

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO  
DE MICROCISTINAS EM DUAS CEPAS DE *Microcystis aeruginosa* Kütz.  
emend. Elenkin (Cyanophyceae)

RENATO JOSÉ REIS MOLICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências  
da Saúde da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas - área de concentração:  
Biotecnologia Vegetal.

RIO DE JANEIRO

1996

EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO  
DE MICROCISTINAS EM DUAS CEPAS DE *Microcystis aeruginosa* Kütz.  
emend. Elenkin (Cyanophyceae)

RENATO JOSÉ REIS MOLICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências  
da Saúde da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas - área de concentração:  
Biotecnologia Vegetal.

RIO DE JANEIRO  
1996

## FICHA CATALOGRÁFICA

MOLICA, R.J.R.

Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenkin (Cyanophyceae)

Renato José Reis Molica, Rio de Janeiro, UFRJ, 1996

88 p: 15 figuras, 7 tabelas

Dissertação de mestrado em ciências biológicas - Área de concentração em biotecnologia vegetal

Palavras chave: 1. Cianofíceas; 2. Cianobactérias; 3. Microcistina; 4. Intensidade luminosa; 5. *Microcystis aeruginosa*.

ORIENTADORA :

---

Prof.a Dr.a Sandra M. F. O. e Azevedo

Aos meus pais, Therezinha e Molica, por terem sempre me apoiado em todas as minhas decisões e pelo incentivo que sempre me deram.

## AGRADECIMENTOS

- À Prof.a Sandra Azevedo, pela sua orientação, amizade e por ter me incentivado e conduzido nos meus primeiros passos na ciência;
- Ao Prof. Ricardo M. Chaloub, por suas sugestões durante a realização do presente trabalho e pela contribuição na avaliação final do mesmo;
- Aos Prof. César P. dos Santos e Ricardo M. Chaloub, pelo uso das instalações de seu laboratório para a realização das curvas de saturação luminosa; Luiz Mauro, pela valiosa ajuda, paciência e amizade demonstradas durante a realização deste experimento;
- Ao Prof. Wayne Carmichael, por ter posto o seu laboratório à disposição, para que pudéssemos realizar a quantificação da microcistina pelo método de ELISA, e a Jisi An, por ter feito todas essas análises;
- À coordenação do Programa de Biotecnologia Vegetal, pelo excelente trabalho e força de vontade que tiveram para criar este curso;
- Aos amigos do Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas Ana Cláudia, Aloysio, Marcelo, Pati, Patrícia, Raquel, Sílvia e Valéria pela paciência, clima de amizade e companheirismo e pela ajuda e sugestões durante as prévias; um agradecimento especial à minha amiga Sílvia pelas valiosas discussões científicas e ajuda em vários momentos;
- Ao Prof. Alfredo, pelo uso das instalações e equipamentos de seu laboratório e à sua equipe: Bete, Celso, Cosme, Elza, Joaquim e Marli, a quem agradeço especialmente;
- Ao Prof. Antônio Jorge, por coordenar a Central Analítica de forma competente; à Elimar, pela paciência durante as análises de HPLC, e ao Eduardo pela amizade e por manter a Central Analítica funcionando até a meia-noite (no mínimo), todos os dias;
- Aos meus grandes amigos Alexandre, Bitty, Marcelinho e Milton, simplesmente por serem MEUS AMIGOS (EM LETRAS MAIÚSCULAS);
- Ao meu irmão Fernando, pelo incentivo;
- À minha amiga Luciana, pelas frutíferas discussões científicas e ajuda desde o meu começo no laboratório;
- A todos os meus amigos, em especial aos da turma 89/1 da Biologia da UFRJ;
- Ao Rodrigo, pela ajuda na preparação dos “slides” para a apresentação da tese;
- À Karin, pela ajuda com o “scanner”;

- À CAPES, pela bolsa de estudo concedida;
- A todos que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho;
- O último e o mais importante, para a pessoa que mais me incentivou e teve mais paciência durante estes anos, ao meu amor, Cris.

## RESUMO

O processo de eutroficação que a maioria dos corpos d'água vêm sofrendo nas últimas décadas tem levado a um crescimento exagerado das cianofíceas ou cianobactérias. A esses eventos dá-se o nome de "blooms" ou florações. O problema é que muitas das espécies formadoras de florações estão relacionadas com a produção de toxinas, sendo estas responsáveis por diversos casos de intoxicação tanto animal como humana. As hepatotoxinas são as toxinas mais comumente envolvidas nestes casos, sendo dentro deste grupo, as microcistinas as principais representantes. A espécie *Microcystis aeruginosa* é a mais freqüentemente relacionada com a ocorrência de florações tóxicas em todo o mundo.

A maioria das espécies que formam florações possuem vacúolos gasosos, permitindo que estes organismos se acumulem na superfície dos corpos d'águas, o que por consequência, leva as células, durante estes eventos, a ficarem expostas a altas intensidades luminosas. Para melhor compreendermos as possíveis variações na síntese de microcistinas nesta condição, realizamos experimentos com cepas de *M. aeruginosa* produtora (NPLJ-4) e não-produtora (NPCD-1) de microcistinas, em que alteramos a intensidade luminosa de 40 para 180  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .s^{-1}$ , quando as células atingiram o período entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária (desaceleração da divisão celular) e o final da fase exponencial de crescimento.

Durante os experimentos, acompanhamos o estado fisiológico das culturas mediante contagens das células e pela análise dos seguintes parâmetros fisiológicos: clorofila a, proteínas e carboidratos intracelulares e produção de biomassa. Também foi acompanhada a resposta da atividade fotossintética da cepa NPLJ-4, em relação a diferentes irradiâncias, quando a intensidade luminosa foi alterada no final da fase exponencial de crescimento.

A alteração da intensidade luminosa não induziu a produção de microcistinas na cepa NPCD-1. A fase de crescimento e os regimes de luz influenciaram bastante a síntese destas hepatotoxinas na cepa NPLJ-4. O conteúdo intracelular de microcistinas foi maior na fase de desaceleração da divisão celular e diminuiu ao longo da fase estacionária. Sob a intensidade de 40  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .s^{-1}$  foram observados os maiores níveis de microcistina e a alteração da intensidade luminosa para 180  $\mu\text{moles .m}^{-2} .s^{-1}$  levou a uma diminuição dos níveis destas toxinas.



A mudança da irradiância proporcionou um aumento da velocidade de divisão celular e os valores de clorofila a, proteínas e carboidratos destas culturas tenderam a se igualar aos das culturas que se desenvolveram sob  $180 \mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ . A resposta da atividade fotossintética a diferentes irradiâncias mostrou que as células submetidas à alteração da irradiância sofreram um processo de fotoinibição e os maiores valores de atividade fotossintética máxima foram observados nas culturas que se desenvolveram sob a maior irradiância.

Os nossos experimentos não nos permitiram concluir de que maneira a luz estaria afetando da síntese de microcistinas. Entretanto, duas hipóteses puderam ser levantadas: sob intensidades luminosas maiores, ocorreria um desvio da maior parte da energia disponível para aumentar a eficiência na absorção e utilização do  $\text{CO}_2$ , durante o processo fotossintético, ocorrendo conseqüentemente uma diminuição da síntese de enzimas responsáveis pela síntese de microcistinas. A outra hipótese poderia ser que a diminuição do conteúdo de microcistinas, em resposta a um aumento da intensidade luminosa, devendo-se a um aumento da velocidade específica de crescimento.

## ABSTRACT

Accelerating eutrophication of waterbodies has resulted in an exaggerated growth of blue-green algae or cyanobacteria all over the world, a phenomenon named bloom. Moreover, some of the species that form blooms are toxins-producers and are responsible for several cases of animal death and human illness. Hepatotoxins are the toxins more related to these cases and, within this group, microcystin remains the main representative. Among the several species causing toxic water blooms, *Microcystis aeruginosa* is the most common.

During blooms, cells are submitted to high light intensities. In order to examine how microcystin production can be altered by this condition, two strains of *M. aeruginosa* (NPLJ-4 and NPCD-1, toxic and non-toxic, respectively) were cultivated under  $40\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $180\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and subjected to a change in irradiance from 40 to  $180\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , when the cultures reached the period between the exponential and the stationary growth phases and the late exponential phase.

The physiological state of the cells was accompanied by cell counting and by the analysis of some physiological parameters: chlorophyll a, carbohydrate, protein and biomass production. Also, photosynthetic light-response curves of the NPLJ-4 strain were developed when the irradiance was altered at the late exponential growth phase.

Changes in light intensity did not induce toxin production by the non-toxic strain (NPCD-1). The growth phases and the different irradiance regimes influenced the microcystin synthesis by the toxic strain (NPLJ-4). The intracellular level of microcystin was highest during the period between the exponential and the stationary phases, and decreased during the stationary phase. At light intensity of  $40\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  the cells contained the highest amounts of toxin and the change in irradiance to  $180\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  caused a decrease in microcystin levels.

The change in light intensity resulted in an increase in cell division. The chlorophyll, carbohydrate and protein levels tended to equalize those of the cultures that had grown at  $180\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . The photosynthetic light-response curves showed that cells submitted to a change in irradiance were photoinhibited and the highest values of light-saturated photosynthetic rate were observed in the cultures cultivated at  $180\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Our experiments did not allow to conclude how light controls microcystin synthesis. However, hypothesis could be speculated: at high light intensities, most of the energy could be deflected to enhance the efficiency of CO<sub>2</sub> absorption, consequently, the synthesis of the enzymes responsible for microcystin synthesis diminished. The other one could be that the decrease of microcystin levels, associated with the increase of light intensity, would be a consequence of the rise in growth rate.

## SUMÁRIO

	Pág.
Ficha Catalográfica .....	iii
Dedicatória .....	v
Agradecimentos .....	vi
Resumo .....	viii
Abstract .....	x
Glossário .....	xiv
1 - Introdução .....	1
1.1 - Considerações gerais .....	1
1.2 - Eutroficação e suas conseqüências .....	2
1.3 - Toxinas produzidas pelas cianofíceas .....	3
1.3.1 - Neurotoxinas .....	4
1.3.2 - Hepatotoxinas .....	7
1.4 - Inibição e antídotos contra os efeitos hepatotóxicos das microcistinas .....	12
1.5 - Utilização biotecnológica das microcistinas .....	12
1.6 - Ocorrências de florações de cianofíceas produtoras de toxinas .....	13
1.7 - Fatores ambientais que influenciam na produção de microcistinas .....	16
1.8 - Controle das florações de cianofíceas e tratamentos de águas contaminadas com cianotoxinas .....	17
1.9 - Cianofíceas tóxicas no Brasil .....	20
2 - Objetivos .....	21
3 - Material e Métodos .....	22
3.1 - Condição controle .....	23
3.2 - Mudança da intensidade luminosa .....	24
3.3 - Parâmetros fisiológicos analisados .....	24
3.4 - Análise quantitativa de microcistinas .....	27
3.5 - Análise qualitativa de microcistinas .....	27
3.5.1 - Cromatografia semi-preparativa .....	28

	Pág.
3.5.2 - Cromatografia analítica .....	29
3.6 - Curvas de resposta da atividade fotossintética a diferentes irradiâncias (Curvas de luz-fotossíntese) .....	30
4 - Resultados e discussão .....	32
4.1 - Cepa NPCD-1 .....	32
4.2 - Cepa NPLJ-4 .....	33
4.2.1 - Crescimento celular .....	33
4.2.2 - Produção de clorofila .....	37
4.2.3 - Carboidratos intracelulares .....	40
4.2.4 - Proteínas intracelulares .....	43
4.2.5 - Curvas de resposta da atividade fotossintética a diferentes irradiâncias (Curvas de luz-fotossíntese) .....	46
4.2.6 - Produção de microcistinas .....	53
4.3 - Hipóteses levantadas que poderiam explicar a redução do conteúdo intracelular de microcistinas em células submetidas a uma alta intensidade luminosa .....	62
4.4 - Considerações finais .....	65
5 - Conclusões .....	67
6 - Bibliografia .....	69
7 - Anexos .....	85

## GLOSSÁRIO

- ATP - Adenosina - 5' - trifosfato
- Chl - Clorofila
- DL<sub>50</sub> - Representa a dose letal média, sendo o valor estimado que causa a morte de 50% da população que foi exposta à toxina
- ELISA - “Enzyme-linked immunosorbent assay”
- HPLC - “High performance liquid chromatography” - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- I.p. - Injetada intraperitonealmente
- MetOH - Metanol
- NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
- RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucleico - mensageiro
- U.V. - Ultra violeta

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Cianofíceas ou cianobactérias são organismos procariotos que, por meio das reações fotossintéticas, bastante similares às dos vegetais superiores e algas verdes, liberam oxigênio molecular para a atmosfera. Estes organismos foram essenciais para a formação da atual biosfera (Bold e Wynne, 1985; Tandeau de Marsac e Houmard, 1993). Estudos paleontológicas descobriram, em estruturas denominadas estromatólitos, organismos fotossintéticos que viveram há 3,5 bilhões de anos, bastante similares às cianofíceas (Lazcano e Miller, 1994).

A divisão Cyanophyta contém espécies unicelulares, coloniais ou filamentosas. Estes microrganismos já foram identificados em praticamente todos os tipos de ecossistemas (Gibson e Smith, 1982; Tandeau de Marsac e Houmard, 1993), pelo fato de estes organismos terem desenvolvido determinadas estruturas e sistemas enzimáticos específicos que lhes conferem essa ampla capacidade de adaptação a diferentes ambientes.

A formação de vacúolos gasosos em algumas cianofíceas permite às células migrarem verticalmente na coluna d'água. Com isto, elas se mantêm a uma profundidade em que tanto a intensidade luminosa quanto os nutrientes são favoráveis para o seu crescimento (Lehmann e Jost, 1971; Klemer, 1982; Paerl, 1983; Paerl e Ustach, 1982; Thomas e Walsby, 1986; Humphries and Lyne, 1988; Kromkamp *et al.*, 1988).

Algumas cianofíceas podem reduzir o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_4^+$ ), utilizando-a no seu desenvolvimento, sem haver, no entanto, uma diminuição nas taxas de crescimento, quando comparadas com aquelas obtidas com células crescidas em meios de cultura onde o nitrato ( $NO_3^-$ ) é a fonte de nitrogênio disponível (Bothe, 1982; Phlips, *et al.*, 1989; Prospero, 1994). A fixação do nitrogênio atmosférico pode ocorrer tanto nas espécies que possuem heterocistos<sup>1</sup> como naquelas em que não há formação dessas células especializadas (Bothe, 1982; Phlips, *et al.*, 1989; Paerl, 1994).

<sup>1</sup> São encontrados nas espécies filamentosas; geralmente não mais que 5-10% das células vegetativas se diferenciam em heterocistos. O processo de diferenciação inclui uma série de mudanças estruturais e

As cianofíceas também têm uma ampla capacidade de adaptação a diferentes intensidades luminosas, o que lhes proporciona grandes vantagens em relação aos outros grupos de microalgas. Algumas espécies conseguem se desenvolver sob baixas irradiâncias, enquanto outras suportam níveis elevados de radiação solar (Van Liere e Mur, 1979; Tilzer, 1987; Paerl *et al.*, 1983 e 1985).

## 1.2 - EUTROFICAÇÃO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS

As cianofíceas podem apresentar um crescimento exagerado na superfície de rios, lagos e reservatórios artificiais. Estes eventos são conhecidos como florações ou “blooms”. Além disso, florações do gênero *Oscillatoria* também podem ocorrer no metalímnio de lagos (Lindholm e Meriluoto, 1991)

Nos últimos anos, os corpos d'águas vêm recebendo grandes descargas de rejeitos provenientes das atividades humanas em áreas urbanas, industriais e agrícolas. Isto tem levado a um aumento da quantidade de nutrientes, principalmente de nitrogênio e fósforo, nesses sistemas. A este processo de enriquecimento dá-se o nome de eutroficação e, provavelmente, esta é uma das principais causas do aumento das florações de cianofíceas no ambiente (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 1992). Outros fatores, como níveis altos de radiação solar, temperatura d'água entre 15 e 30° C, vento fraco e pH de neutro a alcalino, também favorecem o aparecimento das florações (Skulberg *et al.*, 1984).

Duas características de ambientes eutroficados são o pH básico e a baixa concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido na água. Segundo Shapiro (1990), as cianofíceas tendem a ser dominantes nestes ambientes devido a alguns fatores, mas principalmente por se adaptarem bem a valores de pH elevados e possuírem enzimas com um K<sub>s</sub><sup>2</sup> baixo para o CO<sub>2</sub>.

---

funcionais, para criar um ambiente livre de oxigênio, pois o complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio, é inibido e inativado por este gás .

<sup>2</sup> O K<sub>s</sub>, na equação de Michaelis para cinética enzimática, representa a concentração de substrato correspondente à metade da velocidade máxima. Por definição, quanto menor for o K<sub>s</sub> de uma enzima, maior será a sua afinidade pelo substrato e vice-versa.



A formação das florações depende da coincidência de três fatores: uma população pre-existente; uma parte significativa dos organismos possuírem vacúolos, permitindo-lhes a flutuação; e estabilidade na coluna d'água para manter a flutuabilidade das células (Reynolds e Walsby, 1975, citados em Zohary e Breen, 1989). Segundo Zohary (1985),<sup>3</sup> existem dois tipos de florações, que são classificadas de acordo com a concentração de células, duração do evento e da espessura da massa celular. As florações denominadas *scums*<sup>3</sup> dependem para sua formação apenas das características descritas acima. Possuem uma concentração entre  $10^2$  e  $10^3$   $\mu\text{g}$  de clorofila  $\cdot \text{L}^{-1}$ , duração de poucas horas ou dias e espessura de poucos milímetros. Contudo, os fatores necessários para a formação dos *scums* são insuficientes para explicar casos mais raros, denominados *hyperscums*<sup>4</sup>, em que a massa flutuante de células, freqüentemente com centímetros de espessura (chegando a ter entre 50-75 cm), está tão densamente compactada, que impede o movimento de água entre as células, tendo duração de semanas até meses e concentração de  $10^5$   $\mu\text{g}$  de clorofila  $\cdot \text{L}^{-1}$ .

Os outros fatores necessários para a formação dos *hyperscums* são: regime prolongado de ventos fracos, regiões no lago ou reservatório protegidas contra ventos, elevada concentração de biomassa celular pré-existente e alta irradiância (Zohary, 1989; Zohary e Breen, 1989). Recentemente na Austrália foi descrita uma floração do gênero *Anabaena*, que ocupou 1000 Km do rio Darling-Barwor (Johnstone, 1994).

### 1.3 - TOXINAS PRODUZIDAS PELAS CIANOFÍCEAS

As cianofíceas produzem diferentes metabólitos secundários, sendo alguns deles possuidores de ação tóxica sobre diferentes organismos e tipos celulares (Gleason e Wood, 1987; Cohen, 1986; Carmichael, 1988). Alguns desses metabólitos estão sendo estudados, com o objetivo de usá-los como agentes bactericidas (Gromov *et al.*, 1991), fungicidas (Moore *et al.*, 1987), antivirais (Gustafson *et al.*, 1989; Knübel *et al.*, 1990; Patterson, *et al.*, 1993) e como substâncias antineoplásicas (Carmeli *et al.*, 1990; Patterson *et al.*, 1991). Como estes

---

<sup>3 e 4</sup> Ambos os termos, até hoje, não foram traduzidos para o português.

organismos ainda foram poucos estudados com esses objetivos, a descoberta de novos compostos tem sido bastante promissora

Entretanto, as cianotoxinas (neurotoxinas e hepatotoxinas) podem ser consideradas os principais agentes tóxicos produzidos por estes organismos, pois podem causar sérios danos à vida animal e à saúde humana, quando presentes em águas de recreação e/ou consumo.

### 1.3.1 - NEUROTOXINAS

As neurotoxinas são produzidas por cepas de espécies dos gêneros *Anabaena* (Mahmood e Carmichael, 1986; Negri e Jones, 1995), *Aphanizomenon* (Carmichael *et al.*, 1990) e *Oscillatoria* (Carmichael, 1992a) e têm como ação final a paralisação da atividade muscular. São conhecidas, até hoje, quatro diferentes neurotoxinas produzidas por cianofíceas (Carmichael, 1994): anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina e neosaxitoxina.

As neurotoxinas se caracterizam por uma ação extremamente rápida, provocando a morte do animal entre poucos minutos a poucas horas. Apesar de agirem de forma diferente, todas elas matam por parada respiratória.

O alcalóide anatoxina-a (Figura 1a) é um potente agente despolarizador e bloqueador neuromuscular pós-sináptico que afeta receptores acetilcolina nicotínicos e muscarínicos (Spivak *et al.*, 1980; Carmichael *et al.*, 1990). Ela foi a primeira cianotoxina a ser isolada e caracterizada quimicamente (Devlin *et al.*, 1977). Esta toxina compete pelos receptores da acetilcolina, entretanto ela não é degradada pela acetilcolinesterase, levando a uma superestimulação do músculo. A D.L.<sub>50</sub> (i.p.) da toxina purificada em camundongos é de 200µg . Kg<sup>-1</sup> (Carmichael, 1992b). Devido ao mecanismo de ação da anatoxina-a, alguns pesquisadores vêm estudando a possibilidade de se usar em formas menos tóxicas desta molécula para o tratamento do Mal de Alzheimer (Carmichael, 1994).

A anatoxina-a(s) (Figura 1b) difere quimicamente da anatoxina-a. Ela se liga a acetilcolinesterase, impedindo que esta degrade a acetilcolina, o que também causa uma super estimulação dos músculos. A sua toxicidade é bastante alta, apresentando uma D.L.<sub>50</sub> (i.p.) em camundongos de 20µg . Kg<sup>-1</sup> (Mahmood e Carmichael, 1986; Mahmood e Carmichael 1987). Esta toxina é o único organofosforado natural conhecido, sendo os organofosforados

amplamente utilizados como base de vários pesticidas. A desvantagem de seu uso é que, por serem lipossolúveis, tendem a se acumular em regiões ricas em lipídios. Entretanto, anatoxina-a(s) é hidrossolúvel, podendo o seu uso controlado ser mais seguro para o homem e outros vertebrados. Por outro lado, esta característica dificultaria a passagem da toxina através do exoesqueleto rico em lipídios (cutícula) dos insetos (Carmichael, 1994).

Como já foi descrito acima para anatoxina-a e anatoxina-a(s), saxitoxina e a neosaxitoxina (Figura 1c) também impedem uma comunicação normal entre os neurônios e os músculos. Elas bloqueiam os canais de sódio por meio das membranas dos axônios, impedindo a liberação de acetilcolina, não ocorrendo, portanto, estimulação, conseqüentemente os músculos ficam paralisados. A Saxitoxina e a neosaxitoxina são alcalóides e possuem uma D.L.<sub>50</sub> (i.p.) em camundongos de  $10\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  (Carmichael *et al.*, 1990). Estas toxinas também ocorrem em espécies de dinoflagelados marinhos causadores de marés vermelhas e são identificadas pela sigla PSP (Paralytic Shellfish Poisoning - Veneno Paralisante de Molusco) (Anderson, 1994).

