter –
114 Millipore) and stored at -20°C until the moment of HPLC analysis. After filtration, cells held
115 in filters were analyzed as intracellular CYN samples and media passed through filters were
116 analyzed as extracellular CYN samples. For intracellular CYN extraction, 20 mL of Milli-Q
117 water was added on the filters. Material was shaken for 2 hours in a magnetic workbench
118 shaker and then centrifuged (30min, 10000g). Supernatants was added and passed through
119 octadecilsilan cartridges (Bond Elut C₁₈) regenerated with 20 ml of methanol (100%) and
120 equilibrated with 20 ml of ultrapure water (Milli-Q). The cartridges were eluted with 40 ml of
121 Milli-Q water (Li *et al.*, 2001, modified method). Eluted fraction was freeze-dried,
122 resuspended in 2 ml of Milli-Q water, filtered in 0.45 μm nylon filters (13mm – Millipore)
123 and analyzed by HPLC according Welker's method (Welker *et al.*, 2002). Samples of
124 extracellular organic matter released to culture medium were freeze-dried and toxin extraction
125 was performed by the same procedure described for intracellular samples.

126 Intracellular and extracellular CYN were analyzed by a Shimadzu HPLC system using a
127 silica-base reversed phase column (125mm x 4.0mm, 5 μ m; Lichrospher 100 RP 18) with a
128 photo-diode array detector. The chromatographic conditions were: mobile phase – gradient of
129 0-50% water:methanol trifluoroacetic acid (TFA, 0.05%, V/V). CYN was detected at 262
130 nm, and quantification was based on an external cylindrospermopsin standard curve. The
131 standard was kindly provided by Dr. Wayne W. Carmichael (Wright State University, USA).

132 Statistical analysis

133 Data were expressed as mean values \pm standard error (SE). Data for each experimental
134 variable were tested for normality. Differences among standard deviations were determined
135 using Kolmogorov and Smirnov's test and Barlett's test, respectively. As these data were
136 classified as nonparametric, ANOVA was performed using the Kruskal-Wallis (KW) test for
137 multiple comparisons of CYP011K strain. Dunn's test was used to determine the specific
138 differences between two treatments of CYP011K strain. The nonparametric Mann-Whitney
139 U-test was performed to determine specific differences between CYP030A treatments. For
140 specific comparisons of CYN production between two different phases of growth (exponential
141 and stationary phase), the nonparametric Mann-Whitney U-test was performed for both
142 strains. All tests were performed with significance of 95% ($p < 0.05$) using the GraphPad InStat
143 3.0 application.

144 Results

145 Cellular growth

146 In all light treatments, cells of both strains have grown exponentially until 6th day (Figs 1, 2).
147 Relative growth rates calculated during exponential phase are presented in table 1. CYP011K
148 strain presented the highest growth rate at 100 μ mol photons. $m^{-2}.s^{-1}$ (KW test; $p < 0.05$).
149 Despite CYP 030A strain maintained under 348 μ mol photons. $m^{-2}.s^{-1}$ presented highest value

150 of growth rate than cells maintained at $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, any statistical difference was
151 observed (U-test; $p>0.05$).

152 Chlorophyll-*a* variation

153 Chl-*a* content were normalized to 10^6 cells (Figs 3, 4). CYP011K strain cells at $40\mu\text{mol}$
154 $\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ showed significantly highest Chl-*a* concentration, after 6th day (KW test;
155 $p<0.05$). Concentration of Chl-*a* in CYP011K strain cells was duplicated during growth of
156 cells at 40 and $60\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig 3). However at the highest light intensity
157 ($100\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) Chl-*a* concentration has not presented prominent variation (Fig 3).
158 There was also no variation on the Chl-*a* concentration in CYP030A cells during growth at
159 100 as well as $348 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig 4) and no significantly difference was observed
160 between the two treatments (U- test; $p>0.05$). Nevertheless, comparisons of Chl-*a*
161 concentration between the two strains at $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ disclosed that at early
162 stationary phase (9th and 12th days) CYP011K strain presented double of Chl-*a* production
163 (Table 2; U-test; $p<0.05$).

164 Effect of light intensity on CYN production

165 The extracellular CYN contents were no measurable. Values were below the detection limit
166 ($0.02 \mu\text{g}$) of the utilized method.

167 Intracellular CYN were normalized to 10^6 cells and Chl-*a*. CYN variation per cells between
168 two different phases of growth was observed only in CYP011K strain at $40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
169 (U-test, $p<0.05$) when the concentration decrease XX% from the 6th to the 12nd day (Fig
170 5). Interestingly, increase in CYN content per Chl-*a* was observed in the same strain at
171 stationary phase, at $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig 6) (U-test, $p<0.05$). However, at $100 \mu\text{mol}$
172 $\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, CYP030A (Figs 7, 8) presented a clear tendency to a decrease in CYN
173 content per cell as well per Chl-*a*, in stationary phase.

174 Tendency to a negative correlation between CYN production per cell and light intensity at
175 exponential and at stationary phase was observed in CYP011K strain (Fig 5; KW-test,
176 $p>0.05$). However, this interpretation changes when CYN content was normalized per Chl-*a*
177 (Fig 6). CYN content was reduced only at 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (KW-test, $p>0.05$), at
178 exponential phase and a positive relation between CYN content and light intensity was
179 observed at stationary phase (KW-test; $p>0.05$ and $p>0.05$, respectively).

180 While an increase in CYN content was observed per cells (Fig 7), in CYP030A strain, at
181 stationary phase, at 348 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, it was not possible to observe this behavior
182 when CYN content was normalized per Chl-*a*, in this condition (Fig 8; U-test, $p>0.05$).

183 CYP030A strain presented a tendency to a negative relation between CYN production per cell
184 and light intensity only at exponential phase (Fig 6; U-test; $p>0.05$). When CYN content was
185 normalized to Chl-*a*, CYP030A strain presented tendency to negative correlation with light
186 intensity at exponential and at stationary phase (Fig 8; U-test; $p>0.05$).