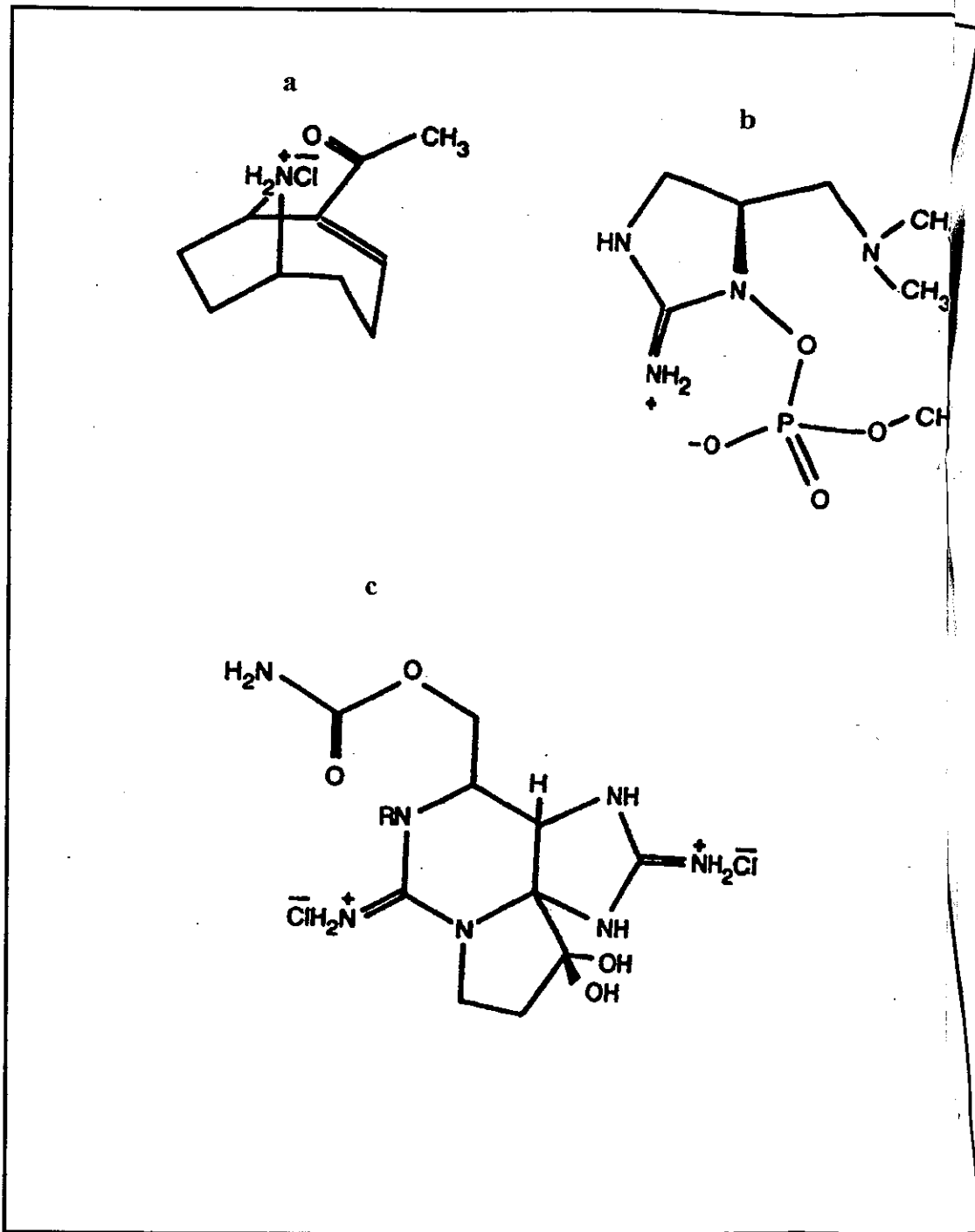


Figura 1- Estrutura das neurotoxinas produzidas por cepas de espécies dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Oscillatoria*. (a) anatoxina-a, (b) anatoxina-a(s) e (c) saxitoxina (se R for um H) ou neosaxitoxina (se R for uma OH). Retirado de Carmichael (1992a).

### 1.3.2 - HEPATOTOXINAS

Hepatotoxinas são as toxinas produzidas por espécies e/ou cepas de cianofíceas mais comumente relacionadas com casos de envenenamento animal e humano, em todo o mundo. As duas principais hepatotoxinas, nodularinas e microcistinas, são de natureza peptídica e são produzidas por algumas cepas de espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Nostoc*. Recentemente, um alcalóide hepatotóxico, denominado cilindrospermopsina, foi isolado de duas espécies de cianofíceas: *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani *et al.*, 1992) e *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1994). O modo de ação desta toxina, porém, ainda não está estabelecido.

Os sintomas causados pela ingestão de hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos e diarreia. A morte ocorre de poucas horas a poucos dias e se deve a uma hemorragia intra-hepática seguida de choque hipovolêmico. Em animais que sobrevivem a este período, é observada uma hipercalemia e/ou hipoglicemia, esta última resultante provavelmente de uma insuficiência hepática, que podem se estender a um grau que se torne incompatível com a vida (Beasley *et al.*, 1989).

As hepatotoxinas chegam aos hepatócitos por meio de receptores dos ácidos biliares (Runnegar, *et al.*, 1981, Eriksson *et al.*, 1990, Falconer *et al.*, 1992). Elas promovem uma desorganização dos filamentos intermediários e dos microfilamentos de actina (Runnegar and Falconer, 1986), que são polímeros proteicos componentes do citoesqueleto (Alberts, *et al.*, 1989). Esta desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles e com as células que formam os capilares sinusoidais. Conseqüentemente o fígado perde a sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue, que passa a fluir dos capilares para esses locais. (Hooser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994; Lambert, *et al.*, 1994).

A partir da primeira metade deste século, bioensaios feitos com células de cianofíceas coletadas em florações ou cultivadas, principalmente da espécie *Microcystis aeruginosa*, já mostravam a presença de uma toxina que causava sérios danos ao fígado dos animais testados (Hughes *et al.*, 1958). A confirmação de que esta hepatotoxina era um peptídeo foi apresentada por Bishop *et al.*, (1959). Mas somente no início dos anos 80 é que a sua estrutura molecular foi caracterizada. (Botes *et al.*, 1982a, 1982b). A molécula é um heptapeptídeo

monocíclico (Figura 2) formado por três D aminoácidos, dois L e mais dois aminoácidos incomuns (Harada, 1996). Dentre estes, um denominado Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico), que também está presente nas nodularinas, foi determinado como sendo um dos responsáveis pela atividade biológica conferida às hepatotoxinas (Harada *et al.*, 1990, Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1991).

A nomenclatura desta toxina foi dada por Carmichael e colaboradores (Carmichael *et al.*, 1988) e a princípio, apenas as variações qualitativas observadas em seus dois L aminoácidos foram usadas, como exemplo: microcistina-LR (leucina e arginina); -RR (arginina e arginina); -YA (tirosina e alanina) Até hoje já foram identificados mais de 50 microcistinas (Harada, 1996), mas diferenças no grau de metilação dos aminoácidos, bem como variações isoméricas no aminoácido Adda, passaram também a ser usadas na classificação destas toxinas (Rinehart *et al.*, 1994).

As microcistinas são produzidas por cepas das espécies dos gêneros *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Anabaena* e a maioria tem uma D.L.<sub>50</sub> (i.p.) em camundongos entre 50 e 100µg . Kg<sup>-1</sup>. Contudo, devido às variações estruturais, algumas têm uma D.L.<sub>50</sub> (i.p.) em camundongos bem maior, podendo variar de 600 a 1200µg . Kg<sup>-1</sup> (Rinehart *et al.*, 1994). Já foram identificados isômeros das microcistinas-LR e -RR que não demonstraram toxicidade em camundongos (Carmichael, 1992b).







direção ao centro da célula e um afastamento dos filamentos intermediários em torno do núcleo, antes de seu desaparecimento.

Já se sabe que a inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A pode levar ao desenvolvimento de tumores, em razão de uma hiperfosforilação e conseqüente inativação de alguns supressores do crescimento celular (Fujiki, 1992).

A microcistina mostrou ser um forte promotor de tumores. Efetivamente, Falconer (1991) constatou um aumento na formação de tumores de pele em camundongos que receberam por via oral, extrato de *Microcystis aeruginosa* produtora de hepatotoxina, enquanto que Nishiwaki-Matsushima *et al.*, (1992) observaram haver um aumento dose-dependente no número e no tamanho das lesões formadas nos fígados de ratos que receberam doses (i.p.) com diferentes concentrações de microcistina. Resultados semelhantes foram obtidos quando nodularina foi aplicada em camundongos (Ohta *et al.*, 1994). Este trabalho também mostrou a hiperfosforilação de algumas proteínas celulares e constatou que nodularina também age como iniciadora de tumores.

Nos experimentos descritos no parágrafo anterior, os autores trabalharam com doses subletais de microcistina e nodularina. Este fato é preocupante para as populações humanas, principalmente de regiões pobres dos países do Terceiro Mundo, que normalmente se utilizam de águas não-tratadas ou tratadas inadequadamente. Um estudo epidemiológico realizado na China, na província de Qidong, demonstrou que a taxa de incidência de câncer de fígado em pessoas que bebiam água de valas foi de 72,3 em 100.000 pessoas; de 141,4 para as que consumiam água de reservatórios e de apenas 11,7 para as que tinham acesso a água de poços profundos (Shun-Zhang, 1989). Esse autor, entretanto, não encontrou uma correlação entre estas taxas e os promotores de câncer de fígado pesquisados (vírus da hepatite B, aflatoxina, etc.)

Pesquisadores que estudam a produção de toxinas por cianofíceas acreditam que uma possível causa para esta alta incidência de câncer de fígado tenha sido o consumo de águas contaminadas por cepas destes organismos produtoras de hepatotoxinas. O trabalho realizado em alguns reservatórios chineses, onde havia ocorrência de florações de cianofíceas, demonstrou a presença de cepas produtoras de microcistina e cuja espécie dominante era *Microcystis aeruginosa* (Zhang *et al.*, 1991).

#### **1.4 - INIBIÇÃO E ANTÍDOTOS CONTRA OS EFEITOS HEPATOTÓXICOS DAS MICROCISTINAS**

Algumas substâncias já foram testadas quanto a sua capacidade de inibição dos efeitos hepatotóxicos das microcistinas. Silimarina (Mereish *et al.*, 1991), ciclosporina A (Stoner, *et al.*, 1990) e rifampina (Hermansky *et al.*, 1990) tiveram efeitos satisfatórios quando anteriormente administradas em animais de laboratório ou coadministradas com microcistina. Rifampina também mostrou ser um bom antídoto, quando injetada 15 minutos após a administração da toxina. Posteriormente, Runnegar *et al.* (1995) mostraram que ciclosporina A e rifampina agem, provavelmente, inibindo a ligação da molécula de microcistina com o(s) seu(s) receptor(s) na membrana dos hepatócitos. Experimentos *in vitro* mostraram que anticorpos policlonais e monoclonais contra microcistina inibiram os efeitos deletérios desta molécula sobre os hepatócitos. Esses resultados abrem uma nova perspectiva no uso de imunoterapias para diminuir a ação das microcistinas em seres humanos e animais (Lin e Chu, 1994; Nagata *et al.*, 1995).

#### **1.5 - UTILIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DAS MICROCISTINAS**

Por bloquearem a ação das proteínas fosfatases, as microcistinas vêm sendo utilizadas como uma poderosa ferramenta na investigação de como estas enzimas funcionam no controle do metabolismo celular (Murphy, *et al.*, 1995; Takai, *et al.*, 1995; Hartzell *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995). Além disso, devido à característica de se ligarem fortemente às proteínas fosfatases, elas também estão sendo usadas como sondas para o isolamento destas enzimas a partir de extratos de tecidos (Moorhead *et al.*, 1994 e 1995).

A toxicidade de microcistina já foi testada contra várias espécies de insetos. Os resultados mostraram que essa toxina é um potente inseticida, comparável em eficácia a outros mais utilizados. A sua alta toxicidade para mamíferos, porém, depõe contra o seu uso (Delaney e Wilkins, 1995). Como o modo de ação destas toxinas contra os insetos não é conhecido, o seu estudo pode levar ao desenvolvimento de um inseticida menos tóxico para mamíferos, a partir de uma versão modificada de microcistina.

## 1.6 - OCORRÊNCIAS DE FLORAÇÕES DE CIANOFÍCEAS PRODUTORAS DE TOXINAS

A ocorrência de florações tóxicas de cianofíceas já foi descrita em todos os continentes, com exceção do Antártico (Skulberg *et al.*, 1984; Westhuizen e Eloff, 1985; Wicks e Thiel, 1990; Zhang *et al.*, 1991; Carmichael, 1992a; Watanabe *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1994; Balode e Purina, 1995; Blackburn e Jones, 1995; Yoo *et al.* 1995).

Muitos dos gêneros formadores de florações estão relacionados com a produção de toxinas. Casos de envenenamento, seguidos de morte em animais domésticos e silvestres, que ingeriram água contaminada com grandes quantidades de cianofíceas, estão amplamente relatados na literatura. O primeiro registro de intoxicação animal data do século passado, na Austrália, e foi causado por uma floração de *Nodularia spumigena* (Francis, 1878, citado em Carmichael, 1994).

Há muito já se sabe que a ingestão ou contato com água contaminada com cianofíceas pode causar problemas nos seres humanos, como irritações cutâneas e a “febre do feno” (Heise, 1951; Cohen e Reif, 1953). Recentemente nos Estados Unidos, problemas gastrointestinais em pacientes soro-positivos para o vírus HIV foram relacionados com a ingestão de organismos similares às cianofíceas (Long *et al.*, 1991) e em um outro episódio, entre 70 e 80 pessoas na Suécia tiveram o mesmo problema, após consumirem água contaminada com cianofíceas, em virtude de um erro da companhia de abastecimento (Annadotter *et al.*, 1995).

Em 1988, uma epidemia de gastroenterite na região de Paulo Afonso, na Bahia, e um conseqüente aumento na taxa de letalidade em razão deste problema, foram relacionados com o consumo de água contaminada por cianofíceas produtoras de toxinas (Teixeira *et al.*, 1993). Os autores chegaram a esta conclusão após a observação de que toda a orientação dada, desde o início da epidemia, para que a água de consumo fosse filtrada e fervida (o que eliminaria a maioria dos vírus e bactérias, ainda que sem degradar a microcistina), não impedia que os indivíduos adoecessem. Além disso, toda a água captada para esta região provinha da barragem de Itaparica, que naquela época apresentava uma grande floração dos gêneros

*Microcystis* e *Anabaena*. Entretanto, estes mesmos autores não investigaram a presença da toxina(s) responsável(s) por esta intoxicação.

No início do ano de 1996, 123 doentes renais, após terem se submetido a sessões de hemodiálise em uma clínica da cidade de Caruaru no Estado de Pernambuco, passaram a apresentar um quadro clínico compatível a uma grave hepatotoxicose. Destes, 60 vieram a falecer em decorrência do agravamento da intoxicação. A princípio suspeitou-se de um surto de hepatite e depois de uma contaminação com cloro na água utilizada no tratamento. Mas nenhuma destas hipóteses foram confirmadas.

Análises feitas em nosso laboratório e pelo Prof. Wayne W. Carmichael na Wright State University - Ohio - USA identificaram microcistina como sendo a responsável pelas mortes (em publicação). Apesar da confirmação da presença da toxina, tanto no carvão ativo utilizado no sistema de purificação d'água da clínica, bem como no soro e em amostras de fígado dos pacientes, ainda não foi possível identificar qual a espécie de cianofíceas responsável pela produção desta toxina. Por outro lado, contagens do fitoplâncton do reservatório de Tabocas, coletada 45 dias após o início das intoxicações, demonstraram uma dominância de gêneros de cianofíceas que estão comumente relacionados com a produção de cianotoxinas (em publicação). Além disso, dados obtidos com a Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA), sobre análises quali/quantitativa do fitoplâncton deste reservatório, mostraram que as cianofíceas vêm dominando neste local há pelo menos 5 anos.

Como não há relatos na literatura de que outros organismos sintetizem microcistina, este passou a ser o primeiro caso confirmado no mundo de mortes humanas causadas por uma toxina produzida por cianofíceas.

Nos países em que este assunto vem recebendo maiores investimentos e atenção, por parte das autoridades competentes, já se criou uma consciência do perigo que as toxinas de cianofíceas podem causar ao homem. Nesses países, assim que uma floração é detectada, o local é imediatamente fechado para a recreação e no caso de eles ocorrerem em reservatórios de abastecimentos, o fornecimento de água é interrompido (Nehring, 1991; Jones e Orr, 1994). A figura 4 mostra um exemplo de cartaz informativo que alerta a população sobre o perigo que representam as florações de cianofíceas.

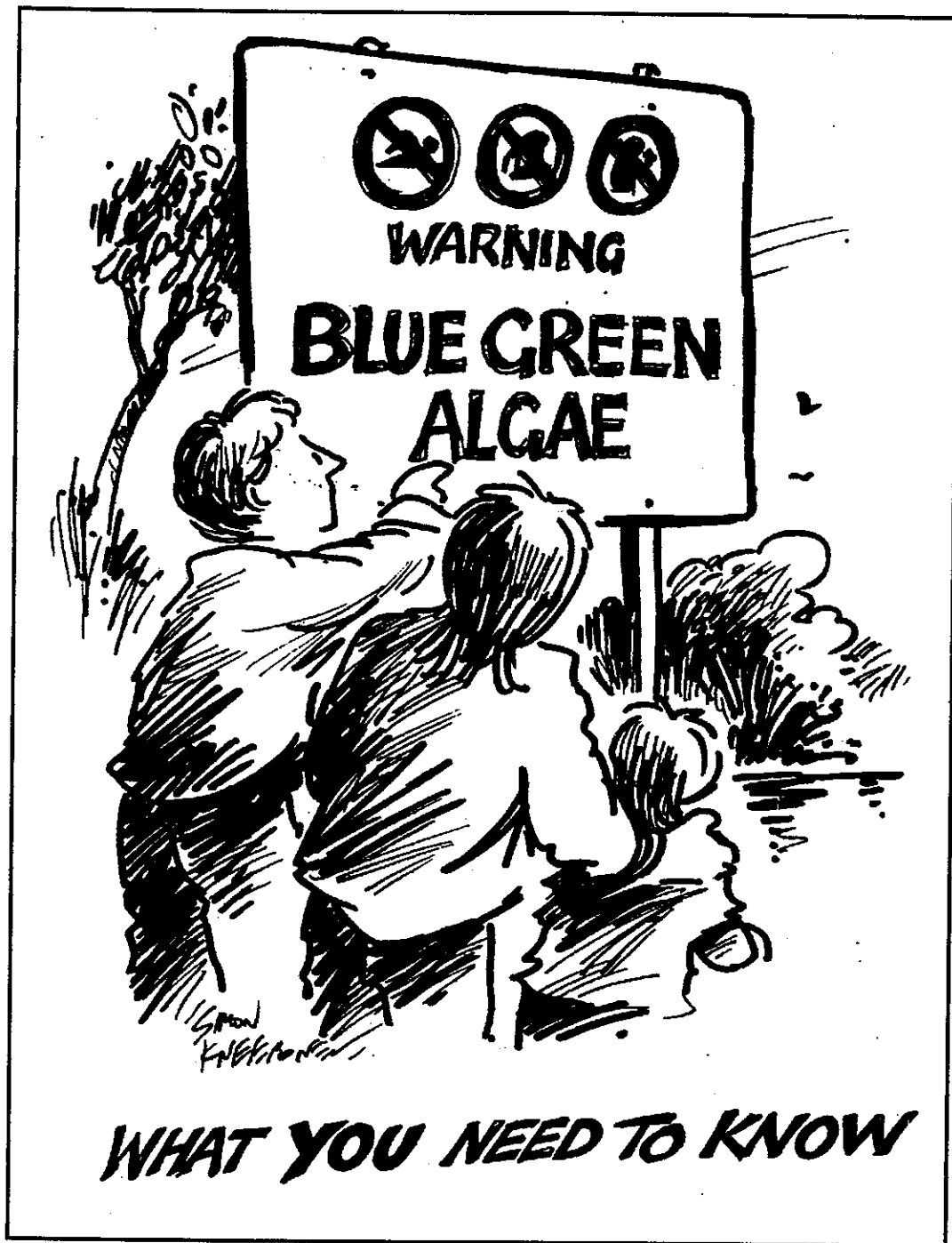


Figura 4 - Um exemplo de cartaz publicado na Austrália alertando a população a não entrar em contato com águas contaminadas com cianofíceas. Retirado de Yoo *et al.* (1995).

## 1.7 - FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS

A produção de toxinas, assim como o estado fisiológico das células do fitoplâncton é afetada pelos fatores ambientais, tanto físicos como químicos. *Microcystis aeruginosa*, por ser a espécie que está mais frequentemente relacionada com a ocorrência de florações tóxicas em todo o mundo, foi a mais utilizada em experimentos para a compreensão da relação entre os fatores ambientais e a síntese de microcistinas.

Temperatura (Watanabe e Oishi, 1985; Westhuizen e Eloff, 1985, Codd e Poon, 1988), fósforo, nitrogênio e ferro (Lukac e Aegerter, 1993; Aguiar, 1995; Utkilen e Gjølme, 1995) foram identificados como fatores importantes no controle da síntese de microcistinas por *M. aeruginosa*. Sivonen (1990) também observou que variações da temperatura e nas concentrações de nitrato e ortofosfato interferiam na síntese desta toxina por *Oscillatoria agardhii*. Watanabe e Oishi (1985) verificaram que a maior toxicidade de *M. aeruginosa* ocorria entre o final da fase exponencial de crescimento e início de fase estacionária (fase de desaceleração da divisão celular), já Watanabe *et al.* (1989) observaram que as maiores concentrações de microcistinas ocorriam no final da fase exponencial.

Durante uma floração ocorre uma rápida atenuação da luz, em consequência, as células ficam expostas não somente a uma baixa irradiância, mas também a um gradiente de luz. Sob estas condições, uma utilização eficiente da luz é de extrema importância para estes organismos (Foy e Gibson 1982a, b). Alguns trabalhos já mostraram que as cianofíceas se adaptam melhor a baixas irradiâncias, quando comparadas aos outros grupos de microalgas (Van Liere e Mur, 1979; Tilzer, 1987). Além disso, as cianofíceas também podem resistir a altas intensidades luminosas, minimizando o processo de fotoinibição devido a uma maior síntese de carotenóides (Paerl *et al.*, 1983) e por utilizarem os comprimentos de onda próximos ao ultravioleta no processo fotossintético (Paerl *et al.*, 1985).

A luz, por ser o principal controlador da atividade fotossintética, está diretamente envolvida no mecanismo de controle da biosíntese de vários compostos intracelulares tais como carboidratos, proteínas e pigmentos (Foy e Smith, 1980). É natural, pois, pensar-se que ela também possa desempenhar um importante papel no controle da síntese de microcistinas e isto já foi demonstrado em alguns trabalhos, tanto em cultivo, como em condições naturais. Watanabe e Oishi (1985) mostraram que a síntese de microcistinas por *Microcystis aeruginosa*

era maior em 75,3  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  do que em 7, 53  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Westhuizen e Eloff (1985), Codd e Poon (1988) e Utkilen e Gj\^oelme (1995) obtiveram resultados semelhantes tamb\^em trabalhando com *M. aeruginosa*. Sivonen (1990), usando como modelo de estudo duas esp\^ecies de *Oscillatoria*, observou que o aumento da irradi\^ancia reduzia a concentra\^ao intracelular de microcistinas. Wicks e Thiel (1990), acompanhando o conte\^udo de microcistinas durante uma flora\^ao de *M. aeruginosa*, encontraram uma correla\^ao positiva entre a s\^intese desta hepatotoxina e a irradia\^ao solar.

## 1.8 - CONTROLE DAS FLORA\^OES DE CIANOF\^ICEAS E TRATAMENTO DE \u00c1GUAS CONTAMINADAS COM CIANOTOXINAS

O tratamento dos corpos d'\u00e1gua com sulfato de cobre para o controle das flora\^oes de cianof\^iceas \u00e9 o mais utilizado em todo o mundo (Lambert *et al.*, 1994; Jones e Orr, 1994). No reservat\^orio de Guarapiranga, que abastece parte da cidade de S\~ao Paulo, s\~ao gastos diariamente 4 toneladas de sulfato de cobre para o controle das flora\^oes de cianof\^iceas, mas gra\^as a um aumento na resist\^encia a este tratamento, por parte de algumas esp\^ecies filamentosas, tamb\^em passou-se a usar per\^oxido de hidrog\^enio. (Zagatto, 1995).

Este tratamento tem um efeito satisfat\^orio no controle das flora\^oes, por\^em pela lise celular que ele ocasiona, ocorre tamb\^em a libera\^ao das toxinas intracelulares para a \u00e1gua. A maioria dos casos de contato humano com cianotoxinas ocorreu ap\^os o tratamento de flora\^oes t\^oxicas com sulfato de cobre (Lambert *et al.*, 1994).

Newman e Barrett (1993) conseguiram controlar e inibir o crescimento de cianof\^iceas, em condi\^oes de cultivo e no ambiente, utilizando palha de cevada decomposta. Os resultados sugerem que a inibi\^ao se deva a uma libera\^ao de subst\^ancias por microrganismos durante a decomposi\^ao da cevada (*Hordeum vulgare* var. *Atem*). A vantagem deste tratamento \u00e9 que ele evita a libera\^ao das toxinas para a \u00e1gua.

Trabalhos sobre decomposi\^ao de cianotoxinas mostraram que a degrada\^ao de anatoxina-a \u00e9 bem mais r\^apida que a de microcistina (Kiviranta *et al.*, 1991; Rapala *et al.*, 1994) e em ambos os casos a degrada\^ao destas toxinas pareceu se dar pela a\^ao de bact\^erias.

Os resultados obtidos por Jones e Orr (1994) e Jones *et al.* (1994) mostraram que a microcistina pode se manter na coluna d'\u00e1gua por mais de tr\^es semanas. Este dado \u00e9 de

extrema importância para as companhias responsáveis pelo tratamento e distribuição de água, que se utilizam de reservatórios onde a ocorrência de florações de cianofíceas já foi observada. Amostras de crostas secas da espécie *M. aeruginosa*, tendo entre 5 a 6 meses de idade, coletadas nas margens de um lago australiano, apresentaram uma alta concentração de microcistinas. A persistência, por longos períodos dessas hepatotoxinas nestas crostas secas de cianofíceas, tem importantes implicações em corpos d'água em que há formação das citadas crostas durante o período de seca. Existe a possibilidade de, com o início da estação chuvosa, toda a toxina voltar para a água. Neste caso, mesmo que não esteja ocorrendo uma floração, poderá haver uma alta concentração de microcistinas na água (Jones *et al.*, 1995).

A degradação total das microcistinas em ambientes aquáticos irá depender da sua concentração inicial, dos microrganismos presentes e, muito provavelmente, da temperatura d'água, pH e da disponibilidade de outras fontes de carbono orgânico (Jones *et al.*, 1994). A ação da luz solar, junto com os pigmentos da própria célula, aceleram o processo de decomposição das microcistinas e a sua isomerização a compostos não tóxicos (Tsuji *et al.*, 1994). Ou seja, não existe um tempo mínimo para a degradação, este irá variar de um corpo d'água para outro e de uma região para outra. Cada ocorrência deve ser tratada separadamente e os níveis de microcistinas devem ser constantemente monitorados, até que eles atinjam uma concentração segura. Falconer *et al.* (1994), usando porcos como modelos e utilizando metodologias de análise de risco, calcularam como sendo de  $1\mu\text{g.L}^{-1}$ , ou de aproximadamente 5.000 células.mL<sup>-1</sup>, a concentração máxima de microcistina que pode ser ingerida por um homem adulto que beba 2 litros de água por dia.

Quando uma grande floração de cianofíceas estiver ocorrendo, as companhias de abastecimento têm de evitar o rompimento das células, para impedir a liberação de toxinas para a água, ou diminuir a entrada das células na estação de tratamento, fazendo, por exemplo, uma captação a diferentes profundidades (Yoo *et al.*, 1995). Mesmo assim, esta captação tem de ser monitorada, pois florações hepatotóxicas da espécie *Oscillatoria agardhii* já foram observadas na região metalimnética de um lago finlandês (Lindholm e Meriluoto, 1991). Como nem sempre isto é possível, o desenvolvimento de métodos que permitam a retirada e/ou a degradação das toxinas é de extrema importância.

Já se sabe que os sistemas convencionais de tratamento de água, que incluem floculação, decantação e filtração, não retiram as microcistinas d'água (Wheeler *et al.*, 1942,



Hoffmann, 1976, Keijola *et al.*, 1988, Himberg *et al.*, 1989, citados em Yoo *et al.*, 1995). Porém, com o uso de carvão ativado e/ou a aplicação de ozônio nas estações de tratamento e em condições de laboratório, foi possível a eliminação da toxina (Falconer *et al.*, 1983, 1989, Keijola *et al.*, 1988, Donati *et al.*, 1994, citados em Lambert *et al.*, 1994). Recentemente, Nicholson *et al.* (1994) mostraram que cloro ( $1-2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ou hipoclorito de cálcio ( $2,5-16 \text{ mg.L}^{-1}$ ) podem destruir mais de 90% de microcistina-LR ( $130-300 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em solução aquosa, após 30 minutos. A possibilidade de cloração da água para eliminar microcistinas tem uma grande importância, principalmente em regiões pobres, onde as condições de tratamento da água são mais limitadas. A eficiência da cloração é dependente do pH, e o seu uso em grandes quantidades deve ser controlado, em virtude da possibilidade de formação, em águas ricas em matéria orgânica, de cloraminas ou de outros compostos orgânicos halogenados (Nicholson *et al.*, 1994).

Graças ao crescente consumo de água, como consequência do aumento das atividades industriais e da população mundial, cresce também a preocupação com o possível fim deste recurso. De toda a água do nosso planeta, apenas 0,62% é doce, sendo que deste percentual apenas a metade está disponível (Wilson, 1983; Lencastre e Franco, 1984, citados em Esteves 1988). Além disso, a qualidade da água utilizada para consumo também vem decaindo, o que tem levado os governos a gastar mais no seu tratamento. Pensando nisto, a Organização das Nações Unidas (ONU) promoveu em 22 de março de 1996 o "Dia Mundial da Água"<sup>5</sup>.

As florações de cianofíceas passam a representar mais um problema, uma vez que sua ocorrência vem se tornando mais freqüente, e, diminuindo ainda mais a qualidade da água consumida, tornaram-se um perigo real para a saúde humana. Isto implica um maior gasto no tratamento de água, pois as companhias com esta função deverão possuir recursos técnicos e humanos a fim de reconhecer e eliminar as cianotoxinas das águas. Investimentos terão que ser feitos também para diminuir o processo de eutroficação de rios, lagos e reservatórios, objetivando eliminar ou diminuir as florações.

---

<sup>5</sup> Matéria publicada em 22/03/96 no Jornal do Brasil intitulada "Escassez transforma água em substância explosiva". Uma outra boa fonte de consulta é a edição especial da Revista Ciência Hoje (junho de 1995, Vol. 19, Nº 110) que traz vários artigos abordando os problema de manejo e a qualidade das águas brasileiras.

## 1.9 - CIANOFÍCEAS TÓXICAS NO BRASIL

No Brasil, até o final da década de 80, só havia 190 trabalhos publicados a respeito das cianofíceas. Destes, 42% eram sobre taxonomia, 37%, sobre ecologia (incluindo limnologia), 16,5%, em hidrobiologia, 2,5%, em levantamentos bibliográficos e somente 2%, em fisiologia (Senna, 1987). Nenhum destes trabalhos abordou o problema de produção de toxinas por estes organismos. O pouco conhecimento da ocorrência de florações tóxicas de cianofíceas no Brasil, bem como relatos de envenenamento de animais e seres humanos devido a estes eventos, provavelmente é uma consequência do início tardio de sua investigação. Os primeiros estudos foram iniciados no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas NPPN - UFRJ e os resultados começaram a ser apresentados em reuniões científicas a partir de 1990.

Em nosso país, além dos casos já citados no item 1.6, foram relatadas no estado de São Paulo mortandades de pombos e patos em dois lagos que apresentavam florações tóxicas do gênero *Microcystis* (Beyruth *et al.*, 1992) e a ocorrência de florações tóxicas da espécie *M. aeruginosa* no reservatório do Funil - RJ, que abastece a cidade do Rio de Janeiro (Bobeda, 1993) e na lagoa dos Patos - RS (Matthiensen *et al.*, 1996). Segundo Tundisi e Matsumura-Tundisi (1992), *M. aeruginosa* é a espécie mais comum nos corpos d'água brasileiros, como consequência do processo de eutroficação, podendo ainda citar *Anabaena* sp., *A. spiroides*, e *Anabaenopsis* sp. Das cepas de cianofíceas isoladas de diferentes corpos d'água brasileiros, pelo nosso laboratório, 75% delas mostraram-se hepatotóxicas após a realização de bioensaios (Costa & Azevedo, 1994).

Como já foi mencionado anteriormente, ainda há pouco conhecimento da influência dos fatores ambientais no controle da síntese das microcistinas. Por entendermos que a luz tem um importante papel nesse controle e partindo do princípio que durante uma floração as células ficam expostas a altas intensidades luminosas, acreditamos que a realização de um estudo em que cepas de *M. aeruginosa* produtoras e não-produtoras de microcistinas fossem submetidas a mudanças no regime de densidade de fluxo de fótons durante o seu cultivo, poderia nos fornecer subsídios para uma melhor compreensão de como a biosíntese desta toxina é controlada. Além disso, como estas toxinas purificadas já são comercializadas para fins científicos, as condições ótimas para a sua síntese irão proporcionar também, melhores rendimentos durante a sua produção.

## 2 - OBJETIVOS

Tendo em vista os fatos já apresentados, este trabalho teve como objetivos:

- Estudar a influência de diferentes regimes de irradiância na produção de microcistinas em uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) produtora desta toxina e uma possível indução da síntese de microcistinas em uma cepa não-tóxica (NPCD-1) desta mesma espécie;
- Determinar o número de diferentes microcistinas produzidas pela cepa NPLJ-4;
- Acompanhar a síntese de microcistinas em diferentes fases do crescimento celular;
- Estudar a relação entre o conteúdo de clorofila a, proteínas e carboidratos intracelulares totais e a síntese de microcistinas e
- Relacionar alguns parâmetros da atividade fotossintética (taxa fotossintética máxima, rendimento quântico máximo aparente e respiração no escuro) com o conteúdo de microcistinas.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas duas cepas da espécie *Microcystis aeruginosa*, isoladas de corpos d'água da cidade do Rio de Janeiro. A cepa NPLJ-4, produtora de microcistinas, foi isolada de uma amostra da Lagoa de Jacarepaguá, enquanto a cepa NPCD-1, não-tóxica, foi isolada de um reservatório de água do bairro Cidade de Deus.

Utilizou-se o meio de cultivo ASM-1, descrito por Gorham *et al* (1964) para a manutenção e para os experimentos com as cepas (Tabela I). Este meio foi modificado por nós nas concentrações de  $ZnCl_2$  ( $3,2\mu mol.L^{-1}$ ) e  $CuCl_2$  ( $0,0008\mu mol.L^{-1}$ ), além de substituímos o  $K_2HPO_4$  ( $100\mu mol.L^{-1}$ ) por  $KH_2PO_4$ . Entre parênteses são mostradas as concentrações originais destes sais.

Tabela I: Composição do meio ASM-1 utilizado. Concentrações em  $\mu mol.L^{-1}$

$NaNO_3$	2000
$MgCl_2$	200
$MgSO_4$	200
$CaCl_2$	200
$KH_2PO_4$	128
$Na_2HPO_4$	100
$H_3BO_3$	40
$MnCl_2$	7
$FeCl_3$	4
$ZnCl_2$	2,2
$CoCl_2$	0,08
$CuCl_2$	0,014
$Na_2EDTA$	20

O isolamento das cepas foi feito a partir de colônias crescidas em meio sólido, de acordo com o procedimento descrito por Shirai *et al.* (1989) e modificado por nós. O meio

sólido tinha a mesma composição do descrito acima, acrescido de ágar na concentração final de 1%. O isolamento das cepas pelo método de plaqueamento garantiu a homogeneidade genética das mesmas, pois as colônias que se desenvolveram no meio sólido e foram escolhidas para iniciar cada cepa, originaram-se de uma única célula.

A manutenção das cepas foi feita em tubos de ensaio contendo meio ASM-1 esterilizado a 121<sup>o</sup>C por 20min, pH inicial 8,0, sem aeração, temperatura de 24±2<sup>o</sup>C, sob uma baixa intensidade luminosa<sup>6</sup> e fotoperíodo de 12h. Ambas as cepas não estavam axênicas.

Em todos os casos a iluminação das culturas foi feita com lâmpadas fluorescentes e as estimativas das intensidades luminosas foram feitas com o sensor quântico (Li-185B, Li-Cor Inc.) posicionado do lado de fora dos mariotes (garrações de cultivo).

### 3.1 - CONDIÇÃO CONTROLE

As cepas foram cultivadas em mariotes de 9L contendo 7L de meio esterilizado a 121<sup>o</sup>C por 20min, pH inicial 8,0, com aeração (obtida com o auxílio de uma bomba de aquário), temperatura de 24±2<sup>o</sup>C e fotoperíodo de 12h. A cepa NPLJ-4 foi cultivada sob 40 e 180µmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e a cepa NPCD-1, apenas sob a menor intensidade luminosa. Isto porque não detectamos produção de microcistina em nenhum dos experimentos realizados anteriormente, em que ela cresceu sob 40µmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e foi submetida à mudança da irradiância de 40 para 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Todos os cultivos foram feitos em triplicatas e as culturas foram iniciadas, aproximadamente com 2.10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>, estando os inóculos no final da fase exponencial (ou logarítmica) de crescimento e adaptados a estas irradiâncias por um período de aproximadamente cinco gerações.

---

<sup>6</sup> A maioria das cepas que são mantidas em nosso Banco de Culturas crescem sob uma intensidade luminosa menor que 20µmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Este procedimento diminui a velocidade de divisão das células, tornando a manutenção do Banco mais fácil.

### 3.2 - MUDANÇA NA INTENSIDADE LUMINOSA

Ambas as cepas foram submetidas, por 104h, a uma mudança na intensidade luminosa de 40 para 180 $\mu$ moles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, quando atingiram a fase de desaceleração da divisão celular (período entre o final da fase exponencial de crescimento e o início da fase estacionária), o que correspondeu ao 15<sup>o</sup> dia de cultivo. Além disso, outro experimento foi feito com a cepa NPLJ-4, no qual o padrão de irradiância foi alterado no final da fase exponencial (a partir do 7<sup>o</sup> dia de cultivo). Em todos estes casos, os inóculos estavam adaptados à intensidade de 40 $\mu$ moles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. As outras condições de cultivo foram iguais às das culturas controle.

Iremos chamar de experimento I aquele que foi realizado com a cepa NPLJ-4 a partir do final da fase de desaceleração da divisão celular, (inclusive as culturas que se desenvolveram sob 40 e 180 $\mu$ moles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e de experimento II aquele realizado a partir do final da fase exponencial de crescimento.

### 3.3 - PARÂMETROS FISIOLÓGICOS ANALISADOS

Antes da mudança da irradiância, o crescimento das culturas, de ambas as cepas, foi acompanhado pela análise dos seguintes parâmetros fisiológicos: crescimento celular, conteúdo de clorofila a, e proteínas e carboidratos intracelulares. Retiraram-se amostras de 3 em 3 dias, nos experimentos em que a mudança ocorreu durante a fase de desaceleração da divisão celular, e de 2 em 2 dias naqueles em que a alteração ocorreu no final da fase exponencial de crescimento.

A partir da alteração da intensidade luminosa, as amostragens para a análise dos parâmetros fisiológicos já citados, inclusive das culturas controle, foram feitas duas vezes por dia. A primeira amostra era retirada após 3h de iluminação e a segunda, após 11h. Os tempos de amostragem foram 0, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80, 96 e 104h, e para a verificação da produção de microcistina e biomassa, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 104h.

Em razão da maior velocidade de divisão das células que se desenvolveram sob a irradiância de 180 $\mu$ moles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e por, nesta condição, as células atingirem mais

rapidamente a fase estacionária, a retirada das amostras começou a ser feita dois dias antes, ou seja, 13<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias, no experimento I e no experimento II, respectivamente. Este procedimento foi necessário para poder analisar as células em condições fisiológicas semelhantes, dentro de uma curva de crescimento.

Em ambas as etapas, todas as amostras foram retiradas em duplicata, exceção feita para o crescimento celular e produção de biomassa.

Para que o crescimento celular fosse acompanhado por contagens das células em câmara de Fuchs-Rosenthal, as amostras de ambas as cepas eram submetidas a um processo de rompimento de colônias. A cepa NPCD-1, graças a uma maior produção de mucilagem, forma colônias maiores e mais difíceis de serem rompidas. Por isso, era submetida a um tratamento mais drástico, que incluía a adição na amostra de NaOH 1M, na proporção de 2:1 e banho-maria a 60<sup>o</sup>C por 10min. A cepa NPLJ-4, por formar colônias menores e mais fáceis de serem rompidas, era submetida apenas a banho-maria a 80<sup>o</sup>C por 5min (Humphries & Widjaja, 1979). As amostras eram então fixadas em solução de lugol.

Foi determinado também o rendimento máximo das culturas, que corresponde ao número máximo de células.mL<sup>-1</sup>, atingido durante a curva de crescimento. A velocidade específica de crescimento e o tempo médio de duplicação das culturas foram calculados pelas fórmulas descritas em Fogg e Thake, (1987):

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

em que,  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento,  $N_2$  e  $N_1$  são o número de células.mL<sup>-1</sup> nos tempos  $t_2$  e  $t_1$ ;

a partir de  $\mu$  podemos calcular o tempo de duplicação (G),

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

Para a análise do conteúdo de clorofila a, amostras de volume conhecido eram submetidas a um aumento de pressão, pelo emprego de uma seringa com a extremidade fechada. Este procedimento objetivava romper os vacúolos gasosos das células. Em seguida, as amostras eram centrifugadas a 1600g por 5min, em centrífuga de bancada Fanen, modelo 206-R. Ao precipitado eram adicionados 5mL de metanol 100% e, após agitação em Vortex, a suspensão era incubada por 15min no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão era novamente centrifugada e a clorofila a presente era determinada por espectrofotometria a 665nm (Shimadzu, modelo UV - 1601). Para o cálculo de sua concentração, utilizou-se o coeficiente de extinção determinado por MacKinney (1941).

A determinação do conteúdo de proteínas intracelulares foi feita filtrando-se um volume conhecido das culturas em filtros de borossilicato (AP-20 Millipore - 13 mm), previamente calcinados a 400°C em forno mufla durante 4h. Os filtros eram então guardados em tubos de ensaio selados a uma temperatura de -20°C até que fossem analisados. Para a extração das proteínas, realizou-se digestão alcalina das amostras, adicionando-se 1mL de NaOH 1M sobre os filtros e estes eram incubados por 15min em banho-maria a 100 °C em tubos de ensaio selados. Posteriormente, neutralizavam-se as amostras com 1mL de HCl 1M. Após nova filtração em filtro de borossilicato, eram retiradas alíquotas de 1mL e a estas era adicionado igual volume do reagente de Comassie-blue. Em seguida, foram feitas leituras espectrofotométricas a 595nm (Shimadzu, modelo UV - 1601) para a determinação de proteínas nas amostras, calcularam-se as concentrações, utilizando-se soro albumina bovina como padrão (Bradford, 1976).

Os mesmos procedimentos para a filtração e estocagem das amostras, descritos para a análise da produção de proteínas, foram seguidos para a determinação da produção de carboidratos. Para a extração dos carboidratos intracelulares, era adicionado sobre os filtros 1mL de ácido sulfúrico 80%. Após 20h em temperatura ambiente, a reação era interrompida com a adição de 5mL de água deionizada (Myklestad e Haug, 1972). Desta solução eram retiradas alíquotas de 1mL e a estas adicionavam-se 0,5mL de fenol 5% e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos contendo as amostras eram deixados esfriando por no mínimo 30min e em seguida as suas absorbâncias eram determinadas em espectrofotômetro a 485nm (Shimadzu, modelo UV - 1601). Os cálculos para a determinação da concentração de carboidratos foram feitos utilizando-se glicose como padrão (Dubois *et al.*, 1956).



O acompanhamento da produção de biomassa se fez apenas nos experimentos realizados com a cepa NPLJ-4 e somente no experimento II. Para isto, volumes conhecidos das culturas foram centrifugados, após os vacúolos gasosos terem sido rompidos, a 1600g por 10min em centrífuga de bancada Fanen, modelo 206-R, em temperatura ambiente e os precipitados ressuspensos em água deionizada, para lavagem das células. Após nova centrifugação, adicionaram-se aproximadamente 2mL de água deionizada aos precipitados e as suspensões celulares foram separadas em frascos de 30mL para serem liofilizadas. Após o término deste processo, as amostras tiveram os seus pesos secos determinados em balança analítica Ohaus - AS 200.

### **3.4 - ANÁLISE QUANTITATIVA DE MICROCISTINAS**

Para a determinação do conteúdo de microcistinas, volumes conhecidos das culturas de ambas as cepas foram retirados, a partir do início da alteração da irradiância, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 104h. Os procedimentos seguintes de centrifugação, lavagem das células e liofilização foram os mesmos já descritos para a análise da produção de biomassa.

Alíquotas, previamente pesadas, das amostras liofilizadas foram enviadas para o laboratório do professor Dr. W.W. Carmichael (Wright State University - Ohio - EUA), para a quantificação da microcistina produzida, pelo método de ELISA (Chu *et al.* 1989; Chu *et al.* 1990).

### **3.5 - ANÁLISE QUALITATIVA DE MICROCISTINAS**

Determinou-se da composição de microcistinas produzidas pela cepa NPLJ-4 mediante a utilização de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para isto, as microcistinas foram extraídas seguindo-se o método, modificado por nós, de Krishnamurthy *et al.* (1986). As células liofilizadas, previamente pesadas, foram extraídas em solução de butanol/metanol/água (1:4:15, v/v) durante uma hora, com agitador magnético e em temperatura ambiente.

Após este período, a suspensão foi centrifugada em centrífuga refrigerada Fanen modelo FR 22 por 30min a 3500g. O sobrenadante foi recolhido e repetiu-se mais duas vezes o processo de extração com o precipitado. Ao final, os sobrenadantes foram combinados e, com auxílio de um fluxo de ar quente, evaporados a um volume correspondente a 1/3 do original. Com este extrato foi feita uma pré-purificação, passando-o por um cartucho preenchido com aproximadamente 3g de octadecilsilano (Bond Elut C<sub>18</sub>), previamente ativado com 30mL de metanol e 40mL de água deionizada, nesta ordem.

O cartucho foi lavado com 20mL de água deionizada, 20mL de metanol 20% (v/v) em água e por fim a fração tóxica foi eluída com 20mL de metanol 100%. Esta última fração foi levada à secura e ressuspensa em 3mL de água deionizada. Antes de ser purificada por HPLC, foi filtrada em em filtro de nylon (diâmetro de 13mm e poro de 0,45µm, Millipore).

A purificação das microcistinas foi feita em duas etapas, a primeira em coluna semipreparativa e em seguida por meio de coluna analítica, utilizando-se técnica de HPLC.

### 3.5.1 - CROMATOGRAFIA SEMIPREPARATIVA

Nesta etapa utilizou-se uma coluna semipreparativa (Supelcosil LC-18 (C<sub>18</sub>), 5µm, 250mm x 10mm), fase móvel de acetonitrila/acetato de amônio 20mM pH 5,0 (28:72 v/v). Todas as soluções e solventes foram filtrados previamente em filtros de nylon (diâmetro de 47mm, poro de 0,45µm, Millipore), antes de sua utilização, e foram desgasificados durante 30min em banho de ultra-som. O sistema de HPLC, bem como as condições utilizadas, está descrita nas tabelas II e III, respectivamente.

Tabela II - Descrição dos componentes do sistema HPLC utilizado (Shimadzu)

COMPONENTES	DESCRIÇÃO
DETECTOR	U.V./Vis. SPD-10A
BOMBAS	LC-10AS
INTEGRADOR	CR6A
LOOP	2mL

Tabela III - Descrição das condições utilizadas durante a cromatografia semipreparativa

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
COLUNA	Supelcosil, LC-18, 5 $\mu$ m, 250mm x 10mm
FLUXO (mL.min <sup>-1</sup> )	3.0
DETECÇÃO (nm)	238
VOLUME INJETADO (mL)	0,5
TEMPO (min)	60

Todos os picos registrados foram recolhidos separadamente em frascos de vidro. Ao final, as frações correspondentes, obtidas em cada injeção, foram misturadas e levadas à secura sob fluxo de ar quente.