187 Significant differences between productions of CYN by two strains of *C. raciborskii* were
188 observed in same light intensity (100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). At exponential phase, CYN
189 production per cell was 2.1 times higher in CYP011K strain than CYP030A strain (U-test;
190 $p<0.01$). At stationary phase, CYN production per cell was 2.8 times higher in CYP011K
191 strain than CYP030A strain (U-test; $p<0.01$). When normalized CYN production per Chl-*a*
192 content, these differences were less evident. At stationary phase, CYN production per Chl-*a*
193 in CYP011K strain was 1.6 times higher in CYP011K strain than CYP030A strain (U-test;
194 $p<0.05$). An inversion was also observed at exponential phase, CYN production per Chl-*a* in
195 CYP030A strain was 1,065 times higher in CYP011K strain than CYP030A strain (U-test;
196 $p>0.05$).

197 **Discussion**

198 According some reports from laboratory and environmental studies, *C. raciborskii* has been
199 described with optimal growth in 121 and 240 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Dokulil & Mayer, 1996),
200 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Pádisák, 1997; Briand *et al.*, 2004) or 118 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
201 (Saker *et al.*, 1999). At light intensities from 6 to around 400 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and
202 temperature around to 25°C, a range of growth rates from 0.33 to 1.23 division.day⁻¹ was
203 reported (Saker *et al.*, 1999; Saker & Griffiths, 2000; Saker & Neilan, 2001; Moisander *et al.*,
204 2002; Neilan *et al.*, 2003; Briand *et al.*, 2004). Most of the times, growth rate measurements
205 are calculated by optical density (OD) of cells or trichomes, Chl-*a* or biomass basis (Saker *et*
206 *al.*, 1999; Moisander *et al.*, 2002; Briand *et al.*, 2004, respectively).
207 Additionally, a study performed by Saker and colleagues showed that at high light intensity
208 (433 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) two strains of *C. raciborskii* decrease their growth rates (Saker *et*
209 *al.*, 1999), also Briand and colleagues observed in *C. raciborskii* strains from tropical as well
210 as temperate environments the decrease in growth rates at light intensities higher than 200
211 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Briand *et al.*, 2004). However, Wiedner and colleagues demonstrated
212 that *C. raciborskii* requires light intensities from 80 to 120 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for maximal
213 growth, but this cyanobacteria is able to grow at almost maximum rates at light intensities up
214 500 .. is able to achieve the maximum grow rate at almost 500 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, which
215 indicates a high light tolerance. These reports demonstrated that *C. raciborskii* is able to grow
216 at low as well as high light intensities and differences of growth rates are strain specific. In
217 our study, relative growth rate found during exponential phase of CYP011K strain increased
218 with higher light intensity used (100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Table 1). Additionally, there were
219 differences in growth between the two *C. raciborskii* strains studied , at this light intensity
220 (Table 1). These results confirm growth rates in *C. raciborskii* could be strain specific.
221 *C. raciborskii* is able to migrate to deep layers of water due to the presence of gas vacuoles
222 (Shafik, 2003). This ability could give an advantage to *C. raciborskii* due to their possibility

223 to find the best light intensity for their growth at any depth because is possible explore
224 different light intensities in layers of water. Also, this species could be probably an efficient
225 light capturer and could survive in conditions of low light intensities (Padisák, 1997) and Chl-
226 *a* production can be sufficient to maintaining their growth. The increase of Chl-*a* in
227 CYP011K strain cells at 40 and 60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ is expected since at very lower light
228 intensity Chl-*a* levels need to be increase for the efficiency of light capture. High light
229 intensities energy is sufficient to keep growth and at this situation is expected no increment in
230 Chl-*a* production, as showed in CYP011K cells exposed to 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.
231 Moreover, despite no significant differences observed in Chl-*a* concentration in CYP030A
232 strain, the average of these concentrations were higher (U-teste; $p>0.05$) in cells exposed to
233 highest light intensity (348 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Fig 4). This behavior is expected because at
234 on longer time scale, the order of days, exposure to high light intensities may increase primary
235 production, due to an increase in the number of photosynthetic units (O'Brien *et al.*, 2009),
236 that can be measured by Chl-*a* concentration. However, reports of Chl-*a* production per cells
237 of *C. raciborskii* are deficient. Generally, data are present in microgram per liter of culture or
238 of environmental samples and better comparisons are not possible.

239 In cultures, growth phase of *C. raciborskii* is important because CYN at different
240 environmental stimuli could be differentially produced at exponential or stationary phase
241 (Hawkins *et al.*, 2001). Negative relation between growth and CYN per cell dry-weight was
242 reported to four Australian strains (Griffiths & Saker, 2003). Dyble and colleagues described
243 higher intracellular CYN concentrations per Chl-*a*, in a *C. raciborskii* strain maintained in
244 nitrogen-free medium, at several light intensities (35, 75, 53 or 140 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),
245 from 8 to 16 days of which indicate that CYN accumulation in cells after 16 days culturing
246 (Dyble *et al.*, 2006). Moreover, authors found high CYN concentration in cultures of a *C.*
247 *raciborskii* strain maintained at 140 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, light intensity where cells presented

248 lower growth rate (measured by Chl-*a* per litter) and assumed that light regulation of CYN
249 concentrations is not strictly a function of the effect of light on growth rate. We did not
250 observe a significant tendency to an increase or decrease of CYN per cell or per Chl-*a* content
251 in different stages of growth on the two strains studied . However, Dyble *et al.*, (2006) did not
252 present growth curves of the studied strain, so it is not possible to decide which growth stage
253 each time represent. Nevertheless growth rates of CYP011K and CYP030A strains are
254 positively influenced by light intensities ($p < 0.05$ and $p > 0.05$, respectively). Higher growth
255 rates were found in high light intensities (CYP011K strain – $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$;
256 CYP030A strain – $348 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and lower values of CYN concentration, as
257 normalized per Chl-*a* as per cell was measured at exponential phase (Fig 6-8), which is in
258 disagreement to Dyble and colleagues' hypothesis.