### 3.5.2 - CROMATOGRAFIA ANALÍTICA

Nessa etapa, pretendeu-se identificar as frações (picos) tóxicas por meio de seus espectros de U.V. Para isto as frações obtidas e levadas à secura anteriormente (item 3.5.1) foram ressuspensas em 1mL de água deionizada e filtradas em filtro de nylon (diâmetro de 13 mm, poro de 0,45 $\mu$ m, Millipore), antes de sua análise em coluna analítica. A fase móvel utilizada foi a mesma descrita para coluna semipreparativa e durante a cromatografia as soluções mantiveram-se desgaseificadas, utilizando-se um fluxo de gás hélio. O sistema de HPLC, bem como as condições utilizadas, está descrito nas tabelas IV e V, respectivamente.

Tabela IV - Descrição dos componentes do sistema HPLC utilizado (Shimadzu)

COMPONENTES	DESCRIÇÃO
DETECTOR	SPD-M10A - Diode array (PDA)
BOMBAS	LC-10AD
LOOP	20 $\mu$ L

Tabela V - Descrição das condições utilizadas durante a cromatografia analítica

Parâmetro	CONDIÇÃO
COLUNA	C <sub>18</sub> , Lichrospher 100 RP-18, 5µm, 125mm x 4mm
FLUXO (mL.min <sup>-1</sup> )	1,0
DETECÇÃO (nm)	238
VOLUME INJETADO (µL)	20
TEMPO (min)	10

O espectro de absorção entre 195 e 300nm, de cada pico obtido nos cromatogramas, foi analisado e comparado com o espectro de uma solução-padrão de microcistina-LR.

### 3.6 - CURVAS DE RESPOSTAS DA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA A DIFERENTES IRRADIÂNCIAS (CURVAS DE LUZ-FOTOSSÍNTESE)

A resposta da atividade fotossintética da cepa NPLJ-4 em relação a diferentes irradiâncias foi determinada somente durante o experimento II, nos tempos correspondentes a 0, 48 e 96h após a mudança da intensidade luminosa. Para isto, um volume de cada cultura era centrifugado e a suspensão celular era concentrada. Em seguida, determinava-se a concentração de clorofila (item 3.3).

Com o propósito de se trabalhar com o sistema fotossintético plenamente ativado, antes do início dos experimentos, a suspensão celular com concentração de clorofila variando entre 30 a 56µg . mL<sup>-1</sup>, era iluminada com uma irradiância de 125µmoles fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, por no mínimo 30min em uma temperatura de 25<sup>0</sup>C. A luz era provida por um projetor de "slides" CABIN (200 W).

A quantidade de oxigênio produzido, resultante do processo fotossintético, foi estimada em eletrodo de oxigênio tipo Clarke acoplado a um registrador linear. A calibração do eletrodo foi feita com ditionito de sódio e a concentração de células utilizadas era correspondente a 2µg chl.mL<sup>-1</sup> em um volume total de 4mL. Para evitar que o processo

fotossintético fosse limitado pela falta de carbono inorgânico, adicionou-se ao meio uma solução de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0, na concentração final de 10mM. A luz branca era provida por uma fonte de luz de alta intensidade (Hansatech PLS-1) direcionada por meio de fibras óticas. Os diferentes valores de intensidade luminosa, para a construção das curvas, foram obtidos com filtros de densidade neutra. A temperatura no eletrodo foi mantida a 25 °C, pelo emprego de banho termostatado (LKB 2219). Os pontos obtidos foram ajustados pela utilização de uma equação não-linear (Leverenz *et al.*, 1990, citado em Henley, 1993):

$$P = \{ \alpha I + P_m - [(\alpha I + P_m)^2 - 4\alpha I \theta]^{1/2} \} / 2\theta + R_d ;$$

em que,

P = μmoles de oxigênio produzido / mg Chl . hora;

α = rendimento quântico máximo aparente;

P<sub>m</sub> = taxa fotossintética máxima;

R<sub>d</sub> = respiração no escuro;

θ = índice de convexidade e

I = irradiância.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - CEPA NPCD-1

A mudança da intensidade luminosa de 40 para 180  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .\text{s}^{-1}$  não foi capaz de induzir a síntese de microcistinas em uma cepa não-tóxica. Resultados semelhantes foram obtidos com cepas não-tóxicas das espécies *Oscillatoria agardhii* (Sivonen, 1990) e *Nodularia sphaeroscarpa* (Lehtimäki *et al.*, 1994), que após terem sido submetidas a diferentes condições de cultivo, incluindo alterações da irradiância e variações na concentração de alguns nutrientes, não passaram a produzir hepatotoxinas.

O fato de algumas cepas produzirem toxinas e outras não, deve estar relacionado com diferenças no material genético de cada estirpe. Alguns grupos de pesquisa estão tentando clonar e mapear os genes responsáveis pela síntese de microcistinas (Neilan *et al.*, 1995; Rouhiainen *et al.*, 1995). Somente após a identificação destes, é que será possível conhecer-se realmente o potencial de cada cepa para a produção desta hepatotoxina.

Os resultados do crescimento celular, clorofila, proteínas e carboidratos intracelulares obtidos nos experimentos realizados com a cepa NPCD-1 não serão apresentados em virtude de problemas metodológicos. Esta cepa produz muita mucilagem e conseqüentemente forma colônias grandes de difícil rompimento, o que levou à necessidade de um tratamento mais drástico para a digestão da mucilagem. Este procedimento permitiria a contagem das células (item 3.3). Entretanto, a metodologia empregada, que incluía a adição de NaOH 1M, ocasionou uma lise celular. Como todos os resultados dos parâmetros fisiológicos neste trabalho foram normalizados pelo número de células, decidimos não apresentá-los, por não termos confiança na precisão deste resultado.

## 4.2 - CEPA NPLJ-4

### 4.2.1 - CRESCIMENTO CELULAR

A velocidade de divisão celular foi influenciada positivamente pela intensidade luminosa e também pela fase de crescimento em que esta foi alterada.

Sob 40  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a cepa NPLJ-4 apresentou as menores velocidades específicas de crescimento (taxa de crescimento) ( $\mu$ ), tempo de duplicação (exceção para as culturas submetidas à alteração de 40 para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  no experimento I) e os menores rendimentos celulares, quando comparados com os valores obtidos com o crescimento sob 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Figuras 5a e 5b e Tabela VI). Quando a intensidade luminosa foi alterada para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , ocorreu um aumento da velocidade de divisão celular. Na verdade, em ambos os experimentos, as células retomaram um crescimento exponencial, sendo que este foi mais acentuado no experimento II.

O cálculo de  $\mu$  a partir da alteração da irradiância foi de  $0,23.\text{d}^{-1}$  para o experimento I e de  $0,38.\text{d}^{-1}$  para o experimento II (Tabela VI). A diferença de  $\mu$  observada nestes dois casos ocorreu, provavelmente, por diferenças na quantidade de luz, nutrientes disponíveis no meio e variações no estado fisiológico das células. No primeiro caso, mesmo com um aumento da irradiância, a quantidade de luz disponível era menor, devido a uma maior concentração de células. $\text{mL}^{-1}$ . A este processo dá-se o nome de auto-sombreamento. Além disso, por causa de um período mais longo de cultivo, a quantidade de nutrientes disponíveis no meio era menor e as células já estavam entrando em fase estacionária de crescimento. Mas mesmo nestas condições as células conseguiram aumentar a velocidade de divisão celular, retornando a um crescimento exponencial.

No entanto, quando a irradiância foi alterada no final da fase logarítmica, a concentração de células era mais baixa, o que permitiu uma melhor distribuição da energia luminosa para todas as células e ainda existia uma concentração maior de nutrientes, o que proporcionou um aumento ainda maior, quando comparado com o experimento I, da velocidade de divisão celular. O valor de  $\mu$  neste caso foi praticamente igual aos valores obtidos quando esta cepa cresceu sob  $40\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Tabela VI).

Clarke *et al.* (1995) submeteram *Synechococcus* sp. PCC 7942 a uma alteração de 50 para 200  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , e observaram que a divis\~ao celular ficou interrompida por uma hora. Como a cepa NPLJ-4 foi submetida a uma condi\~ao de cultivo semelhante, \^e prov\~avel que a divis\~ao celular tenha cessado por um per\^odo. A figura 5b mostra n\~ao ter ocorrido uma varia\~ao do n\~umero de c\^elulas nas oito primeiras horas ap\^os a altera\~ao da irradi\~ancia. Entretanto, outros experimentos, com um maior n\~umero de amostragens para a contagem de c\^eluas, seriam necess\~arios para podermos evidenciar melhor este interrompimento da divis\~ao celular.

Os resultados mostraram que a irradi\~ancia era o fator limitante para o crescimento das culturas que estavam se desenvolvendo sob a menor intensidade luminosa. A partir do momento em que foi feita a altera\~ao da intensidade luminosa e ainda havia uma quantidade suficiente de nutrientes, ocorreu uma retomada do crescimento exponencial em ambos os experimentos.

O rendimento celular das culturas submetidas \^a mudan\~ca da intensidade luminosa aumentou e ficou pr\^oximo aos valores das culturas crescidas sob 180  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Este par\~ametro foi menor em todos os regimes de irradi\~ancia no experimento II. Isto se deve ao fato do tempo de cultivo ter sido mais curto, n\~ao sendo suficiente para atingir a uma concentra\~ao maior de c\^elulas (Tabela VI).



Tabela VI - Valores das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ; dia<sup>-1</sup>), tempos de duplicação (G; dia<sup>-1</sup>) e rendimento celular (R; número de células.mL<sup>-1</sup>) da cepa NPLJ-4 nas culturas que se desenvolveram sob as diferentes intensidades luminosas.

	Experimento I	Experimento II
40 $\mu$ moles fótons .m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	$\mu = 0,39 - (3)^b$ G = 1,78 R = 9,62 . 10 <sup>6</sup>	$\mu = 0,39 - (4)^b$ G = 1,76 R = 5,42 . 10 <sup>6</sup>
De 40 para 180 $\mu$ moles fótons .m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	$\mu = 0,23^a - (6)^b$ G = 3,07 R = 13,85 . 10 <sup>6</sup>	$\mu = 0,38 - (8)^b$ G = 1,84 R = 11,81 . 10 <sup>6</sup>
180 $\mu$ moles fótons .m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	$\mu = 0,47 - (3)^b$ G = 1,46 R = 16,32 . 10 <sup>6</sup>	$\mu = 0,58 - (4)^b$ G = 1,19 R = 14,62 . 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup> Apesar da taxa de crescimento ser baixa, este resultado indica que houve um aumento da velocidade de divisão celular.

<sup>b</sup> Número de pontos da curva de crescimento utilizados para o cálculo da taxa de crescimento.

\* Os valores de R do experimento II são menores que os do experimento I devido ao menor tempo de cultivo a que estas culturas foram submetidas, o que impossibilitou que as culturas daquele experimento atingissem um concentração celular maior.

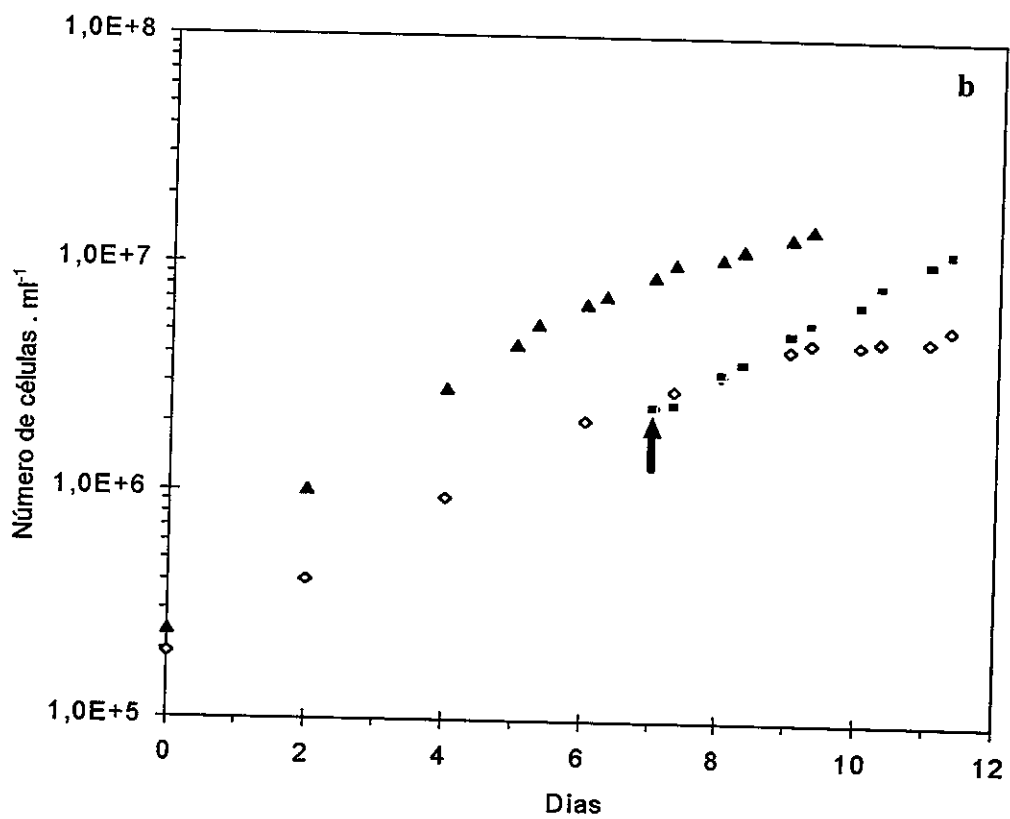
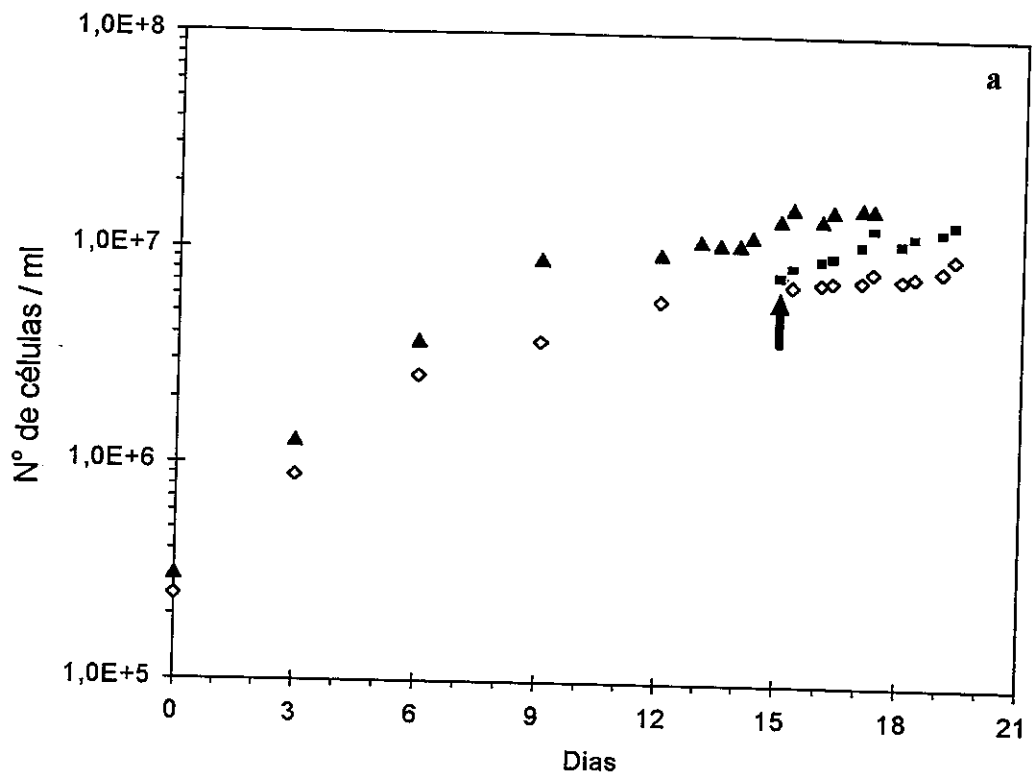


Figura 5 - Efeito das diferentes intensidades luminosas e tempos de cultivo no crescimento da cepa NPLJ-4. (a) Experimento I; (b) Experimento II. (◊) Culturas que se desenvolveram sob  $40\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; (■) culturas que foram submetidas à alteração da irradiância de 40 para  $180\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e (▲) culturas que se desenvolveram sob  $180\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . A seta indica o dia da alteração da irradiância.

#### 4.2.2 - PRODUÇÃO DE CLOROFILA

Tanto no experimento I como no experimento II, a variação da concentração de clorofila.  $10^6$  células seguiu um mesmo padrão. Foi menor durante todo o tempo de cultivo, nas culturas crescidas sob  $180\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e maior nas que cresceram sob  $40\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Alterando-se a intensidade luminosa para  $180\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a concentração deste pigmento diminuiu, sem atingir, no entanto, os mesmos n\u00edveis das culturas que se desenvolveram sob a maior irradi\u00e2ncia (Figura 6a e 6b).

Como outros grupos de algas, as cianoficeas tamb\u00e9m podem regular o conte\u00fado de pigmentos de acordo com varia\u00e7\u00f5es na intensidade luminosa aumentando, por exemplo, a concentra\u00e7\u00e3o de clorofila, quando s\u00e3o expostas a baixas irradi\u00e2ncias (Foy e Gibson, 1982b; Zevenboon e Mur, 1984). Esse controle propicia a estes organismos a manuten\u00e7\u00e3o de uma concentra\u00e7\u00e3o de pigmentos mais adequada \u00e0s varia\u00e7\u00f5es das condi\u00e7\u00f5es ambientais, permitindo uma absor\u00e7\u00e3o mais eficiente da energia luminosa, que ser\u00e1 utilizada no processo fotossint\u00e9tico. Al\u00e9m disso, esta capacidade de regula\u00e7\u00e3o tamb\u00e9m tem uma fun\u00e7\u00e3o fotoprotetora, durante a exposi\u00e7\u00e3o a altas irradi\u00e2ncias, pela diminui\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de clorofila e aumento de caroten\u00f3ides (Paerl *et al.*, 1983; R\u00fccker *et al.*, 1995).

A partir do 15<sup>o</sup> dia de cultivo, no experimento I, a concentra\u00e7\u00e3o de clorofila nas culturas sob  $40\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  come\u00e7ou a aumentar gradativamente (Figura 6a). Provavelmente, em resposta a uma menor quantidade de energia luminosa que passou a estar dispon\u00edvel para as c\u00e9lulas, como conseq\u00fancia de um auto-sombreamento. A cultura sob  $180\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  n\u00e3o apresentou uma eleva\u00e7\u00e3o nos n\u00edveis de clorofila (Figura 6a), mesmo tendo o maior rendimento celular (Tabela VI), mostrando que a quantidade de luz que chegava para as c\u00e9lulas ainda era relativamente alta. No experimento II, novamente, apenas as culturas sob a menor intensidade luminosa apresentaram, a partir do pen\u00faltimo dia de cultivo, uma pequena eleva\u00e7\u00e3o na concentra\u00e7\u00e3o de clorofila (Figura 6b), resultante de um prov\u00e1vel in\u00edcio de auto-sombreamento.

A concentra\u00e7\u00e3o de clorofila nas culturas que foram submetidas \u00e0 mudan\u00e7a da irradi\u00e2ncia nos dois experimentos n\u00e3o reduziu para os mesmos n\u00edveis observados nas culturas mantidas em  $180\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , mesmo com um n\u00famero de c\u00e9lulas.mL<sup>-1</sup> menor, o que

permitia uma melhor distribuição da luz. Provavelmente, em virtude do pouco tempo que as células tiveram para se adaptar a esta nova condição.

Os resultados também mostraram uma tendência na variação diária da concentração de clorofila, nos dois experimentos realizados. Quando as amostras passaram a ser retiradas duas vezes por dia, observou-se que a concentração de clorofila no final do período de luz, ou seja, após onze horas de iluminação, era maior que a concentração que havia sido medida no início do dia (após três horas de iluminação). Zevenboom e Mur (1984) também observaram este padrão de síntese de clorofila em *M. aeruginosa*. A síntese deste pigmento, entretanto, em *Oscillatoria redekei* (Foy e Smith, 1980) e *Oscillatoria agardhii* (Van Liere *et al.*, 1979) foi maior durante o período de escuro. Este contraste no padrão de síntese de clorofila pode ter sido causado pelas estratégias de adaptação de cada gênero a diferentes irradiâncias. Enquanto que *Oscillatoria* se adapta melhor a baixas intensidades luminosas (Van Liere e Mur, 1979; Tilzer, 1987), *Microcystis* consegue resistir a altas irradiâncias (Paerl *et al.*, 1983; Paerl *et al.*, 1985), o que permitiria a este gênero poder aumentar a síntese de clorofila durante os períodos de luz.

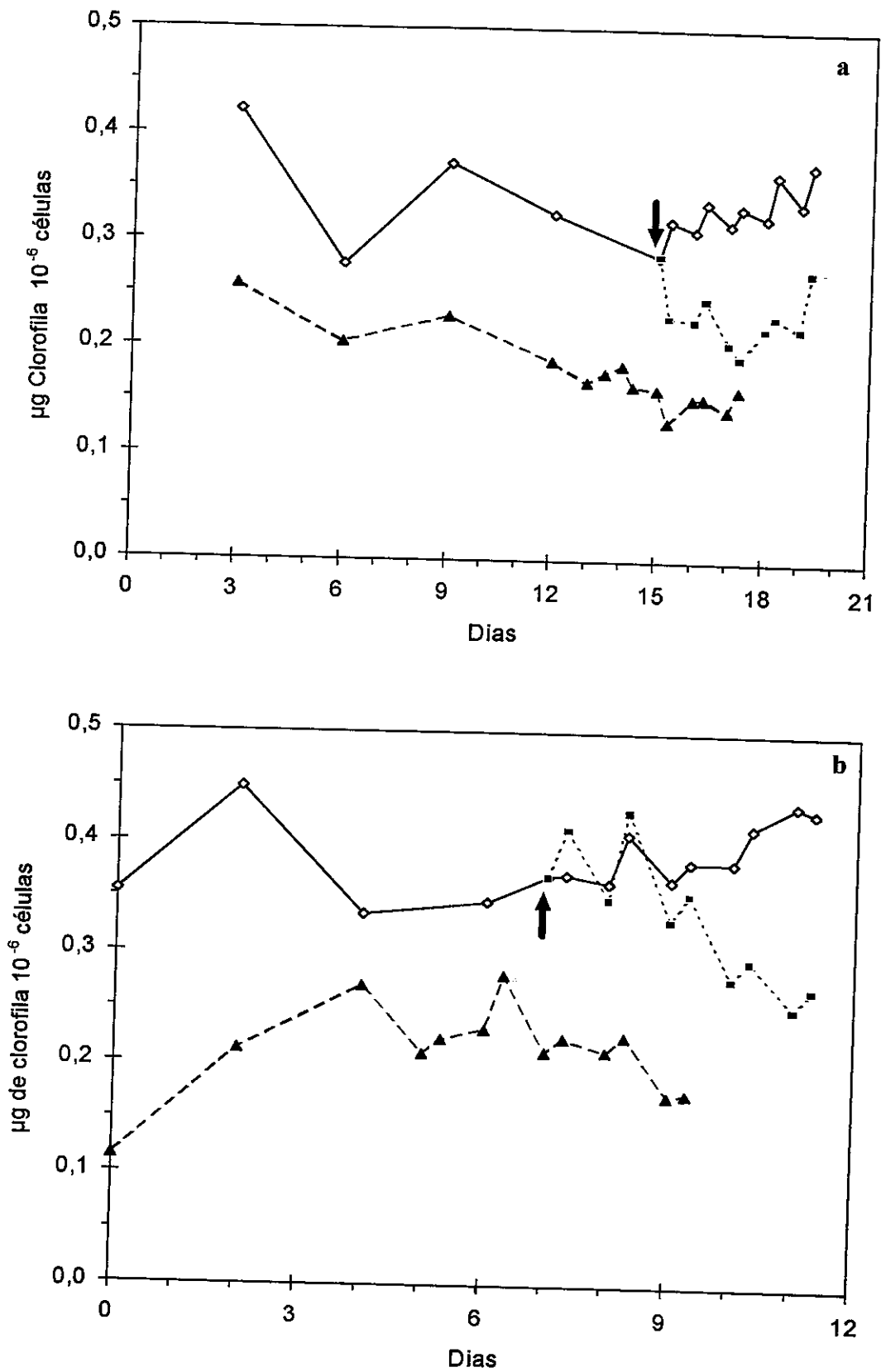


Figura 6 - Efeito das diferentes intensidades luminosas e tempos de cultivo na produção de clorofila na cepa NPLJ-4. (a) Experimento I; (b) Experimento II. (—◇—) Culturas que se desenvolveram sob  $40 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e (···■···) culturas que foram submetidas à alteração da irradiância de 40 para  $180 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e (---▲---) culturas que cresceram sob  $180 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . A seta indica o dia da alteração da irradiância.

### 4.2.3 - CARBOIDRATOS INTRACELULARES

Nos dois experimentos, os níveis de carboidratos intracelulares.  $10^6$  células foram maiores nos primeiros dias de cultivo, diminuindo com o avanço do crescimento exponencial (Figura 7a e 7b). Isto porque as culturas que foram utilizadas como inóculos estavam em final de fase exponencial, em que a concentração de carboidratos pode ser maior que no início da exponencial.

No experimento I, a concentração de carboidratos até o 9<sup>o</sup> dia foi ligeiramente superior nas culturas sob a menor intensidade luminosa (Figura 7a), o que contradiz os resultados obtidos por outros autores, que mostraram uma maior síntese de carboidratos sob uma maior irradiância (Van Liere *et al.*, 1979; Foy e Smith, 1980; Zevenboom e Mur, 1984; Kromkamp, 1987). O conteúdo de carboidratos no experimento II, porém, foi maior nas culturas que se desenvolveram sob a maior irradiância (Figura 7b).

No experimento I, a concentração de carboidratos aumentou bastante no final do cultivo nas culturas sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .\text{s}^{-1}$ . Este aumento encontra-se em consonância com os resultados obtidos com as curvas de crescimento, indicando que essas células estavam entrando em fase estacionária, pois o acúmulo de carboidratos pelas células é característico dessa fase de crescimento (Kromkamp, 1987; Tilzer, 1987). Neste experimento, como ocorreu com a clorofila, o conteúdo de carboidratos no final dos cultivos em que as células foram submetidas à alteração da intensidade luminosa, tendeu a se igualar ao das culturas desenvolvidas sob a maior irradiância. Contudo, no experimento II, não foi observada esta tendência. Após um aumento inicial do conteúdo de carboidratos nas culturas, quando foi feita a mudança da irradiância, estes voltaram a diminuir no final do cultivo, enquanto que, nas culturas sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .\text{s}^{-1}$ , pôde-se observar um aumento na concentração intracelular de carboidratos a partir do 7<sup>o</sup> dia de cultivo (Figura 7a e 7b). A diminuição do conteúdo de carboidratos nas células submetidas à alteração da intensidade luminosa pode ser interpretada como uma resposta do crescimento exponencial que estas células voltaram a ter (Figura 5b). Mesmo no experimento I, em que também ocorreu uma retomada do crescimento exponencial, só que em uma menor intensidade, houve uma redução dos níveis de carboidratos durante os primeiros dias após a alteração da intensidade luminosa, mas aumentando rapidamente em seguida.

Com a retirada de duas amostras por dia para as análises dos parâmetros fisiológicos, foi observada no experimento II uma variação na concentração diária de carboidratos nas culturas sob  $180\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a partir do 5<sup>o</sup> dia de cultivo e nas culturas sob  $40\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a partir do 7<sup>o</sup> dia. Ao final do per\u00edodo de luz a concentra\u00e7\u00e3o de carboidratos era maior do que no in\u00edcio (Figura 7b). Isto ocorre porque para a fixa\u00e7\u00e3o do carbono inorg\u00e2nico dissolvido na \u00e1gua, e conseq\u00fcente s\u00edntese de carboidratos, h\u00e1 a necessidade do fornecimento de ATP e NADPH, que por sua vez s\u00e3o gerados durante o processo fotossint\u00e9tico (Voet e Voet, 1995). Espera-se, pois, que ao final do per\u00edodo de luz, a concentra\u00e7\u00e3o de carboidratos seja maior do que no in\u00edcio do dia. Estes resultados tamb\u00e9m foram obtidos por outros autores (Foy e Smith, 1980; Paerl, 1994). \u00c9 prov\u00e1vel que o aumento da s\u00edntese de carboidratos durante o per\u00edodo de luz, verificado neste experimento, tamb\u00e9m tenha sido favorecido pela maior s\u00edntese de clorofila que ocorreu durante este mesmo per\u00edodo. Al\u00e9m disso, como as amostras do in\u00edcio de cada dia foram retiradas ap\u00f3s tr\u00eas horas de luz, a varia\u00e7\u00e3o di\u00e1ria deve ter sido bem maior.

Esta varia\u00e7\u00e3o na produ\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de carboidratos n\u00e3o p\u00f4de ser observada no experimento I. Como as culturas estavam entrando em fase estacion\u00e1ria, o metabolismo celular diminuiu, com isso os carboidratos produzidos durante a fotoss\u00edntese n\u00e3o estariam sendo aproveitados no per\u00edodo de escuro, conseq\u00fcentemente n\u00e3o ocorria uma varia\u00e7\u00e3o di\u00e1ria.

Nas figuras 7a e 7b, podemos observar um aumento abrupto nos n\u00edveis de carboidratos logo ap\u00f3s o in\u00edcio da altera\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa. Este comportamento j\u00e1 foi observado tamb\u00e9m em outras cianoficeas que se desenvolveram em condi\u00e7\u00f5es semelhantes e foram submetidas a um aumento da intensidade luminosa. C\u00e9lulas adaptadas a baixas irradi\u00e2ncias apresentam uma concentra\u00e7\u00e3o de clorofila e de pigmentos acess\u00f3rios maior, passando por isso a absorver mais eficientemente os f\u00f3tons quando s\u00e3o expostas a uma maior intensidade luminosa. Conseq\u00fcentemente, parte deste excesso de energia seria transferido para a s\u00edntese de polissacar\u00eddeos (Kromkamp, 1987).

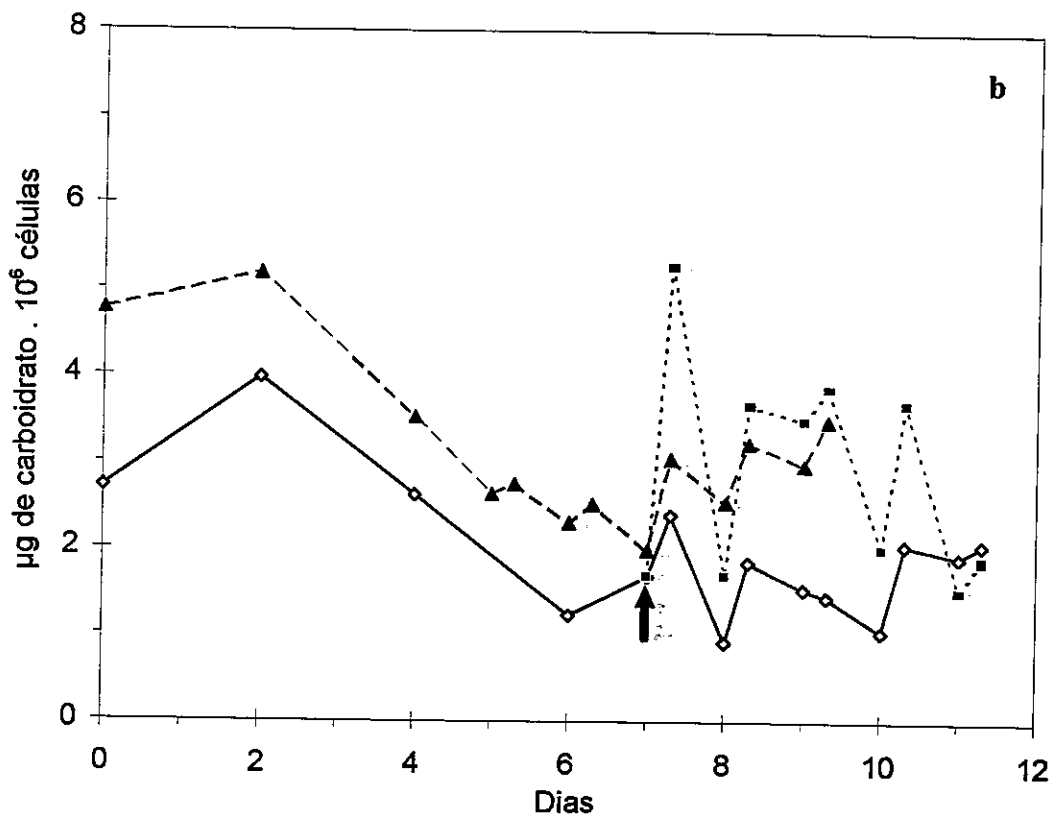
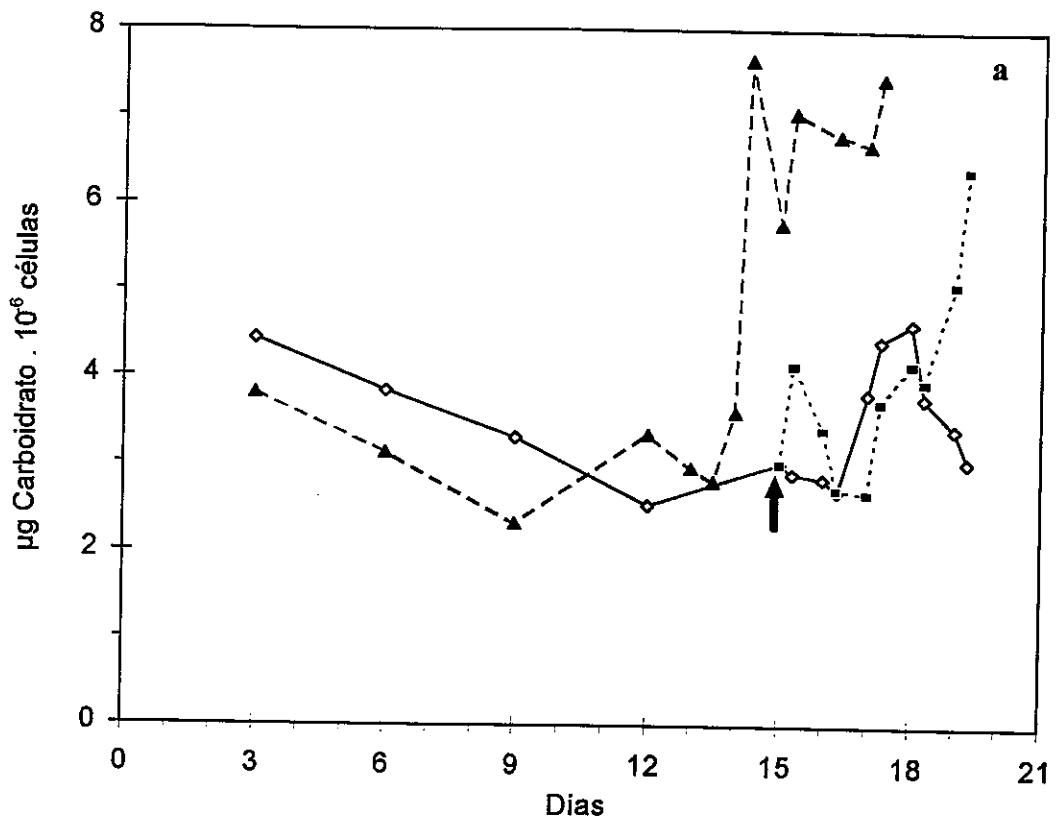


Figura 7 - Efeito das diferentes intensidades luminosas e tempos de cultivo na produção de carboidratos intracelulares na cepa NPLJ-4. (a) Experimento I; (b) Experimento II. (—○—) Culturas que se desenvolveram sob 40µmoles fôtons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, (···■···) culturas que foram submetidas à alteração da irradiância de 40 para 180µmoles fôtons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e (-▲-) culturas que cresceram sob 180µmoles fôtons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A seta indica o dia da alteração da irradiância.



#### 4.2.4 - PROTEÍNAS INTRACELULARES

As figuras 8a e 8b mostram que os níveis de proteínas.  $10^{-6}$  células foram maiores nas culturas que cresceram sob a menor intensidade luminosa. A análise dos gráficos evidencia que, durante os primeiros dias de cultivo, a síntese de proteínas foi maior em ambas as irradiâncias. Nas culturas sob a menor intensidade luminosa, a diminuição da síntese de proteínas durante o cultivo não foi tão intensa quanto a que ocorreu nas culturas sob a maior irradiância.

As diferenças nos níveis de proteínas observadas entre as culturas sob a maior e menor intensidade luminosa podem ter ocorrido em virtude de variações no conteúdo de ficobiliproteínas, principalmente ficocianina. Ficocianina é um pigmento acessório com a função de absorver fótons e transmitir a energia absorvida para o fotossistema II. Graças a sua composição proteica, também age como fonte de reserva de nitrogênio durante a falta desse elemento (Boussiba e Richmond, 1980). A concentração de ficocianina pode representar entre 11,4 a 20% do conteúdo total de proteínas intracelulares de *Spirulina platensis* (Boussiba e Richmond 1980) e sua concentração diminui quando as células são expostas a intensidades luminosas mais elevadas (Van Liere et al., 1979; Boussiba e Richmond, 1980; Foy e Smith, 1980; Foy e Gibson, 1982b; Kromkamp, 1987). Portanto, apesar de não termos medido o conteúdo de ficocianina, a redução dos níveis de proteínas observados nas culturas que cresceram ou foram submetidas a alteração da irradiância para  $180 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , pode ter sido em consequência da diminuição da concentração deste pigmento. Já Rijn e Shilo (1986) observaram que em populações naturais de *Spirulina* e *Oscillatoria* spp., a ficocianina representava apenas 3% da proteína total. Este valor não explicaria a redução da concentração de proteínas observadas nos nossos experimentos.

Nas culturas submetidas à mudança da intensidade luminosa, a concentração de proteínas diminuiu em ambos experimentos, sendo mais acentuada no experimento I, provavelmente pelas diferentes fases de cultivo em que as culturas se encontravam. No experimento I, as células estavam entrando em fase estacionária de crescimento quando a irradiância foi alterada. Conforme mencionado anteriormente, ocorreu um aumento na velocidade de divisão celular, porém menor do que aquele verificado no experimento II.

O conteúdo de proteínas das culturas submetidas à mudança da irradiância, como já havia ocorrido para a clorofila e carboidrato, teve a mesma tendência de se igualar aos níveis de proteínas das culturas que cresceram sob  $180 \mu\text{moles f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Houve uma tendência de aumento no conteúdo de proteínas em algumas condições de cultivo, em ambos os experimentos, possivelmente em decorrência de um aumento na síntese de ficocianina como resposta a um início de auto-sombreamento.

Estes resultados mostram que a análise do conteúdo de proteínas em cianofíceas deverá ser acompanhada por uma quantificação do conteúdo de ficobiliproteínas, principalmente de ficocianina. Desta maneira, será possível se saber com uma maior precisão, se as possíveis variações nos níveis de proteínas ocorrem em razão de uma alteração na velocidade de transdução de proteínas, ou se estas se devem a variações no conteúdo de ficocianina.

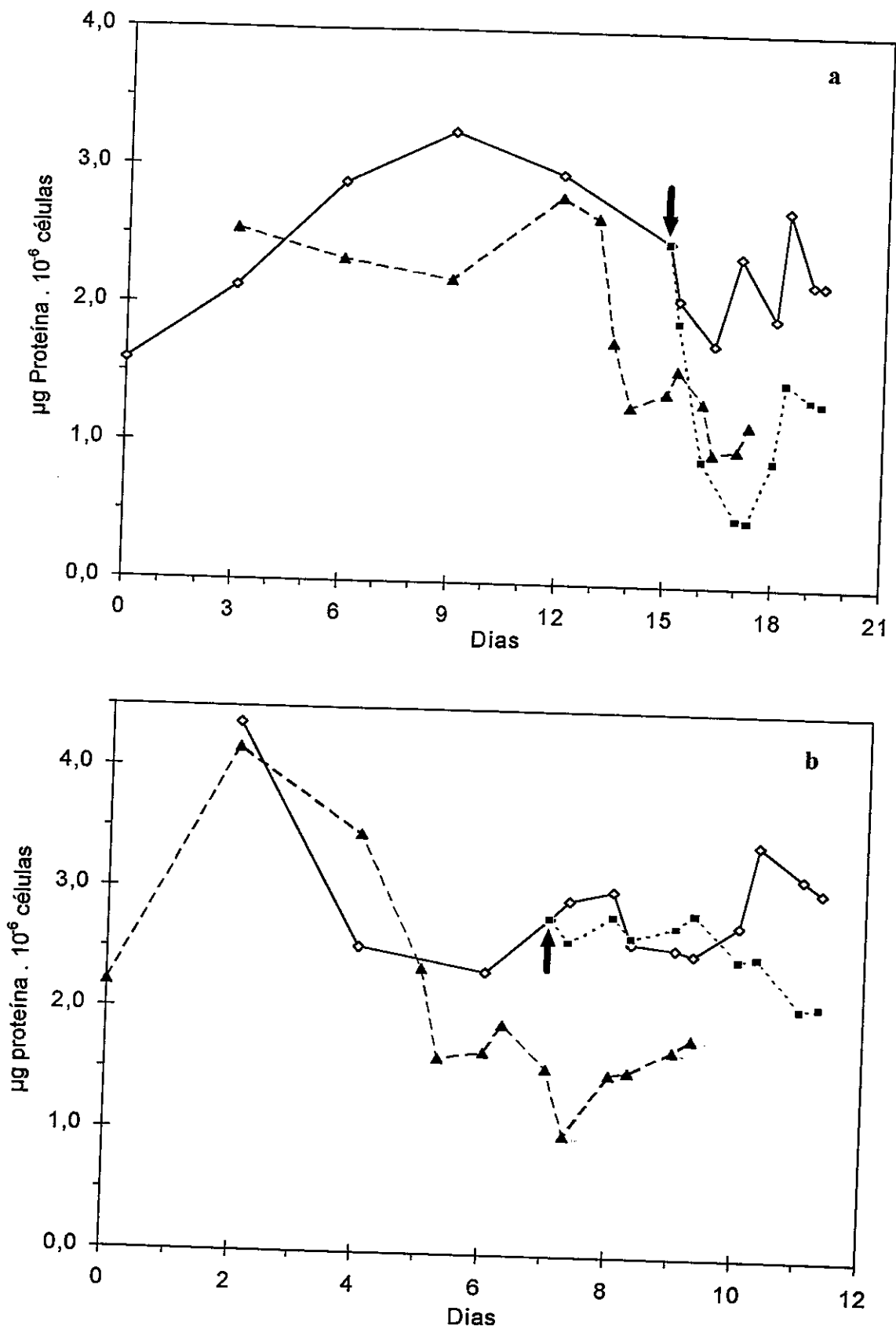


Figura 8 - Efeito das diferentes intensidades luminosas e tempos de cultivo na produção de proteínas intracelulares na cepa NPLJ-4. (a) Experimento I; (b) Experimento II. (—◇—) Culturas que se desenvolveram sob  $40 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , (···■···) culturas que foram submetidas à alteração da irradiância de 40 para  $180 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e (-▲-) culturas que cresceram sob  $180 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . A seta indica o dia da alteração da irradiância.

#### 4.2.5 - CURVAS DE RESPOSTA DA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA A DIFERENTES IRRADIÂNCIAS (CURVAS DE LUZ-FOTOSSÍNTESE)

A capacidade fotossintética das células da cepa NPLJ-4 cultivadas em diferentes regimes de intensidades luminosas foi analisada por meio da resposta da produção fotossintética de oxigênio, normalizada pela clorofila, em função de diferentes irradiâncias. Vale ressaltar que esta análise só foi feita no experimento II.

A figura 9 mostra a curva de luz-fotossíntese das células crescidas sob  $40\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  no tempo zero antes da mudança da irradiância ( $7^{\text{o}}$  dia de cultivo). Tanto a taxa fotossintética máxima ( $P_m$ ), como o rendimento quântico máximo aparente ( $\alpha$ ) apresentaram valores equivalentes (Tabela VII) aos valores obtidos nos cultivos realizados sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , nos tempos de 48 e 96 h.

Nas culturas submetidas à mudança da irradiância, foi constatada uma redução dos valores de  $P_m$  e  $\alpha$ , 48 horas após a alteração. Estes mesmos parâmetros também diminuíram nas culturas que se desenvolveram sob  $40\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Figura 10 e Tabela VII). Nestas mesmas figuras e tabelas, pode-se observar que nas culturas sob a maior intensidade luminosa o valor de  $P_m$  e o de  $\alpha$  foram os maiores, quando comparados às outras duas condições.

A figura 11 e a tabela VII mostram os resultados obtidos 96 horas após a mudança da irradiância. Pôde-se observar, então, um aumento dos valores de  $P_m$  e  $\alpha$  nas culturas submetidas à alteração da irradiância. Naquelas sob a menor irradiância, o valor de  $\alpha$  sofreu um pequeno aumento, embora tenha ocorrido uma redução de  $P_m$ . As culturas crescidas sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , tanto o  $P_m$  como  $\alpha$ , também aumentaram.

A taxa de respiração no escuro diminuiu nas culturas sob a menor intensidade luminosa e nas que foram submetidas a alteração da irradiância ao longo do experimento, e foram maiores nas culturas que se desenvolveram sob a maior intensidade luminosa (Tabela VII).

Tabela VII - Efeito das diferentes intensidades luminosas sobre o rendimento quântico máximo aparente ( $\alpha$ ;  $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} / \text{mg Chl} \cdot \text{h} \cdot \mu\text{moles f\u00f3tons}$ ), sobre a taxa de atividade fotossint\u00e9tica m\u00e1xima ( $P_m$ ;  $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$ ) e sobre a respira\u00e7\u00e3o ( $R_d$ ;  $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$ ) no experimento II. O tempo zero representa o 7<sup>o</sup> dia de cultivo para as culturas sob 40  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e para aquelas submetidas \u00e0 altera\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa de 40 para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e o 5<sup>o</sup> dia para as culturas sob 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Os valores apresentados, foram calculados pela aplica\u00e7\u00e3o da f\u00f3rmula descrita por Leverenz *et al.*, (1990) citado em Henley (1993).

	0 HORA	48 HORAS	96 HORAS
40 $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$\alpha = 1,99$ $P_m = 547,14$ $R_d = -37,53$	$\alpha = 1,42$ $P_m = 514,57$ $R_d = -33,91$	$\alpha = 1,52$ $P_m = 486,0$ $R_d = -28,80$
de 40 para 180 $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$\alpha = 1,99$ $P_m = 547,14$ $R_d = -37,53$	$\alpha = 1,45$ $P_m = 360,08$ $R_d = -27,42$	$\alpha = 1,57$ $P_m = 464,0$ $R_d = -24,72$
180 $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	ND	$\alpha = 1,93$ $P_m = 532,86$ $R_d = -40,03$	$\alpha = 2,03$ $P_m = 579,0$ $R_d = -37,65$

Obs.: Os valores no tempo zero s\u00e3o iguais para as culturas sob 40  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e para as que foram submetidas \u00e0 altera\u00e7\u00e3o da irradi\u00e2ncia.

ND - Valores n\u00e3o puderam ser determinados.