259 The relation between CYN production and light intensity has already been investigated in *C.*
260 *raciborskii* strains. In a revision, Griffiths and Saker (2003) discussed that despite *C.*
261 *raciborskii* cells could grow better at light intensities between 50 and $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
262 ¹, highest CYN cellular content was obtained in higher light intensities , suggesting a positive
263 relation between CYN production and increase in light intensity. Dyble and colleagues also
264 described a linear relation between light intensity and intracellular CYN production per Chl-*a*
265 content (light from 18 to $75 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in 8 as and 16 days of culturing *C.*
266 *raciborskii* strain of grew in nitrogen-free medium (Dyble *et al.*, 2006). Contrary of these
267 observations above, our results demonstrated a clear tendency to a negative relation between
268 CYN production per cell and light intensity at exponential and stationary phase of growth of
269 CYP011K strain. The same was observed at exponential phase of growth of CYP030A strain.
270 Cells grew in nitrogen-free medium presented high values in CYN content (on a cell dry-
271 weight basis) if it was compared with cells grew in medium with nitrogen source (Saker &
272 Neilan, 2001; Griffiths & Saker, 2003). Therefore, different interpretation of CYN production

273 by *C. raciborskii* could be observed when using medium with or without nitrogen source and
274 our results are not comparable to Dyble and colleagues results.

275 Otherwise, when our CYN production data was normalized to Chl-*a* content there was no
276 clear relation between toxin production and light intensity on CYP011K strain. The lower
277 average values of CYN production per Chl-*a* was observed at extremes light intensity in
278 different phases of growth in this strain (exponential phase-100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and
279 stationary phase-40 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Fig 6), which indicate no relation with light
280 intensity and CYN production. The interpretation has changed in CYN production per Chl-*a*
281 content in CYP030A, that which a negative relation between increment in light intensity and
282 CYN production at exponential as well as stationary phase of growth (Fig 8). Results clearly
283 demonstrated that depending on data normalization of CYN production, different
284 appointments assessment can be done to explain the effect of light. However, another
285 consideration about our results need be considered. In each strain studied, data of light effects
286 on CYN production obtained did not present any statistical difference. At the time, possible
287 no influence of light intensity on the two strains studied must be considered.

288 Difference in CYN production by several *C. raciborskii* strain was reported (Saker & Neilan,
289 2001; Griffiths & Saker, 2003). Neilan and colleagues found three separated phylotypes of *C.*
290 *raciborskii* strains in Australian, European and North/South American based in 16S r RNA
291 gene nucleotide sequences (Neilan *et al.*, 2003). Chonudomkul and colleagues related that
292 toxin production by twenty-four *C. raciborskii* strain was polyphyletic when analyzed from
293 similarity in short tandemly repeated repetitive sequences (Chonudomkul *et al.*, 2004).

294 Recently, Stucken and colleagues showed no correlation between toxic phenotypes and
295 phylogenetic association in the Australian strains (Stucken *et al.*, 2009). Results of these
296 previously studies revealed that different strains of *C. raciborskii* can produce different toxin
297 content. Production of CYN by the two strains studied showed significantly different values

298 of CYN (U-test; $p < 0.01$) at a same light intensity - $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figs 5-8).
299 CYP011K strain produced more 52.67% of CYN per cell than CYP030A at exponential
300 phase. At stationary phase this strain produced more 64.31% of CYN per cell than CYP030A
301 strain. These data is in agreement with the observations already discussed because two
302 different Australian strains produce significantly different CYN content. Despite the two
303 strains are from Australia environments, therefore could be th same phylotype (Neilan *et al.*,
304 2003), the different production of CYN confirm that there is no correlation between toxic
305 phenotypes and phylogenetic association in the Australian strains (Stucken *et al.*, 2009) and
306 these two strain are perfectly separable in different physiology types. In a last analysis, the
307 fact of the two strains be separated in different physiology types, could be explained based in
308 strain specific ability of primary production (O'Brien *et al.*, 2009). At $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
309 CYP011K strain presented twice times more Chl-*a* ($\text{mg}.10^{-6}$ cells) than CYP030A strain,
310 at exponential and stationary phase (Table 4). If this higher Chl-*a* production by CYP011K
311 strain could confer higher primary production, this strain could be present higher growth,
312 consequently higher CYN production (U-test, $p < 0.05$) than those observed in the CYP030A
313 strain.

314 It also becomes clear that real significance of light intensity on CYN production continues
315 obscure and contradictory. Improve studies on different light intensities, with different CYN
316 producer strains looking for a possible light control on molecular control of CYN production
317 is necessary. Moreover, our observations on different form to analyzing results, clearly
318 demonstrate variations in interpretation of *C. raciborskii* behavior in culture could be
319 adopted, depending to which data (e.g.: cells or Chl-*a*) will be used to interpreting CYN
320 production. Our observation showed that different way of presenting and normalize the results
321 may lead to diverse interpretations. The improve of knowledge about production of CYN by
322 *C. raciborskii* strains request a better definition to interpretation data, and this aspect could be

323 crucial for determination of physiology behavior of *C. raciborskii* at different environmental
324 stimuli.

325 Acknowledgements

326 The author wishes to thank the CAPES and CNPq for their fellowship support his Master
327 Degree studiesReferences

328 Bouvy M., Molica R.J.R., Oliviera S., Marinho M. & Beker B. 1999. Dynamics of a toxic
329 cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semiarid
330 region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, 20: 285-297

331 Bouvy M., Nascimento S. M., Molica R.J.R., Ferreira A., Huszar V. & Azevedo S. M. F. O.
332 2003. Limnological features in Tapucurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought.
333 *Hydrobiologia* 493: 115-130.

334 Briand J. F., Robillot C., Quilbier-Lloberas C., Humbert J.F., Couté A. & Bernard C. 2002.
335 Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow
336 pond in France. *Water Research* 36:3183-3192.

337 Briand J. F., Leboulanger C., Humbert J-F., Beranrd C. & Dufour P. 2004. *Cylindrospermopsis*
338 *raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid latitudes: selection, wide physiological tolerance,
339 or global warming?. *Journal of Phycology* 40: 231-238.

340 Burford M.A., McNeake K.L., McKenzie-Smith F.J., 2006. The role of nitrogen in promoting
341 the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir.
342 *Freshwater Biology* 51: 2143-21.

343 Chapman, A. D. and Schelske, C. L., 1997. Recent appearance of *Cylindrospermopsis*
344 (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. *Journal of Phycology* 33:191-195.

345 Chonudomkul D., Yongmanitchai W., Theeragool G., Kawachi M., Kasai F., Kaya K. &
346 Watanabe M. M. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of

347 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan.
348 *FEMS Microbiology Ecology* 48: 345- 355.

349 Dokulil M.T. & Mayer J. 1996. Population dynamics and photosynthetic rates of a
350 *Cylindrospermopsis – Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau,
351 Austria. *Algological Studies* 83: 179-195.