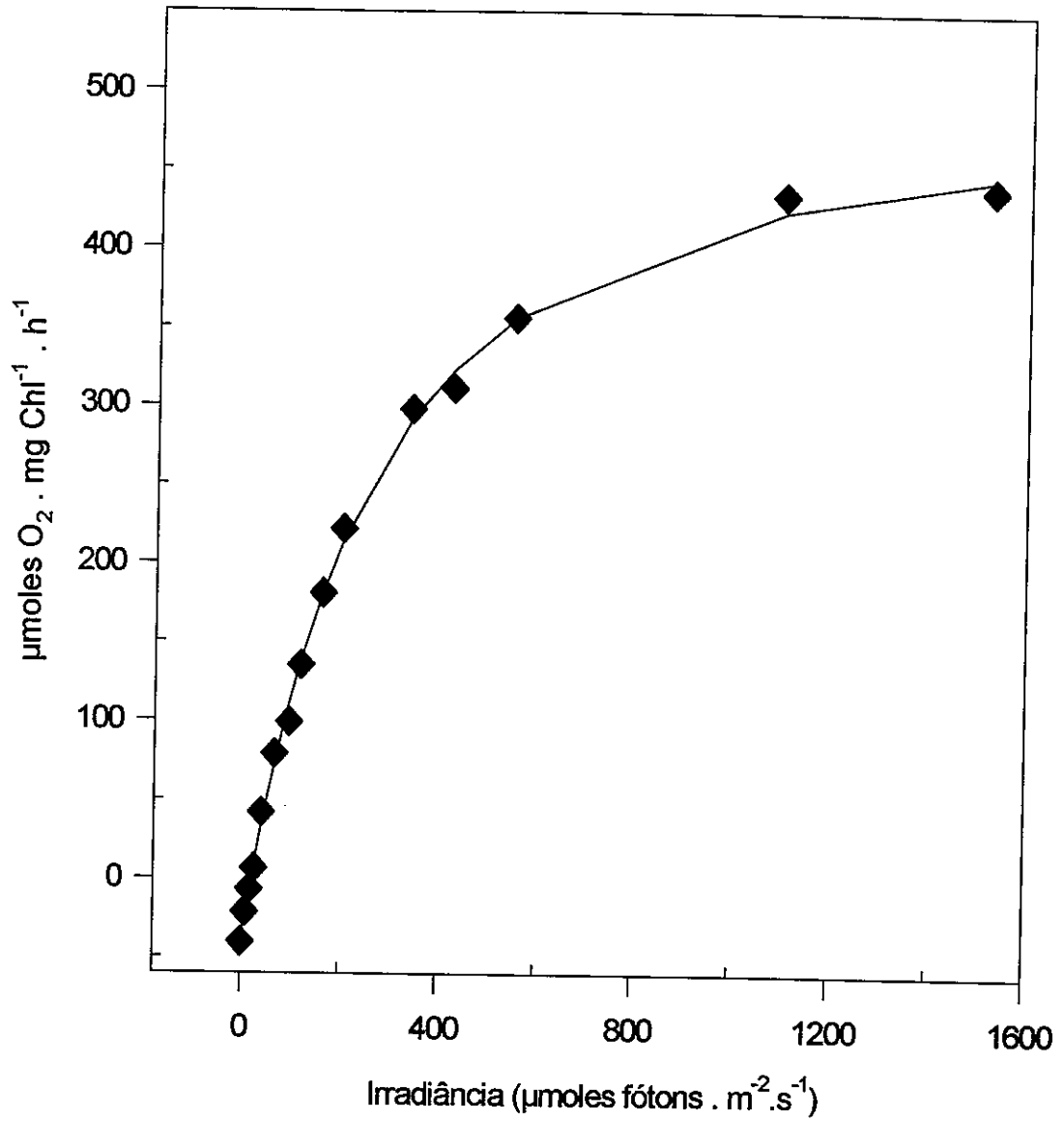


Figura 9 - Curva de luz-fotossíntese da cepa NPLJ-4 no tempo zero. Experimento II. (—◆—) Culturas que se desenvolveram sob  $40 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e. O tempo zero corresponde ao 7<sup>o</sup> dia de cultivo

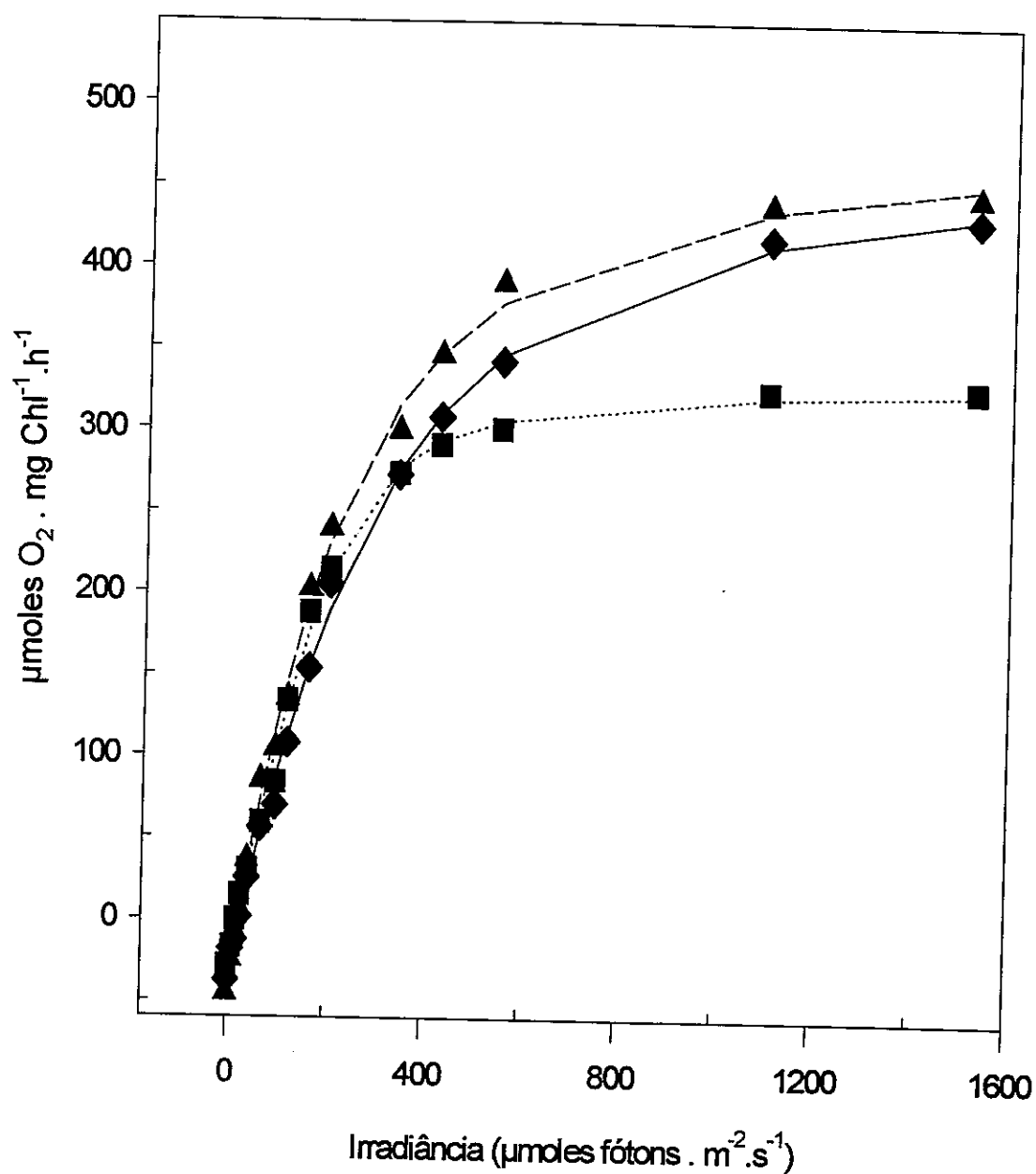


Figura 10 - Efeito dos diferentes regimes de irradi\u00e2ncia nas curvas de luz-fotoss\u00edntese da cepa NPLJ-4, 48 horas ap\u00f3s a altera\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa. Experimento II. (—◆—) Culturas que se desenvolveram sob 40  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , (---■---) submetidas \u00e0 altera\u00e7\u00e3o de 40 para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e (---▲---) crescidas sob 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . O tempo de 48 horas corresponde ao 7<sup>o</sup> dia de cultivo das culturas sob 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e ao 9<sup>o</sup> dia das culturas sob 40  $\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e das submetidas \u00e0 altera\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa.

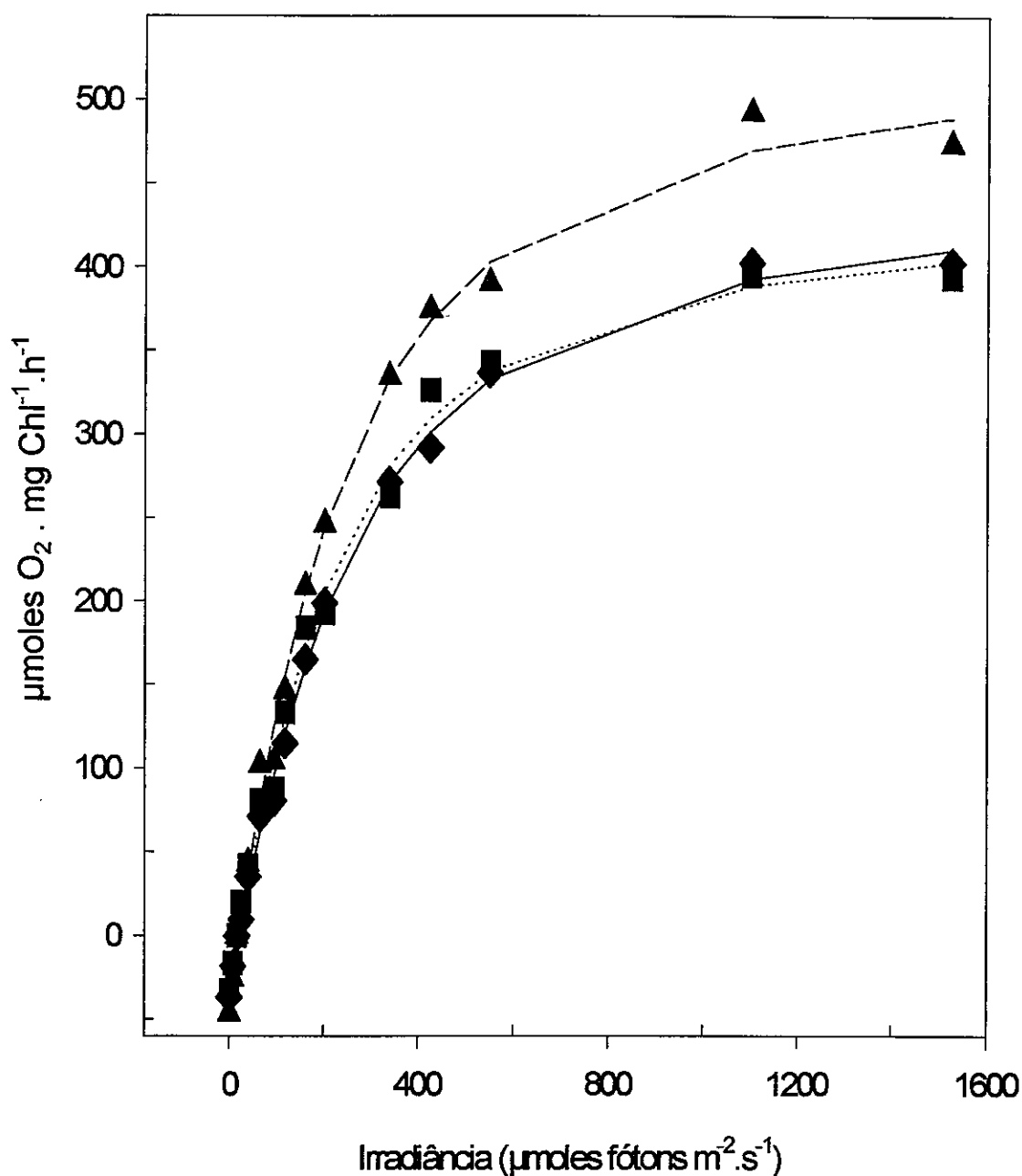


Figura 11 - Efeito dos diferentes regimes de irradiância nas curvas de luz-fotossíntese da cepa NPLJ-4, 96 horas após a alteração da intensidade luminosa. Experimento II. (—◆—) Culturas que se desenvolveram sob  $40 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , (---■---) submetidas à alteração de  $40$  para  $180 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e (---▲---) crescidas sob  $180 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Este tempo corresponde ao  $9^{\text{o}}$  dia de cultivo das culturas sob  $180 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e ao  $11^{\text{o}}$  dia das culturas sob  $40 \mu\text{moles fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e das submetidas à alteração da intensidade luminosa.



Já esta bem relatado na literatura que células adaptadas a intensidades luminosas mais baixas têm, geralmente, um maior  $\alpha$  (inclinação da curva maior) e um  $P_m$  menor (representado pelo platô da curva) (Foy e Gibson, 1982; Tilzer, 1987; Henley, 1993). Isto porque estas células têm um conteúdo de pigmentos maior, o que torna a absorção de fótons, em condições de luz baixa, mais eficiente. Mas em condições de luz saturante, a capacidade fotossintética diminui, ou seja, a velocidade e a eficiência na fixação do  $CO_2$  são menores. Isto é interpretado como um mecanismo de economia, pois células crescendo em baixas irradiâncias não precisam ter uma atividade fotossintética adaptada a altas intensidades luminosas (Tilzer, 1987; Henley, 1993).

Nas medidas feitas 48 e 96h, após a mudança da intensidade luminosa, os valores de  $P_m$  foram maiores nas culturas sob  $180\mu\text{moles fótons } .m^{-2}.s^{-1}$  e menores nas que cresceram sob  $40\mu\text{moles fótons } .m^{-2}.s^{-1}$ . No entanto, houve uma redução dos valores de  $\alpha$  nas células que cresceram sob a menor irradiância (Figuras 10 e 11 Tabela VII). Segundo Zevenboom e Mur (1984), que também trabalharam com *M. aeruginosa*, esta redução de  $\alpha$  pode ter ocorrido em virtude de um auto-sombreamento das moléculas de clorofila, que estão em maiores concentrações nas células adaptadas a baixas intensidades luminosa (Figura 6b). Este aumento da concentração de clorofila pode incluir duas estratégias distintas, quais sejam, pelo aumento do tamanho ou do número das unidades fotossintéticas (Zevenboom e Mur, 1984; Harrison, 1988; Rücker *et al.*, 1995). Adotando uma destas duas estratégias, estes organismos podem controlar o conteúdo de pigmentos para melhor se adaptarem às flutuações da irradiância que ocorrem no ambiente natural. De acordo com o modelo proposto por Harrison (1988), provavelmente a cepa NPLJ-4 controla a conteúdo de pigmentos aumentando ou diminuindo a quantidade de unidades fotossintéticas.

Uma outra possibilidade que explicaria a redução dos valores de  $\alpha$  e  $P_m$  a partir das curvas feitas no tempo de 48 horas nas culturas sob a menor intensidade luminosa, seria a diminuição da atividade fotossintética, como consequência de um início de fase de desaceleração da divisão celular.

Após 48h, as culturas que foram submetidas à alteração da irradiância apresentaram o menor  $P_m$  e uma redução dos valores de  $\alpha$ . Como estas células estavam adaptadas a baixas intensidades luminosas e foram expostas a uma intensidade quase cinco vezes mais alta, deve ter ocorrido um processo de fotoinibição. Ibelings (1996) concluiu que cianofíceas adaptadas a

condições em que a luz é limitante são mais susceptíveis à fotoinibição quando expostas a irradiâncias mais elevadas. Duas características do processo fotoinibitório são a redução do  $P_m$ , (Henley *et al.*, 1991 citados em Silva, 1995; Vonshak e Guy, 1992) e a diminuição de  $\alpha$  (Leverenz *et al.*, 1990 citado em Henley, 1993). Estas duas características foram observadas nestas culturas, mas a diminuição de  $\alpha$  também ocorreu nas culturas sob  $40 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , provavelmente por um outro motivo. Como j\u00e1 foi comentado, por serem c\u00e9lulas adaptadas a condi\u00e7\u00f5es de baixa intensidade luminosa, deve ter ocorrido um auto-sombreamento das mol\u00e9culas de clorofila, ou as c\u00e9lulas entraram em uma fase de desacelera\u00e7\u00e3o da divis\u00e3o celular, com conseq\u00fcente diminui\u00e7\u00e3o da atividade fotossint\u00e9tica.

Ap\u00f3s 96h de exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 nova irradi\u00e2ncia, houve um ligeiro aumento tanto de  $\alpha$  como do  $P_m$ , o que indica que as c\u00e9lulas estavam em processo de fotoaclima\u00e7\u00e3o. Em experimentos semelhantes aos nossos, *Synechococcus* sp. PCC 7942 foi fotoinibida ap\u00f3s a mudan\u00e7a da intensidade luminosa de 50 para  $200 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Clarke *et al.*, 1995). Durante as primeiras horas, o crescimento celular diminuiu e a produ\u00e7\u00e3o de oxig\u00eanio aumentou drasticamente. Contudo, a adapta\u00e7\u00e3o \u00e0 nova condi\u00e7\u00e3o, que incluiu a retomada do crescimento celular e a normaliza\u00e7\u00e3o da produ\u00e7\u00e3o de oxig\u00eanio, ocorreu em apenas 8 horas. Este menor tempo \u00e9 esperado, j\u00e1 que o mesmo trabalho mostra ser o tempo de duplica\u00e7\u00e3o desta esp\u00e9cie de apenas 4 horas.

Os nossos resultados est\u00e3o de acordo com os obtidos por outros autores, que mostraram que *M. aeruginosa* \u00e9 uma das esp\u00e9cies mais bem adaptadas a resistir a altas irradi\u00e2ncias (Zevenboom e Mur 1984; Paerl *et al.*, 1985), mesmo quando comparadas a outras cianoficeas. A atividade fotossint\u00e9tica m\u00e1xima de *Anabaena siamensis*, cultivada em condi\u00e7\u00f5es semelhantes \u00e0s nossas, era saturada em torno de  $100 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Silva, 1995), enquanto que nos nossos experimentos a cepa NPLJ-4 teve a atividade fotossint\u00e9tica saturada em uma faixa que variou de 360 a  $580 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Segundo Paerl *et al.*, (1983), a capacidade de *M. aeruginosa* resistir \u00e0s altas irradi\u00e2ncias se deve \u00e0 s\u00edntese de caroten\u00f3ides fotoprotetores.

Ibelings (1996) mostrou que a taxa respirat\u00f3ria aumentava com o incremento da irradi\u00e2ncia, certamente em raz\u00e3o de uma maior disponibilidade de carboidratos, que t\u00eam a sua s\u00edntese intensificada nessas condi\u00e7\u00f5es. Nos nossos experimentos, de uma maneira geral, a taxa respirat\u00f3ria foi maior nas culturas que se desenvolveram sob  $180 \mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , sendo

nesta condição também observadas as maiores concentrações intracelulares de carboidratos (Figura 7b).

As culturas que foram submetidas a mudança da irradiância apresentaram taxas respiratórias baixas, apesar do aumento nos níveis de carboidratos. Este variou, porém, ao longo destas culturas (Figura 7b), provavelmente como uma resposta ao processo de fotoaclimatação pelo qual as células estavam passando.

#### 4.2.6 - PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS

A análise qualitativa da composição de microcistinas na cepa NPLJ-4, por técnicas de HPLC, revelou a presença de pelo menos três tipos diferentes desta toxina. A figura 12 mostra o cromatograma obtido em condições semipreparativas, por meio da fração de MetOH 100%. Posteriormente, cada pico obtido nesta etapa foi novamente analisado por técnicas de HPLC, utilizando-se, porém, uma coluna analítica e um fotodetector de diodo (PDA). Com este equipamento foi possível se conhecer o espectro de absorção, em uma faixa de comprimento de onda no U.V., da(s) substância(s) referente(s) a cada pico e compará-los com o espectro de absorção (na mesma faixa de comprimento de onda) de uma solução-padrão de microcistina-LR. Desta maneira, três picos do cromatograma da figura 12 apresentaram um espectro de absorção entre 195 e 300nm característico ao da maioria das microcistinas (Lawton *et al.*, 1994). A figura 13 mostra o espectro de absorção da microcistina-LR determinado em um sistema de HPLC-PDA.

A caracterização de cada uma destas microcistinas ainda não pôde ser feita, pois é necessária a purificação de uma maior quantidade de material para que se possam utilizar técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrofotometria de massas (FAB MS/MS). É normal uma cepa produzir mais de um tipo de microcistina (Carmichael, 1988; Watanabe *et al.*, 1988), sendo a microcistina de maior ocorrência a -LR, exceto no Japão, onde a mais comum é a microcistina-RR (Park e Watanabe, 1996).

Em alguns cromatogramas, dois picos menores (Figura 12) tiveram espectros de absorção iguais aos das microcistinas. Entretanto, não puderam ser confirmados como sendo pertencentes a este grupo de toxinas, porque em outros cromatogramas os seus espectros de

absorção tinham um padrão diferente do espectro de absorção das microcistinas. Por se tratarem de picos pequenos e como a área de cada pico está relacionada diretamente com a concentração da substância, provavelmente pela baixa concentração de microcistina nestas amostras, elas não puderam ser analisadas com precisão pelos equipamentos utilizados. Para o esclarecimento destas dúvidas, teremos que fazer uma nova extração de microcistinas, partindo de uma biomassa maior.

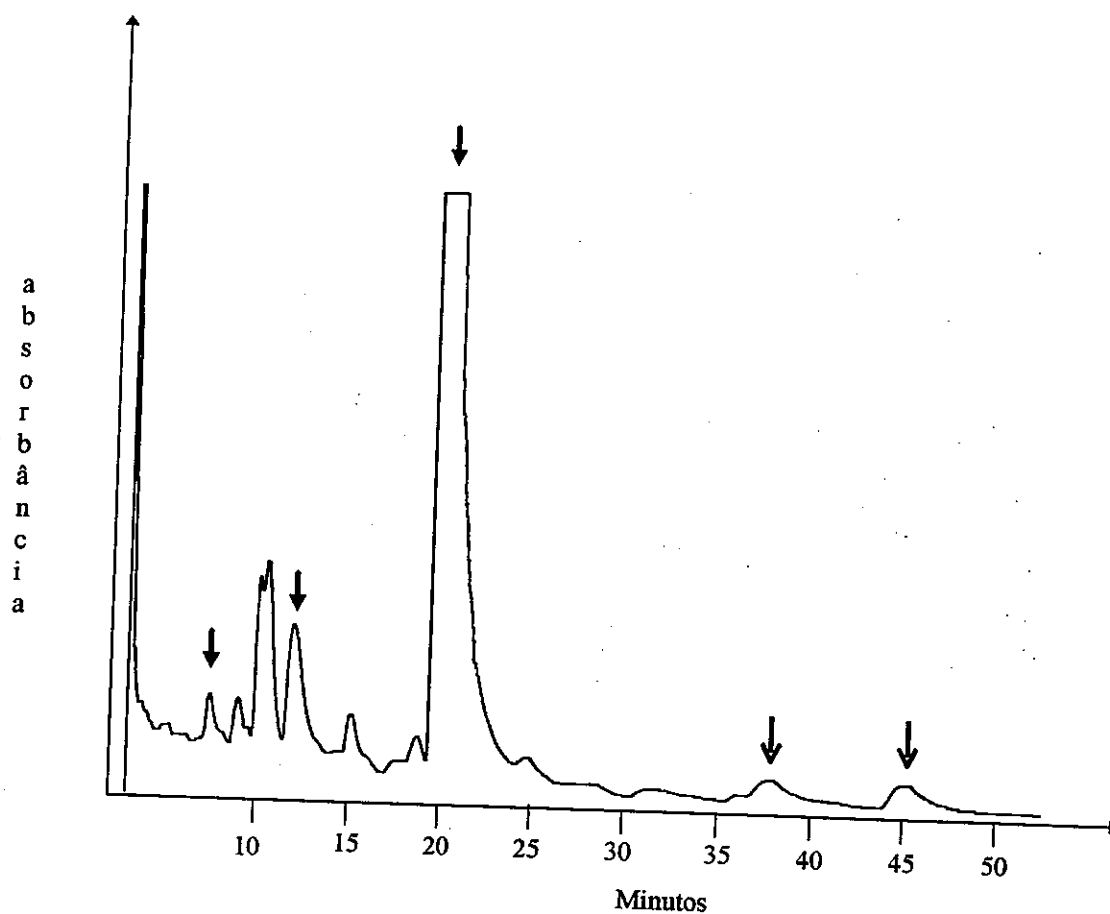


Figura 12 - Cromatograma da fração MetOH 100% da cepa NPLJ-4, obtido em coluna semi-preparativa, por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Condição isocrática; fase móvel acetonitrila : acetato de amônio 20mM pH 5,0 (28:72, v/v); coluna C<sub>18</sub> (5µm) 250mm x 10mm; fluxo de 3mL.min<sup>-1</sup> e comprimento de onda de 238nm. (→) Indica os picos cujos espectros de absorção foram iguais aos das microcistinas e (↔) indica os picos que, provavelmente, são microcistinas, mas em virtude das baixas concentrações não puderam ser confirmados.

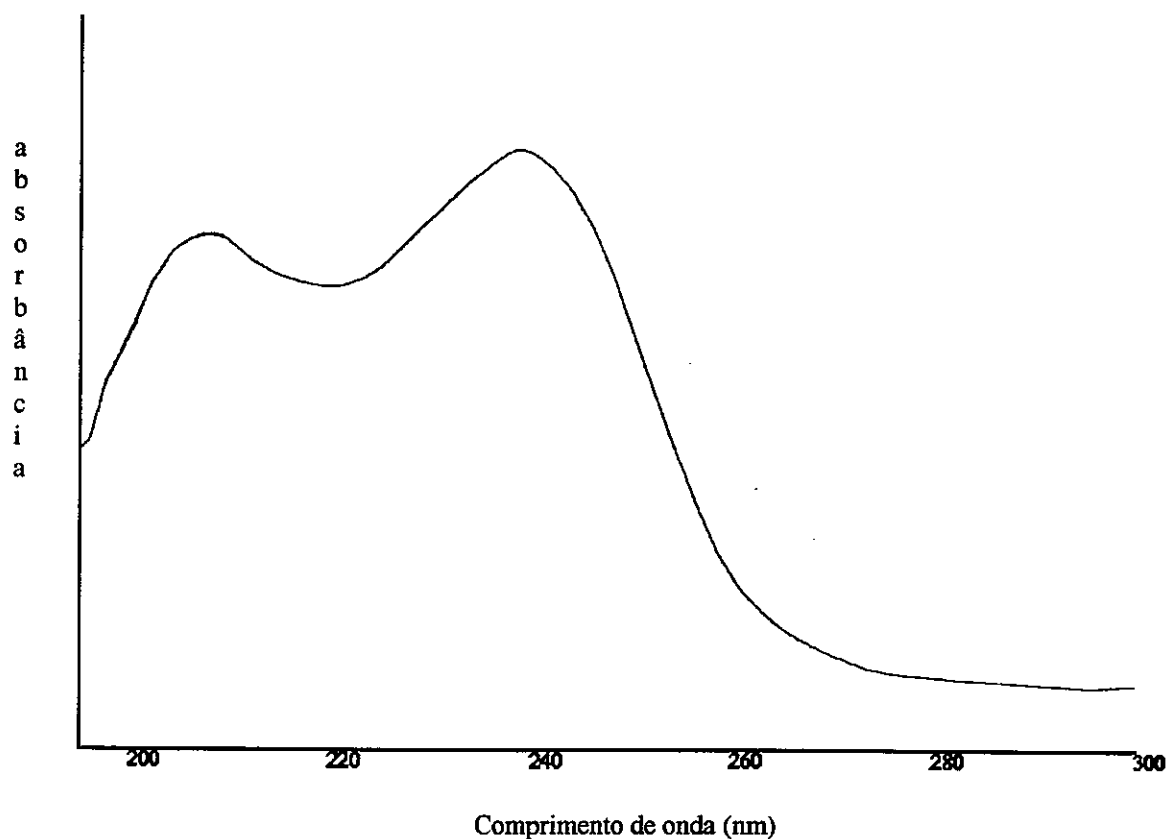


Figura 13 - Espectro de absorção entre 195 e 300nm, típico da maioria das microcistinas. Determinado em um sistema HPLC-PDA (Lawton *et al.*, 1994).

O anticorpo para microcistina utilizado neste estudo não tinha a mesma reatividade para todas as variantes deste grupo de hepatotoxinas. A sua sensibilidade de detecção é maior para as microcistinas que possuem a arginina como pelo menos um dos dois L aminoácidos (Chu *et al.*, 1989). Como os cromatogramas indicaram a presença de pelo menos três microcistinas diferentes, e por não conhecermos a identidade de cada uma, a quantificação desta toxina pelo método de ELISA pode estar subestimada.

A figura 12, entretanto, mostra que a síntese entre as variantes não é proporcional. O pico tóxico com tempo de retenção de aproximadamente 23 minutos é muito maior que os outros dois (9 e 14 minutos). A quantificação pela técnica de imunoensaio mostrou níveis elevados desta toxina (Figura 14a e 14b). Assim, acreditamos que a microcistina referente ao maior pico deve ter a arginina, pelo menos como um de seus dois L aminoácidos, e, se houve

uma subestimação destes resultados, ela foi mínima já que a síntese das outras duas microcistinas proporcionalmente é muito menor.

Watanabe e Oishi (1985), trabalhando com a cepa M228 de *M. aeruginosa*, observaram um aumento de 4 vezes na toxidez quando a irradiância foi alterada de 7,53, para 30,1 ou 75,3  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ . A toxidez foi determinada pela  $DL_{50}$  através de bioensaios em camundongos. Resultados semelhantes com *M. aeruginosa* também foram obtidos por Westhuizen e Eloff (1985), que trabalharam com intensidades luminosas entre 21 e 215  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  e Codd e Poon, (1988) que testaram entre 5 e 50  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ . Em um trabalho mais recente, em que *M. aeruginosa* foi cultivada em sistema de cultura contínua, Utkilen e Gjølme (1995) propõem que sob irradiâncias maiores a síntese de microcistinas aumentaria em resposta a uma maior absorção de  $Fe^{2+}$  pelas células. Para esses autores, estas toxinas funcionariam como quelantes internos dos átomos de Fe. Sob altas irradiâncias, então, elas evitariam um efeito tóxico deste elemento para as próprias células. A maior intensidade luminosa utilizada nesse estudo foi de 75  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ .

Os nossos resultados mostraram que a síntese de microcistinas apresentou uma relação inversa com a intensidade luminosa. As culturas que foram submetidas à mudança da irradiância de 40 para 180  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  também tiveram os conteúdos intracelulares de microcistinas reduzidos. Este padrão foi observado tanto no experimento I como no II (Figuras 14a e 14b). Intensidades luminosas mais elevadas também causaram a redução da síntese de microcistina em duas espécies de *Oscillatoria* (Sivonen, 1990), em que as maiores concentrações foram observadas sob 12 e 24  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ , enquanto que as menores, em intensidades acima de 50  $\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ .

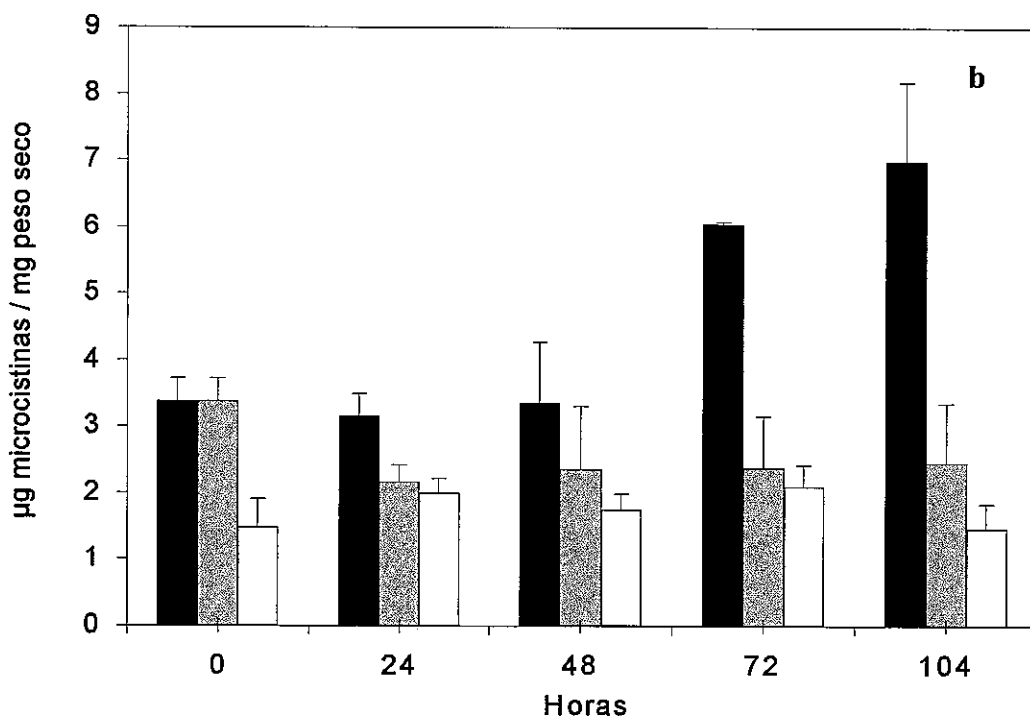
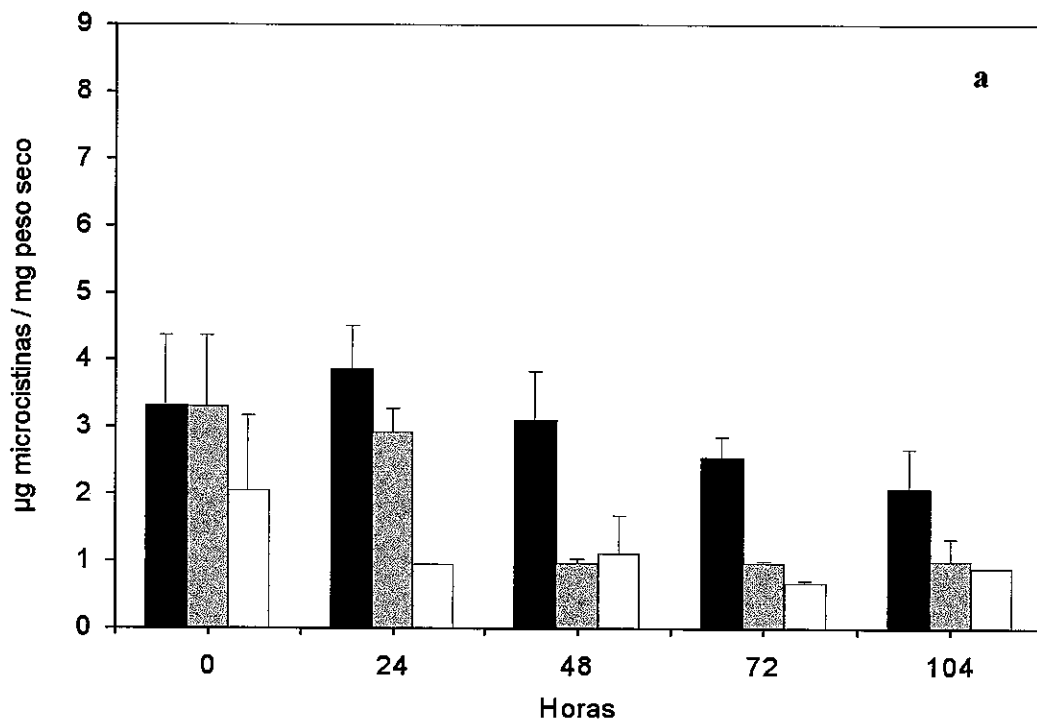


Figura 14 - Efeito das diferentes intensidades luminosas e tempos de cultivo no conteúdo de microcistinas na cepa NPLJ-4. (a) Experimento I (b) Experimento II. (■) Culturas crescidas sob 40µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, (▨) submetidas à alteração de 40 para 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e (□) crescidas sob 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. No gráfico (a) o tempo zero representa o 13<sup>o</sup> dia de cultivo para as culturas sob 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e o 15<sup>o</sup> dia para as culturas sob 40µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e submetidas à alteração da irradiância de 40 para 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. No gráfico (b) o tempo zero representa o 5<sup>o</sup> dia de cultivo para as culturas sob 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e o 7<sup>o</sup> dia para as culturas sob 40µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e submetidas à alteração de 40 para 180µmoles fótons .m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

A diferença entre os nossos resultados e aqueles obtidos por Watanabe e Oishi (1985), Westhuizen e Eloff (1985), Cood e Poon (1988) e Utkilen e Gjølme (1995) se deve provavelmente às diferentes metodologias empregadas na quantificação de microcistinas e/ou condições de cultivo.

A variação observada na concentração de microcistinas entre o experimento I e II pode ser explicada pela diferença da idade do cultivo. Já se sabe que a síntese de microcistinas é mais intensa no final da fase logarítmica ou entre esta fase e a fase estacionária, diminuindo rapidamente com o início desta última (Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe *et al.*, 1989). Além disso, a sua concentração no meio de cultivo também aumenta com o avanço da fase estacionária, não estando claro se é por causa de uma lise celular ou de um processo de excreção (Sivonen, 1990), apesar de já existirem evidências de que esta toxina possa ser excretada por células intactas de *M. aeruginosa* (Shi, *et al.*, 1995). Portanto, a redução do conteúdo de microcistinas em todos os regimes de irradiância no experimento I deveu-se à entrada das células na fase estacionária de crescimento. Os resultados do crescimento celular e da produção de carboidratos também indicam a entrada das células nesta fase (Figuras 5a e 7a). Mesmo assim, pode-se observar que os níveis de microcistinas foram sempre menores nas culturas que se desenvolveram sob  $180\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e reduziram rapidamente a partir da alteração da intensidade luminosa (Figura 14a).

Essa redução da razão microcistinas/peso seco em células que se desenvolveram sob uma maior irradiância se deveria a uma maior síntese de carboidratos, o que levaria a um aumento do peso seco (Utkilen e Gjølme, 1992). Estes autores, trabalhando com *M. aeruginosa* CYA 228/1 em sistema de cultura contínua, observaram que acima de  $40\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a razão microcistina/peso seco diminuía e, quando os valores de microcistinas eram normalizados pela proteína total, eles se mantinham constantes. Nesse trabalho, entretanto, a produção de carboidratos não foi estimada e a maior intensidade luminosa utilizada foi de  $75\mu\text{moles f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

A concentração de carboidratos aumentou no final do cultivo, em todos os regimes de irradiância no experimento I (Figura 7a). Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por Utkilen e Gjølme (1992). Já as curvas de crescimento e mesmo os níveis de carboidratos, indicam, que estas culturas estavam em fase estacionária. Ou seja, a redução dos níveis de microcistinas pelo aumento do peso seco poderia estar ocorrendo não por uma ação



direta do aumento da irradiância, mas por uma característica fisiológica das células durante esta fase de crescimento, que é o acúmulo de carboidratos. Além disso, como já mencionado, há um decaimento da concentração intracelular desta toxina a partir do início da fase estacionária (Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe *et al.*, 1989).

Para podermos trabalhar com as células em crescimento exponencial, e assim evitarmos interferências da fase estacionária, um segundo experimento foi realizado. Neste, a alteração da intensidade luminosa foi feita a partir do final da fase logarítmica (experimento II).

Conforme mencionado, a concentração de microcistinas teve uma relação inversa com a intensidade luminosa (Figura 14b). A maior concentração intracelular de microcistinas foi observada nas culturas que se desenvolveram sob  $40\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  e ela aumentou até o último dia de amostragem, correspondendo, pela análise da curva de crescimento, ao período de desaceleração da divisão celular. Como no experimento anterior, nas culturas submetidas à mudança da irradiância, houve uma redução dos níveis de microcistinas, e 24 horas após a alteração, eles eram praticamente iguais aos das culturas que se desenvolveram sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  (Figura 14b).

Entretanto, este experimento mostrou que a redução da razão microcistinas/peso seco não é consequência de um maior síntese de carboidratos. Primeiro, porque apesar do aumento dos níveis de carboidratos nas culturas sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  e naquelas submetidas a mudança da irradiância, estes não seriam suficientes para aumentar significativamente o peso seco celular (Figura 7b). Pela análise dos resultados da produção de biomassa  $.10^6$  células (Figura 15), observa-se que não houve um aumento do peso seco celular nas culturas sob a maior intensidade e nem nas que tiveram o regime de irradiância modificado, de modo que pudesse justificar a diminuição da razão de microcistinas/peso seco. Pelo contrário, as células crescidas sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  apresentaram os menores valores de biomassa (Figura 14b). Provavelmente, porque as células que se desenvolveram nesta condição devem ter sofrido uma redução do tamanho celular, como consequência de uma maior velocidade específica de crescimento (Figura 5b, Tabela VI).

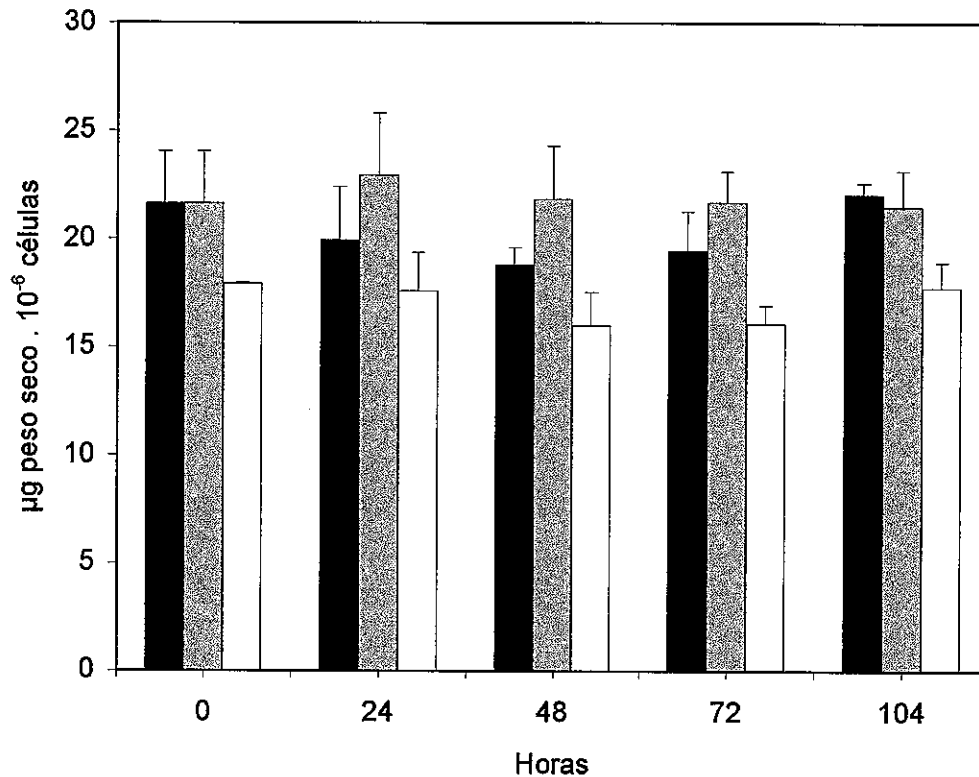


Figura 15 - Efeito das diferentes intensidades luminosas na produção de biomassa na cepa NPLJ-4. Experimento II. (■) 40  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , (▨) de 40 para 180  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e (□) 180  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . O tempo zero representa o 5<sup>o</sup> dia de cultivo para as culturas sob 180  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e o 7<sup>o</sup> dia, para as culturas sob 40  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e submetidas à alteração de 40 para 180  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Harris (1986) relata que células do fitoplâncton com maiores velocidades específicas de crescimento tendem a ter um volume celular menor. Cultivos de *M. aeruginosa* realizados sob diferentes irradiâncias (entre 4,5 e 40  $\mu\text{moles fótons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) mostraram que as células que apresentaram o maior volume celular, foram as que se desenvolveram sob as maiores intensidades luminosas (Krüger *et al.*, 1981). Mas, as células cresceram sob condições limitantes de CO<sub>2</sub> (as culturas não eram aeradas). Segundo os autores, o volume celular aumentou em resposta ao um “stress” fisiológico, neste caso, a falta de CO<sub>2</sub>. Sob as maiores irradiâncias, o consumo deste gás é mais rápido, daí os maiores tamanhos terem sido observados nessa condição. Portanto, em nossos experimentos as células que cresceram sob

180  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  podem ter apresentado uma redu\c7\~ao do volume celular, pois foi nesta condi\c7\~ao que foram observadas as maiores velocidades espec\^ificas de crescimento.

Um dos motivos para que a altera\c7\~ao da densidade de fluxo de f\^otons de 40 para 180  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  n\~ao tenha provocado uma redu\c7\~ao dos valores de biomassa, pode ter sido o pouco tempo de exposi\c7\~ao a nova irradi\~ancia. Apesar de muito pr\^oximos, contudo, podemos notar uma pequena tend\^encia de queda dos valores de biomassa.  $10^6$  c\^elulas, depois de um pequeno aumento nas primeiras 24 horas, o que poderia ser resultante de uma redu\c7\~ao do tamanho das c\^elulas (Figura 15), j\~a que ocorreu um aumento na velocidade de divis\~ao celular.

De nosso conhecimento, este \^e o primeiro trabalho que acompanhou a produ\c7\~ao de clorofila em uma cepa produtora de microcistina, em condi\c7\~oes de cultivo. Outros trabalhos quantificaram a produ\c7\~ao de clorofila durante flora\c7\~oes t\^oxicas de *Microcystis. aeruginosa* (Wicks and Thiel, 1990; Kotak *et al.*, 1995; Park e Watanabe, 1996) e *Oscillatoria agardhii* (Lindholm e Meriluoto, 1991), mas todos foram feitos em ambientes naturais.

Gra\c7\~as \^as unidades que foram utilizadas para expressar a concentra\c7\~ao de clorofila, os resultados obtidos nesses trabalhos n\~ao podem ser comparados com os nossos. Por se tratar de trabalhos em ambientes naturais, as unidades utilizadas foram  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ou  $\text{mg.m}^{-3}$ . Desta forma, n\~ao se pode ter a real no\c7\~ao de como os n\^iveis de clorofila variaram por c\^elula. No nosso caso, todos os resultados est\~ao normalizados pelo n\^umero de c\^elulas, exceto o da microcistina que est\~a em  $\mu\text{g/peso seco}$ .

Os nossos resultados mostraram uma rela\c7\~ao direta entre a s\^intese de clorofila e a de microcistinas. Por\^em, em outros estudos, foi mostrado que em intensidades luminosas inferiores a 30  $\mu\text{moles f\^otons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a s\^intese de microcistinas diminuiu (Watanabe e Oishi, 1985; Westhuizen e Eloff, 1985; Utiklen e Gj\^orme, 1992) e nessas condi\c7\~oes, provavelmente a concentra\c7\~ao de clorofila deve ter aumentado. Para sabermos, ent\~ao, at\^e que faixas de irradi\~ancias a rela\c7\~ao por n\^os encontrada iria se manter, um estudo mais amplo deveria ser feito. Assim, poderemos tentar estabelecer uma correla\c7\~ao mais precisa entre a concentra\c7\~ao de clorofila e a de microcistinas.