352 Dyble J., Tester P.A. & Litaker R.W 2006. Effects of light intensity on cylindrospermopsin
353 production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Africa Journal*
354 *of marine Science* 28(2): 309-312.

355 Fogg G. E. & Thake B. 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The
356 University of Wisconsin Press, London, 269pp.

357 Gorhan P. R., Maclachlan J. R. Hammer V. T. & Kim W. K. 1964. Isolation and culture of
358 toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen der Internationalen*
359 *Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 15: 796-804.

360 Griffiths D. J. & Saker M. L. 2003. The palm island mystery disease 20 years on: a review of
361 research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, 18 (2): 78-93.

362 Haande S., Rohrlack T., Ballot A., Roberg K., Skulberg R., Beck M. & Wiedner C. 2008.
363 Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria)
364 isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7: 692-701.

365 Hawkins P. R., Runnegar M. T. C., Jackson A. R. B. & Falconer I. R. 1985. Severe
366 hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis*
367 *raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju isolated from a domestic water supply
368 reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1292-1295.

369 Hawkins P. R., Putt E., Falconer I. R. & Humpage, A. 2001. Phenotypical variation in a toxic
370 strain of the phytoplankton *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae)
371 during batch culture. *Environmental Toxicology* 16(6): 460-467.

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

375 Li R., Carmichael W. W., Brittain S., Eaglesham G. K., Shaw G. R., Liu Y. & Watanabe M.
376 M. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin
377 from *Rhaphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37: 1121-1126.

378 McGregor G. B. & Fabbro L. D. 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii*
379 (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs:
380 implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs: Research and*
381 *Management* 5(3):195-205.

382 Mackiney G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological*
383 *Chemistry* 140: 315-322.

384 Masten S. 2000. *Cylindrospermopsin: Review of toxicological literature*. Integrated
385 laboratory Systems, Toxicological summary for cylindrospermopsin, Final report. ;
386 Research Triangle Park, North Carolina.

387 Moisander P.H., McClinton III E. & Paerl H. W. 2002. Salinity effects on growth,
388 photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic Cyanobacteria.
389 *Microbial Ecology* 43: 432-442.

390 Moore D., McGregor G.B. & Shaw G. 2004. Morphological changes during akinete
391 germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). *Journal of*
392 *Phycology* 40: 1098-1105.

393 Neilan, B.A., Saker M.L, Fastner J., Töröknes A. & Burns B.P. 2003. Phylogeography of the
394 invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology* 12: 133-140.

395 O'Brien K.R., Burford M.A. & Brookes J.D. 2009. Effects of light history on primary
396 productivity in a phytoplankton community dominated by toxic cyanobacterium
397 *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Freshwater Biology* 54: 272-282.

398 Ohtani R. E., Moore D. & Runnegar M. T. C. 1992. A potent hepatotoxin from the blue-green
399 alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society* 114: 7941–
400 7942.

401 Padisák J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an
402 expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology.
403 *Archiv für Hydrobiologie*, 107: 563-593.

404 Reynolds C. S. (ED.) 2006. *Ecology of Phytoplankton: Ecology, Biodiversity and*
405 *Conservation*. Cambridge University Press, New York, USA. 535pp.

406 [Saker M.L.](#), Neilan B. A. & Griffiths D. J. 1999. Two morphological forms of
407 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island,
408 Queensland. *Journal of Phycology* 35: 599-606.

409 Saker M. L. & Neilan B. A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies and toxicities of
410 genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae)
411 from northern Australia. *Applied Environmental Microbiology* 67: 1839-1845.

412 Saker M. L. & Griffiths D. J. 2000. The effect of temperature on growth and
413 cylindrospermopsin content of seven isolates of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis*
414 *raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju in a north Queensland domestic water
415 supply. *Marine & Freshwater Research* 52: 907-915.

416 Stucken K., Murillo A.A., Soto-Liebe K., Fuentes-Valdés J.J., Méndez M.A & Vásquez M.
417 2009. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis*
418 *raciborskii* strains. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 37-48.

419 Welker M., Bickel H. & Fastner J. 2002. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin -
420 opportunities and limits. *Water Research* 36:4569-4663.

421 Wiedner C., Rucker J., Brüggemann R. & Nixdorf B. 2007. Climate change affects timing
422 and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152:
423 437-484.

424 Table 1 – Growth rates of *C. raciborskii* cells exposed to four different light intensities¹.

Strain	Treatment ³	$\mu \cdot \text{day}^{-1(2)}$
CYP 011K	40	0.313 ± 0.04
	60	0.477 ± 0.03
	100	0.524 ± 0.02
CYP 030A	100	0.393 ± 0.03
	348	0.375 ± 0.12

425 ¹Data are presented with average \pm standard deviation (n=3). ² μ is relative growth.day⁻¹. ³

426 Light intensity in $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

427 Table 2- Values of Chl-*a* production by *C. raciborskii* after 9 and 12 days of treatment¹.

Strain	Treatment ³	Time ²	
		9	12
CYP 011K	40	0.324 ± 0.01	0.310 ± 0.02
	60	0.291 ± 0.01	0.251 ± 0.03
	100	0.234 ± 0.01	0.210 ± 0.02
CYP 030A	100	0.113 ± 0.02	0.108 ± 0.05
	348	0.277 ± 0.11	0.305 ± 0.12

428 ¹Data are presented with average of the $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$ cells \pm standard deviation (n=3). ²Days. ³Light
 429 intensity in $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

430 Table 3 – Values of CYN production by *C. raciborskii* at different phases of growth¹.

Strain	Treatment ⁴	ng.10 ⁶ cells		ng.µg Chl- <i>a</i>	
		6 ²	12 ³	6 ²	12 ³
CYP 011K	40	24.687 ±		92.033 ±	54.764 ±
		9.51	17.538 ± 3,06	30.68	4.56
	60	18.853 ±		94.118 ±	72.566 ±
		6.00	16.524 ± 1.16	23.29	11.98
	100	12,112 ±		48.946 ± 3.51	71.175 ±
		0.55	14.189 ± 2.44		15.57
CYP 030A	100	5.731 ±		52,174 ±	45.372 ±
		1.40	5.065 ± 1.04	23.90	5.68
	348	3.179 ±		18.371 18.13	22.216 ±
		0.67	5.369 ± 2.199	±	6.41

431 ¹Data are presented with average of CYN ± standard deviation (n=3). ^{2,3} Values in day.

432 ²Exponential phase. ³Stationary phase. ⁴Light intensity in µmol photons.m⁻².s⁻¹.

433

434 Table 4 – Ratio between two *C. raciborskii* strains Chlorophyll-*a* concentration¹ during
435 growth².

Time ³	Ratio ⁴
0	1,451 ± 0,40
3	1,492 ± 0,24
6	2,279 ± 0,16
9	2,059 ± 0,40
12	1,884 ± 0,35

436 ¹Data are presented with average of Chl-*a* concentration YN ± standard deviation (n=3).

437 ²Cells maintained at 100 μmol photons.m⁻².s⁻¹. ³Time in day. ⁴Ratio was determined by
438 dividing CYP011K Chl-*a* concentration by CYP0030a Chl-*a* concentration.

439

440 Figure 1 - Growth curves of *C. raciborskii* (CYP011K strain) cells exposed to three different
441 light intensities. The error bars are standard errors (n=3).

442 Figure 2 - Growth curves of *C. raciborskii* (CYP030A strain) cells exposed to two different
443 light intensities. The error bars are standard errors (n=3).

444 Figure 3 - Chlorophyll-*a* variation in *C. raciborskii* (CYP011K strain) cells exposed to three
445 different light intensities. The error bars are standard errors (n=3).

446 Figure 4 - Chlorophyll-*a* variation in *C. raciborskii* (CYP030A strain) cells exposed to two
447 different light intensities. The error bars are standard errors (n=3).

448 Figure 5 - Cylindrospermopsin variation in 10^6 cells of *C. raciborskii* (CYP011K strain)
449 exposed to three different light intensities. Day 6 is exponential phase; day 12 is stationary
450 phase. The error bars are standard errors (n=3).

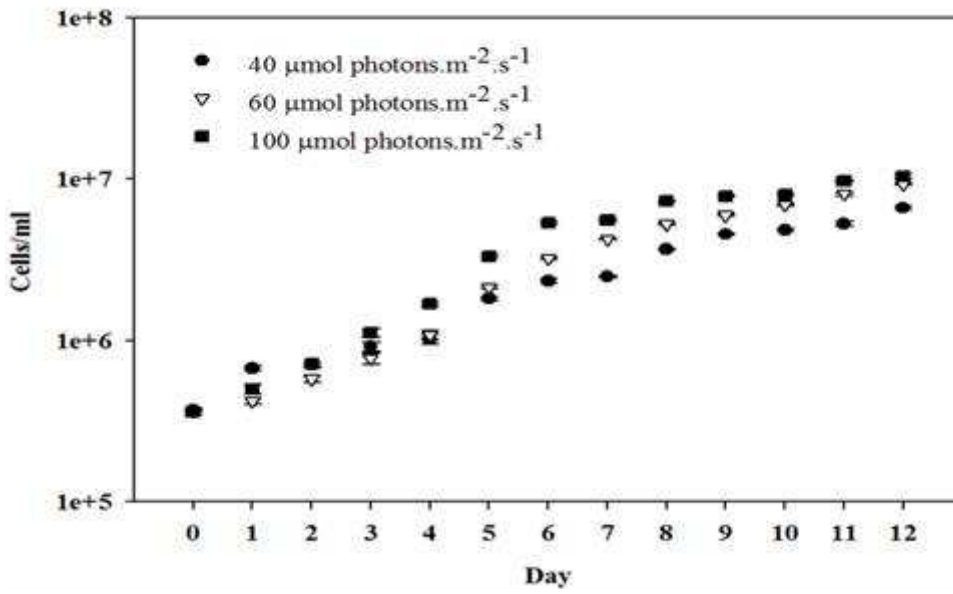
451 Figure 6 - Cylindrospermopsin variation per μg Chl-*a* of *C. raciborskii* (CYP011K strain)
452 exposed to three different light intensities. Day 6 is exponential phase; day 12 is stationary
453 phase. The error bars are standard errors (n=3).

454 Figure 7 - Cylindrospermopsin variation in 10^6 cells of *C. raciborskii* (CYP030A strain)
455 exposed to three different light intensities. Day 6 is exponential phase; day 12 is stationary
456 phase. The error bars are standard errors (n=3).

457 Figure 8 - Cylindrospermopsin variation per μg Chl-*a* of *C. raciborskii* (CYP030A strain)
458 exposed to three different light intensities. Day 6 is exponential phase; day 12 is stationary
459 phase. The error bars are standard errors (n=3).

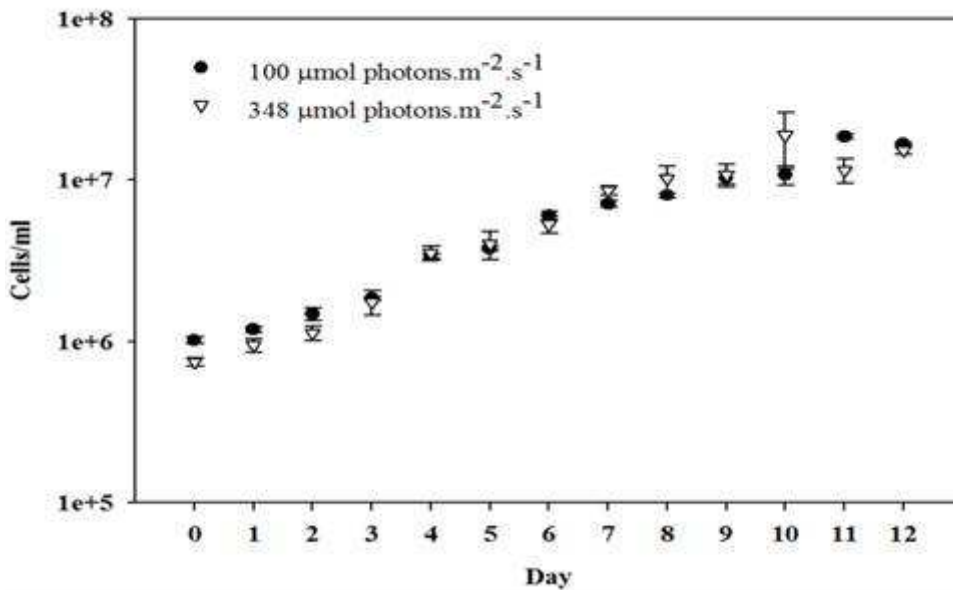
460

461 Figure 1



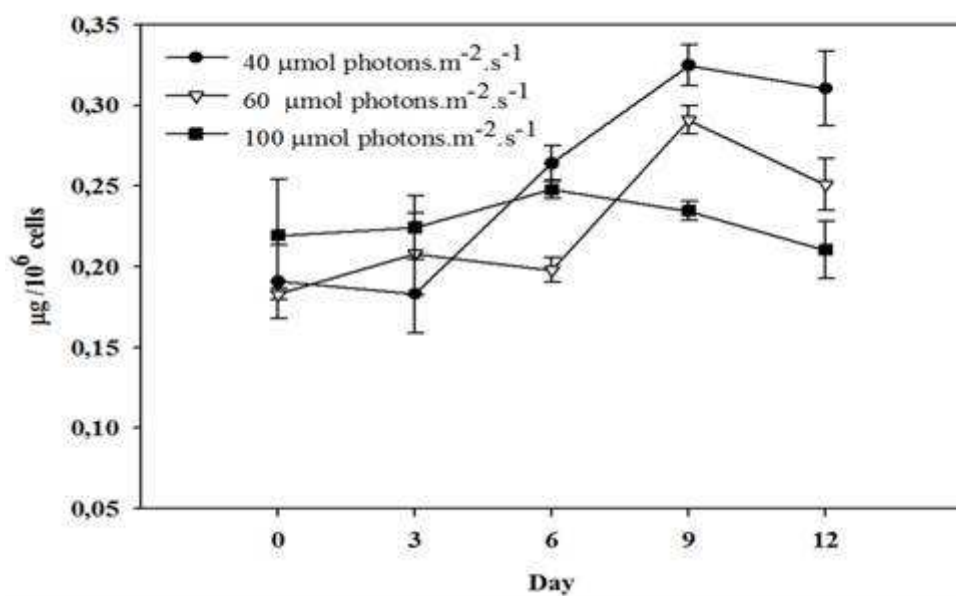
462

463 Figure 2



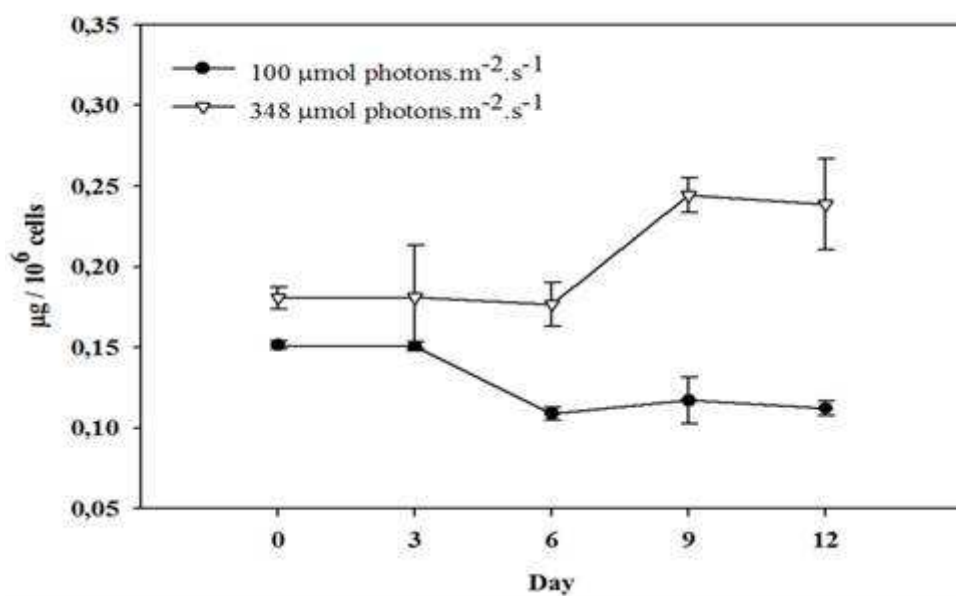
464

465 Figure 3



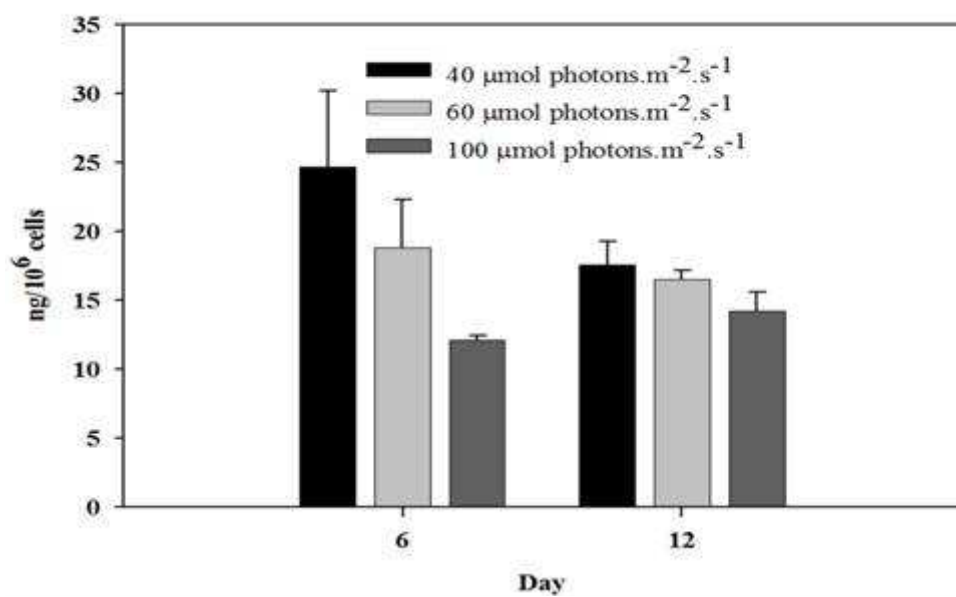
466

467 Figure 4



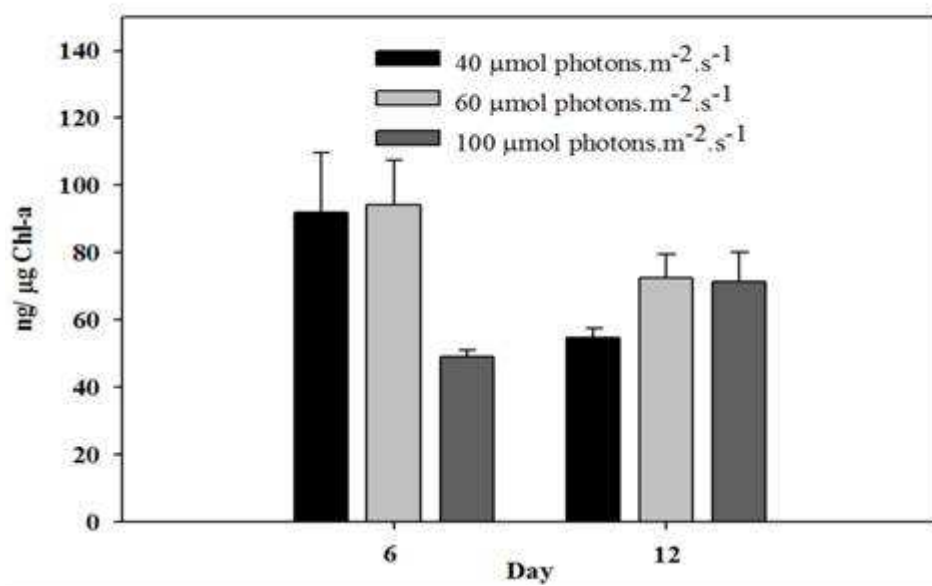
468

469 Figure 5



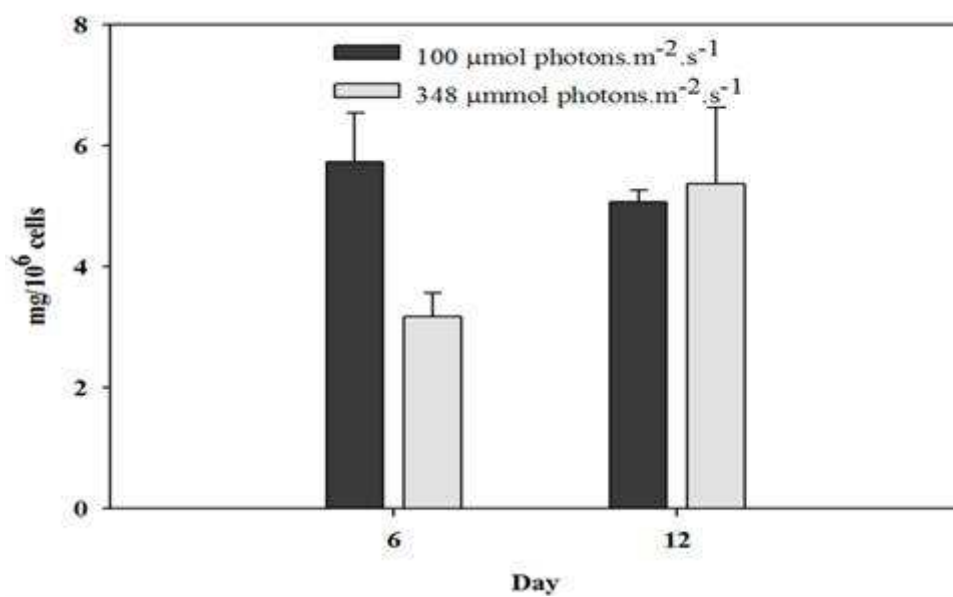
470

471 Figure 6



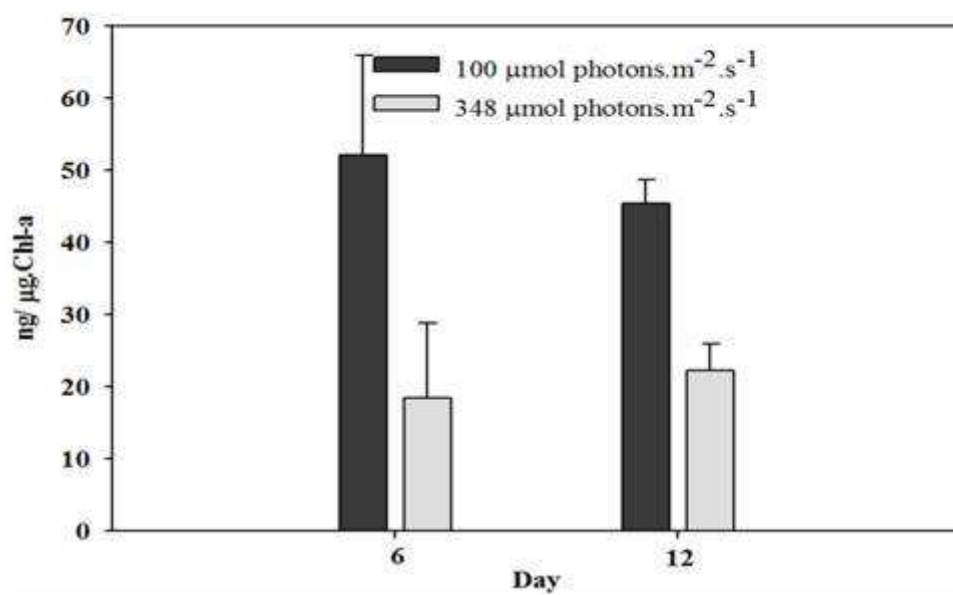
472

473 Figure 7



474

475 Figure 8



476

Anexo 5

AS 10 PERGUNTAS MAIS FREQUENTES SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA: O QUE VOCÊ NÃO PODE DEIXAR DE SABER.

Azevedo, SMFO, Carneiro, RL. Espaço Ciência Viva.

8 - O tratamento da água é sempre eficiente?

Nem sempre. O tratamento convencional da água deveria permitir a produção de água sem problemas para a saúde. Mas, como a contaminação das águas utilizadas para abastecimento está crescendo muito, algumas vezes esse tratamento não consegue ser eficiente para remover todos os contaminantes.

9 - Existe alguma lei que regulamenta a qualidade da água?

Sim, no Brasil por exemplo, a portaria n.º 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde do Brasil, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano.

10 - É possível recuperar um ambiente aquático contaminado? O que podemos fazer para melhorar a qualidade e contribuir para um bom uso da água?

Sim é possível recuperar um ambiente aquático contaminado. Existem várias técnicas que podem ser usadas, mas o mais importante é sabermos que isso leva tempo e depende do comprometimento de todos para reduzir uma nova contaminação. Por isso você pode ajudar para melhoria desses ambientes seguindo as três regras para qualidade da água:

Nº 1 - Evitar o desperdício!

Feche sempre as torneiras, regule as descargas sanitárias, não fique horas lavando calçadas e carros com água potável, não deixe o chuveiro ligado à toa.

Nº 2 - Preservar a natureza!

Evitar desmatamento para evitar assoreamento (perda de profundidade) de rios e lagos. Não jogue lixo em praias ou florestas eles podem para na água.

Nº 3 - Não poluir!

Não jogar nenhum tipo de lixo na água, pois a sujeira que é jogada ficará lá e muitas vezes por muitos anos. Um exemplo são os materiais feitos de plástico. O plástico leva 100 anos para se degradar.

Autoria:

Sandra M.F.O. Azevedo e Ronaldo L. Carneiro
Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de
Cianobactérias / Letc / UFRJ



APOIO



CT-Hidro

FNDE

Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação



Ministério da Educação



As 10 perguntas mais freqüentes sobre a água que usamos: o que você não pode deixar de saber!

1. De onde vem a água que bebemos?
2. Por que a água é importante?
3. A água que bebemos pode nos contaminar?
4. Como ocorre a contaminação das águas?
5. Existem algum tipo de ser vivo que pode contaminar as águas?
6. Só os organismos vivos podem contaminar as águas?
7. Já sabemos que ao comer um peixe podemos nos contaminar. Mas, porque a poluição afeta os organismos aquáticos?
8. O tratamento da água é sempre eficiente?
9. Existe alguma lei que regulamenta a qualidade da água?
10. É possível recuperar um ambiente aquático contaminado? O que podemos fazer para melhorar a qualidade e contribuir para um bom uso da água?

1 - De onde vem a água que bebemos?

A água é encontrada na natureza sob três formas: em estado sólido (geleiras), em estado gasoso (vapor) e em estado líquido (rios, mares, lagos e reservas subterrâneas). No ambiente as mudanças entre esses três estados e seu transporte formam o chamado ciclo da água. Geralmente, as águas de rios e lagos são as mais utilizadas para o abastecimento da população e após serem tratadas serão "bebidas por nós".



2 - Por que a água é importante?

Grande parte do planeta é feita de água e a vida só foi possível na Terra devido a presença deste líquido. Todos os animais e vegetais possuem água na sua composição corporal e dependem dela para desempenhar suas funções. Por outro lado, em todas as atividades humanas a água tem importância, principalmente no próprio corpo humano. Mais de 50% do corpo é água. A água circula pelo corpo entrando e saindo (água que bebemos, suor, urina, fezes) e nos mantendo vivos.

3 - A água que bebemos pode nos contaminar?

Sim. O primeiro contato com a água contendo agentes tóxicos pode ocorrer em atividades de recreação, como o banho de mar, de cachoeira ou em lagos. Também, ao beber água contaminada podemos acabar sendo prejudicados. Essa água

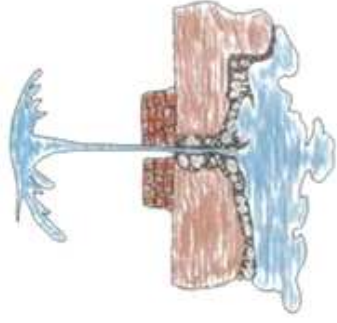
que foi bebida irá se distribuir pelo corpo e afetar diferentes locais, causando doenças. Da mesma forma, as plantas e os animais poderão ser afetados pela água ou por viver nela (no caso dos peixes). Ao comer qualquer carne, peixe ou vegetal que tiveram contato com água contaminada, estamos também sendo contaminados, indiretamente.

4 - Como ocorre a contaminação das águas?

Muitos dos processos humanos são responsáveis pela contaminação das águas. As atividades do homem que mais se destacam como causadoras de problemas nas águas são: descarte de esgoto doméstico e industrial nas águas dos rios e mares; aterros sanitários, que podem contaminar águas subterrâneas; desmatamentos de florestas, atividades agrícolas (criação de gado, porcos e aves e irrigação e utilização de produtos agrotóxicos) e extração de minerais, que podem poluir tanto águas de superfície como subterrâneas.

5 - Existem algum tipo de ser vivo que pode contaminar as águas?

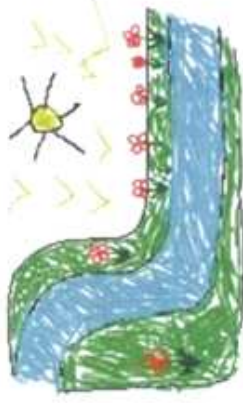
Sim. Alguns tipos de bactérias vivem no interior do intestino de todos nós, auxiliando a nossa digestão. Mas, quando na água, liberadas pelo esgoto sanitário, podem causar doenças. Outros organismos que podem estar presentes na água e causar doenças são: fungos, vírus, protozoários e cianobactérias.



As cianobactérias são importantes porque fazem fotossíntese e contribuem em grande parte para manutenção do oxigênio na atmosfera da Terra. Porém, podem produzir vários tipos de veneno que atacam principalmente o fígado e o sistema nervoso.

6 - Só os organismos vivos podem contaminar as águas?

Não. Muitos produtos químicos, utilizados pelo homem na indústria e na agricultura e até mesmo em nossas casas, podem prejudicar muito a qualidade da água pelo despejo de resíduos químicos (por exemplo: metais pesados, como zinco, mercúrio, cromo; pesticidas, solventes, detergentes, etc).



7 - Já sabemos que ao comer um peixe podemos nos contaminar. Mas, porque a poluição afeta os organismos aquáticos?

Com a diminuição da qualidade da água muitos organismos aquáticos passam a ser afetados e podem até desaparecer do ambiente. Isso ocorre porque numa água sem qualidade, eles não conseguem crescer e se reproduzir. Por outro lado, alguns organismos especialmente aqueles que podem ser prejudiciais ao homem podem sobreviver em água de menor qualidade e com isso aumenta a chance de nos contaminarem.