Os resultados obtidos por Foy e Smith (1980) e Rijn e Shilo (1986) mostraram que o ac\^umulo de carboidratos sintetizados durante o per\^odo de luz \^e capaz de manter a s\^intese de

proteínas e outros compostos nitrogenados durante o período de escuro. No experimento II, a energia acumulada em razão de uma maior quantidade de carboidratos produzidos pelas células que cresceram ou tiveram a irradiância alterada para  $180 \mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .s^{-1}$ , caso tenha sido utilizada em alguma etapa do metabolismo, não foi desviada para a síntese de microcistinas, já que nestas condições ocorreram as menores concentrações desta toxina.

#### **4.3 - HIPÓTESES LEVANTADAS QUE PODERIAM EXPLICAR A REDUÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE MICROCISTINAS EM CÉLULAS SUBMETIDAS A UMA ALTA INTENSIDADE LUMINOSA**

A síntese de alguns peptídeos cíclicos, por exemplo, bacitracina e gramicidina, produzidos por algumas bactérias e fungos é feita por um complexo enzimático (peptídeo sintetase) sem que haja participação de ribossomas e RNAm (Katz e Demain, 1977; Kleinkauf e Dohren, 1990). Em virtude de algumas similaridades estruturais entre as microcistinas e estes peptídeos, acredita-se que a síntese destas toxinas ocorra de modo semelhante. Na verdade, já existem indicações de que este complexo enzimático ocorra também em cianofíceas (Rouhiainen *et al.*, 1995; Arment e Carmichael, 1996). Os nossos resultados mostram uma redução dos níveis de proteínas totais  $.10^{-6}$  células nas culturas que cresceram e nas que foram expostas a  $180 \mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2} .s^{-1}$  nos experimentos I e II (Figuras 8a e 8b). Se o aumento da luz induziu a uma redução da síntese de proteínas, pode ter ocorrido também uma diminuição na concentração das proteínas que formam o complexo enzimático responsável pela produção de microcistinas, levando a uma diminuição da biosíntese destas moléculas. Entretanto, esta redução dos níveis de proteínas pode estar apenas mostrando uma diminuição da síntese de ficobiliproteínas, em resposta ao aumento da luz.

Uma outra hipótese, para explicar a diminuição da concentração de microcistinas sob maiores irradiâncias, seria uma maior taxa excreção destas toxinas, que, segundo Sivonen (1990), é estimulada sob altas irradiâncias e temperaturas. Já se sabe que há liberação de toxinas quando ocorre lise celular, mas não achamos que isto tenha ocorrido de uma maneira significativa em nossos experimentos, por causa das velocidades específicas de crescimento observadas nas duas condições sob maior irradiância (Tabela VI).

O motivo que levaria a uma diminuição da síntese de microcistinas sob intensidades luminosas maiores, poderia estar relacionado a uma nova estratégia de crescimento, em que a síntese destas hepatotoxinas não seria mais necessária. Os nossos resultados mostraram que as células que passaram a ter uma menor concentração intracelular de microcistinas, foram as que apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento, e as que aumentaram a velocidade de divisão celular após serem submetidas a alteração da irradiância. Ou seja, a partir do momento em que as condições de crescimento se tornaram mais propícias, não houve mais a necessidade de manutenção de uma alta síntese de microcistinas. Conseqüentemente, a maior parte da energia foi desviada para a divisão celular. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores, que mostraram não serem as condições ideais para o crescimento as mesmas para a síntese destas hepatotoxinas (Westhuizen e Eloff, 1985; Aguiar, 1995).

As primeiras argumentações a respeito do porquê da síntese das cianotoxinas (neuro e hepatotoxinas) sugeriram que elas teriam a função de inibir o processo de herbivoria pelo zooplâncton. Alguns autores indicaram que as microcistinas têm efeitos nocivos contra algumas espécies desse grupo de organismos (DeMott *et al.*, 1991). Ou seja, em condições limitantes de crescimento as células produziriam mais toxinas evitando assim a herbivoria, mas a partir do momento em que as condições se tornassem propícias, seria mais interessante investir na divisão celular do que na síntese de moléculas complexas, como é o caso das microcistinas e nodularinas. Altas concentrações de *M. aeruginosa* podem reduzir a taxa de filtração de algumas espécies de zooplâncton (Fulton e Paerl, 1987; Fulton e Paerl, 1988). Entretanto, alguns trabalhos vêm mostrando que as microcistinas não têm uma toxicidade tão severa para o zooplâncton quanto para os mamíferos (Nizan *et al.*, 1986; Yasuno e Sugaya, 1991). Jungmann (1992) isolou de *M. aeruginosa* PCC 7806 compostos que são mais tóxicos à *Daphnia* do que as microcistinas.

As culturas que foram submetidas a alteração da irradiância apresentaram uma redução dos valores de  $P_m$  e  $\alpha$  48h após a alteração, o que é característico do processo de fotoinibição. Apesar de não termos realizados experimentos específicos, acreditamos que as células nesta condição foram fotoinibidas. Mesmo assim, a fotoinibição não teria sido a única responsável pela queda da síntese de microcistinas, pois nas curvas de luz-fotossíntese feitas 96h após a mudança, houve um aumento de  $P_m$  e  $\alpha$ , mas a concentração de microcistinas permaneceu

estável. Além disso, nas culturas que se desenvolveram sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ , a síntese de microcistinas também foi baixa.

Observando a tabela VII, podemos notar que à medida que o valor de  $P_m$  aumenta, caso das culturas que se desenvolveram ou foram submetidas a alteração da irradiância para  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ , a concentração de microcistinas diminui (Figura 14b), e o contrário ocorre com as culturas sob  $40\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ , à proporção que  $P_m$  diminui, os níveis de microcistinas aumentam.

A capacidade de aumentar a taxa de atividade fotossintética máxima ( $P_m$ ) está diretamente relacionada com a eficiência de obtenção de  $\text{CO}_2$ , quer pelas reações enzimáticas do Ciclo de Calvin, quer pelos processos de difusão e transporte deste elemento composto (Henley, 1993). Desta maneira, a redução dos níveis de microcistinas nas culturas sob a irradiância de  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  poderia estar ocorrendo por uma menor quantidade de energia, que passaria a estar disponível para a síntese das enzimas que formam o complexo responsável pela produção de microcistinas. Neste caso, a síntese proteica poderia estar sendo direcionada para o aumento das enzimas envolvidas no Ciclo de Calvin, para aumentar a eficiência de obtenção do dióxido de carbono. Por sua vez, células crescendo sob intensidades luminosas menores, não sofreriam estas restrições.

Tirocidina e gramicidina são produzidas durante a fase estacionária de algumas bactérias e fungos e agem como iniciadores da esporulação e de outros eventos característicos desta fase de crescimento (Kleinkauf e Dohren, 1990; Arment e Carmichael, 1996). Em contraste, microcistina é produzida continuamente, porém as maiores concentrações são observadas a partir do final da fase exponencial de crescimento, ou entre esta e a fase estacionária de crescimento. Os nossos resultados mostraram que, quando as células foram submetidas à alteração da intensidade luminosa, houve um aumento da velocidade de crescimento celular, o que coincidiu com uma diminuição do conteúdo intracelular de microcistinas. Arment e Carmichael (1996) especularam que este grupo de toxinas pode ter alguma função regulatória no metabolismo das células. Assim, achamos que a função a que estes autores se referiram, pode estar relacionada a uma sinalização celular, a partir do momento em que ocorre uma diminuição da velocidade específica de crescimento. Estes mesmos autores indicaram que a concentração intracelular de microcistinas aumentava quando

células de *Microcystis aeruginosa*, em fase logarítica, eram incubadas com um bloqueador de síntese proteica. Quando este mesmo tratamento era realizado com células que já haviam atingido a fase estacionária de crescimento, a síntese de microcistina aumentava ainda mais. Esse tratamento inibia o crescimento celular, mas não a síntese de microcistina, pois, conforme comprovado, não há participação de ribossomas e RNA<sub>m</sub> na formação desta molécula. Entretanto, esta hipótese não explica a razão de os níveis de microcistinas em nossos experimentos terem sido sempre menores nas culturas que cresceram sob a maior intensidade luminosa, mesmo quando as células atingiram a fase estacionária de crescimento.

#### 4.4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferenças observadas entre os nossos resultados e os obtidos por outros autores, que também estudaram os efeitos da intensidade luminosa na síntese de microcistinas, devem-se às diferentes condições de cultivo e metodologias para quantificação destas hepatotoxinas, e principalmente ao conceito aplicado por esses autores para classificar o que é uma alta ou baixa irradiância. No nosso trabalho, a maior irradiância utilizada foi  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ , enquanto no trabalho de Utkilen e Gjølme (1992),  $75\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  foi a maior intensidade luminosa. Estas diferenças geram conflitos na comparação dos resultados. Por exemplo, neste estudo, sob a maior intensidade luminosa, a síntese de microcistinas diminuiu, enquanto que Utkilen e Gjølme, (1992) concluíram que o aumento da intensidade luminosa favoreceu a síntese de microcistinas. Cood e Poon (1988) reportam que o aumento da irradiância não influenciou na síntese de microcistinas, porém a maior intensidade luminosa utilizada por estes autores foi de  $50\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ .

Os nossos resultados evidenciaram que a luz tem um importante papel no controle da síntese de microcistinas em *Microcystis aeruginosa* cepa NPLJ-4. Entretanto, os nossos experimentos não nos permitem dizer se este controle é feito diretamente sobre o complexo enzimático responsável pela síntese de microcistinas, ou se ele ocorre em resposta a uma alteração na velocidade específica de crescimento das células. Por isso, acreditamos que outros estudos, em que sejam pesquisados um maior espectro de intensidades luminosas, outras cepas e/ou espécies hepatotóxicas de cianofíceas, além da influência de outros fatores físicos ou

químicos, serão muito importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e/ou moleculares que controlam a síntese destas hepatotoxinas e a sua relação com o crescimento e com os parâmetros fisiológicos celulares. Ademais, experimentos em ambiente natural também serão necessários para sabermos se as respostas obtidas em condições de cultivo irão se repetir na natureza. Estes conhecimentos serão de extrema importância para uma aplicação direta, não só em termobiotecnológicos, mas principalmente de saúde pública.



## 5 - CONCLUSÕES

1 - A alteração da irradiância de 40 para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  n\u00e3o induziu a s\u00edntese de microcistinas na cepa de *M. aeruginosa* n\u00e3o-produtora desta toxina (NPCD-1);

2 - As maiores velocidades espec\u00edficas de crescimento da cepa NPLJ-4 foram observadas nas culturas sob a maior intensidade luminosa e a altera\u00e7\u00e3o da irradi\u00e2ncia de 40 para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  proporcionou um aumento da velocidade de divis\u00e3o celular, principalmente quando esta foi realizada no final da fase exponencial de crescimento, o que indica estarem as c\u00e9lulas crescendo sob condi\u00e7\u00f5es limitantes de luz;

3 - A s\u00edntese de clorofila na cepa NPLJ-4 foi maior nas culturas sob a menor intensidade luminosa e vice-versa, e o aumento de 40 para 180  $\mu\text{moles f\u00f3tons .m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fez com que os n\u00edveis de clorofila deca\u00edssem. Al\u00e9m disso, a s\u00edntese deste pigmento foi maior durante o per\u00edodo de luz.;

4 - As culturas que cresceram sob a menor intensidade luminosa apresentaram uma redu\u00e7\u00e3o dos valores do rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo aparente ( $\alpha$ ) ao longo do experimento, provavelmente em resposta a um auto-sombreamento das mol\u00e9culas de clorofila ou por uma mudan\u00e7a na velocidade da divis\u00e3o celular. As culturas sob a maior intensidade luminosa apresentaram os maiores valores da taxa de atividade fotossint\u00e9tica m\u00e1xima ( $P_m$ );

5 - A cepa NPLJ-4 sintetiza, pelo menos, tr\u00eas tipos diferentes de microcistinas;

6 - A idade do cultivo influencia na concentra\u00e7\u00e3o de microcistinas, e o conte\u00fado intracelular desta toxina foi maior no per\u00edodo entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacion\u00e1ria (fase de desacelera\u00e7\u00e3o da divis\u00e3o celular), diminuindo ao longo da fase estacion\u00e1ria;

7 - As condições mais propícias para o crescimento celular, medido pela velocidade específica de crescimento, não coincidiram com as condições propícias para a síntese de microcistinas;

8 - A redução da razão microcistina/peso seco nas culturas que estavam no final da fase exponencial, crescidas ou submetidas à irradiância de  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$ , não ocorreu por um aumento do peso seco celular, pois nas culturas que se desenvolveram sob  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  os valores de biomassa por  $10^6$  células foram os menores e nas submetidas à alteração da irradiância, não houve um aumento dos valores deste parâmetro;

9 - A luz tem um importante papel no controle da síntese de microcistinas. A mudança de 40 para  $180\mu\text{moles f\acute{o}tons .m}^{-2}.s^{-1}$  provocou a redução dos níveis de microcistinas nos dois experimentos realizados, e as maiores concentrações intracelulares destas hepatotoxinas ocorreram nas culturas que se desenvolveram sob a menor irradiância e vice-versa.

## 6 - BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J.D. (1989). Molecular biology of the cell, 2<sup>nd</sup> ed. Garland Publishing Inc., New York: 1-1216.
- AGUIAR, D.G. (1995). Efeitos de diferentes concentrações de nutrientes no crescimento e produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenkin (Cyanophyceae), em condições de cultivo. Tese de mestrado, Programa de Biotecnologia Vegetal, UFRJ, p. 74.
- ANDERSON, D.M. (1994). Red tides. Scientific American. 270(8): 52:58.
- ANNADOTTER, H., CRONBERG, G., LAWTON, L.A. AND HANSSON, H-B. (1995). An outbreak of gastro-enteritis associated with consumption of cyanobacteria. First International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). Rønne, Denmark.
- ARMENT, A.R. AND CARMICHAEL, W.W. (1996). Evidence that microcystin is a thio-template product. J. Phycol 32: 591-597.
- AZEVEDO, S.M.F.O., EVANS, W.R., CARMICHAEL, W.W. AND NAMIKOSHI, M. (1994). First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. Appl. Phycol. 6: 261-265.
- BALODE, M. AND PURINA, I. (1995). The occurrence of toxic cyanobacteria in the Gulf of Riga. First International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). 20-24 August 1995, Rønne, Denmark.
- BEASLEY, V.R., COOK, W.O., DAHLEM, A.M., HOOSER, S.B., LOVELL, R.A. AND VALENTINE, W.M. (1989). Algae intoxication in livestock and waterfowl. Veter. Clinics N. Amer.: Food Anim. Prac. 5(2): 345-361.
- BEYRUTH, Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; CARVALHO, M.C. AND PEREIRA, H.A.S.L. (1992). Toxic algae in freshwater of São Paulo. In: Algae and Environment: A General Approach. Cordeiro-Marino, M.; Azevedo, M.T.P.; Sant'anna, C.L.; Tomita, N.Y. and Plastino, E.M. (eds). Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo: 53-64 p.
- BISHOP, C.T., ANET, E.F.L.J. AND GORHAM, P.R. (1959). Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 453-471.
- BLACKBURN, S.I. AND JONES, G.J. (1995). A toxic bloom of *Nodularia spumigena* in Orielson lagoon, Tasmania, Australia. First International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). 20-24 August 1995, Rønne, Denmark.

- BOBEDA, C.R.R. (1993). Isolamento, purificação e caracterização de microcystinas (hepatapeptídeos cíclicos) encontradas em uma floração de cianobactérias ocorrida no reservatório do Funil (resende, RJ). Tese de Mestrado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ.
- BOLD, H.C. AND WYNNE, M.J. (1985). Introduction to the algae, 2<sup>nd</sup> ed. Prentice-Hall, Inc., London: 720p.
- BOTES, D.P., KRUGER, H. AND VILJOEN, C.C. (1982a). Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. **20**(6): 945-954.
- BOTES, D.P., VILJOEN, C.C., KRUGER, H., WESSELS, P.L. AND WILLIAMS, D.H. (1982b). Configuration assignments of the amino acids residues and the presence of *N*-methyldehydroalanine in toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. **20**(6): 1037-1042.
- BOTHE, H. (1982). Nitrogen fixation. In: The biology of cyanobacteria, Carr, N.G., Whitton, B.A. (eds). Botanical Monographs, Vol. 19, Blackwell Scientific Publications, London, 87-104p.
- BOUSSIBA, S. AND RICHMOND, A.E. (1980). C-phycoyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol. **125**: 143-147.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- CARMELI, S., MOORE, R.E. AND PATTERSON, G.M.L. (1990). Tantazoles: Unusual cytotoxic alkaloids from the blue-green alga *Scytonema mirabile*. J. Am. Chem. Soc. **112**: 8195-8197.
- CARMICHAEL, W.W. (1988). Toxins of freshwater algae. In: Tu, A.T. (ed), Handbook of Natural Toxins. Marcell Dekker, New York, 121-147p.
- CARMICHAEL, W.W. (1992a). A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati. 141p.
- CARMICHAEL, W.W. (1992b). Cyanobacteria secondary metabolism: the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. **72**: 445-459.
- CARMICHAEL W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. Scientific American **270**(1): 64-72.

- CARMICHAEL, W.W., BEASLEY, V., BUNNER, D.L., ELOFF, J.N., FALCONER, I.R., GORHAM, P., HARADA, K.-I., KRISHNAMURTHY, T., JUAN, Y.M., MOORE, R.E., RINEHART, K., RUNNEGAR, M., SKULBERG, O.M. AND WATANABE, M. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon 26(11): 971-973.
- CARMICHAEL, W.W., MAHMOOD, N.A. AND HYDE, E.G. (1990). Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Marine toxins: Origin, structure, and molecular pharmacology, Hall, S. and Strichartz, G. (eds), American Chemical Society, Washington, 87-106pp.
- CHU, F.S., HUANG, X. AND WEI, R.D. (1989). Production and characterization of antibodies against microcystin. Appl. Environ. Microbiol. 55(8): 1928-1933.
- CHU, F.S., HUANG, X. AND WEI, R.D. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. Assoc. Anal. Chem. 73(3): 451-456.
- CLAEYSSENS, S., FRANCOIS, A., CHEDEVILLE, A. AND LAVOINNE, A. (1995). Microcystin-LR induced an inhibition of protein synthesis in isolated rat hepatocytes. Biochem. J. 306: 693-696.
- CLARKE, A.K., CAMPBELL, D., GUSTAFSSON, P. AND ÖQUIST, G. (1995). Dynamic responses of photosystem II and phycobilisomes to changing light in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. Planta. 197: 553-562.
- COHEN, S.G. AND REIF, C.B. (1953). Cutaneous sensitization to blue-green algae. J. Allergy. 24: 452-457.
- COHEN, Z (1986). Products from microalgae. In: Handbook of Microalgal Mass Culture, Richmond, A. (ed), CRC Press Inc., 421-454pp.
- CODD, G.A. AND POON, G.K. (1988). Cyanobacterial toxins. In: Biochemistry of the algae and cyanobacteria. Rogers, L.J. and Gallon, J.R. (eds.), Proc. Phytochem. Soc. Europe, Vol 28, Oxford University Press, Oxford, 283-296.
- COSTA, S.M. E AZEVEDO, S.M.F.O. (1994). Implantação de um banco de cultivos de cianofíceas tóxicas. Iheringia. 45: 69-74.
- DELANEY, J.M. AND WILKINS, R.M. (1995). Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. Toxicon. 33(6): 771-778.
- DEMOTT, R.W.; ZHANG, Q. AND CARMICHAEL, W.W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. Limnol. Oceanogr. 36: 1346-1357.

- DEVLIN, J.P., EDWARDS, O.E., GORHAM, P.R., HUNTER, N.R., PIKE, R.K. AND STAVRIC, B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. Can. J. Chem. 55: 13671371.
- DUBOIS, M, GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. AND SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28(3): 350-356.
- ERIKSSON, J.E., GRÖNBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J.P. AND MERILUOTO, J.A.O. (1990). Hepatocellular uptake of  $^3\text{H}$ -dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. Bioch. Biophys. Acta. 1025: 60-66.
- ERIKSSON, J.E., MERILUOTO, J.A.O., KUJARI, H.P., ÖSTERLUND, K., FAGERLUND, K. AND HÄLLBOM, L. (1988). Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Toxicon. 26(2): 161-166.
- ESTEVEZ, F.A. (1988). Fundamentos de Limnologia. Ed. Interciência / FINEP, Rio de Janeiro, 575 p.
- FALCONER, I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Environ. Toxicol. Water Qual.: Inter. J. 6: 177-184.
- FALCONER, I.R., BURCH, M.D., STEFFENSEN, D.A., CHOICE, M. AND COVERDALE, O.R. (1994). Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. Environ. Toxicol. Water Qual.: Inter. J. 9: 131-139.
- FALCONER, I.R. DORNBUSCH, M., MORAN, G. AND YEUNG, S.K. (1992). Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. Toxicon. 30(7): 790-793.
- FALCONER, I.R. AND YEUNG, D.S.K. (1992). Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorilation of cell proteins. Chem. Biol. Inter. 81: 181-196.
- FOOG, G.E. AND THAKE (1987). Algae cultures and phytoplankton ecology, 3<sup>rd</sup> edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London. 269p.
- FOY, R.H. AND GIBSON, C.E. (1982a). Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: The response of twenty strains grown under high and low light. Br. Phycol. J. 17: 169-182.

- FOY, R.H. AND GIBSON, C.E. (1982b). Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: Changes in photosynthetic capacity and pigmentation of *Oscillatoria redekei* Van Goor under high and low light. Br. Phycol. J. 17: 183-193.
- FOY, R.H. AND SMITH, R.V. (1980). The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. Br. Phycol. J. 15: 139-150.
- FUJIKI, H (1992). Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? Mol. Carcino. 5: 91-94.
- FULTON, R.S., III AND PAERL, H.W. (1987). Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. J. Plank. Res. 9(5): 837-855.
- FULTON, R.S., III AND PAERL, H.W. (1988). Effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on zooplankton competitive relations. Oecologia 76: 383-389.
- GIBSON, C.E. AND SMITH, R.V. (1982). Freshwater plankton. In: The biology of cyanobacteria, Carr, N.G., Whitton, B.A. (eds). Botanical Monographs, Vol. 19, Blackwell Scientific Publications, London, 463-490pp.
- GLEASON, F.K. AND WOOD, J.M. (1987). Secondary metabolism in the cyanobacteria. In: The Cyanobacteria, Fay, P. Van Baalen, C. (eds). Elsevier Science Publishers, New York, 437-452pp.
- GOLDBERG, J., HUANG, H., KWON, Y., GREENGARD, P., NALRN, A.C. AND KURLYAN, J. (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. Nature 376 (31): 745-753.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAV, J.R.; HAMMER, V.T. AND KIM, W.K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol., 15: 796-804.
- GROMOV, B.V., VEPRITSKIY, A.A., TITOVA, N.N., MAMKAYEVA, K.A. AND ALEXANDROVA, O.V. (1991). Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium). J. Appl. Phycol. 3: 55-59.
- GUSTAFSON, K.R., CARDELLINA II, J.H., FULLER, R.W., WEISLOW, O.S., KISER, R.F., SNADER, K.M., PATTERSON, G.M.L. AND BOYD, M.R. (1989). AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). J. Natl. Cancer Inst. 81: 1254-1258.
- HARADA, K-I. (1996). Chemistry and detection of microcystins. In: Toxic Microcystis. Watanabe, M.F., Harada, K-I., Carmichael, W.W. and Fujiki, H. (eds.), CRC Press, New York: 103-148.

- HARADA, K.-I., MATSUURA, K., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., OISHI, S., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V.R. AND CARMICHAEL, W.W. (1990). Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). Toxicon **28**(1): 55-64.
- HARADA, K.-I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., WATANABE, M. AND TERAOKA, K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon **32**(1): 73-84.
- HARRIS, G.P. (1986). Phytoplankton ecology - Structure, function and fluctuation. Chapman and Hall, London, 384p.
- HARRISON, P.J. (1988). Adaptation to high and low irradiances measured by photosynthetic rate (<sup>14</sup>C). In: Experimental phycology - A laboratory study. Lobban, C.S., Chapman, D.J. and Kremer, B.D. (eds.). Cambridge University Press, New York, 83-92p.
- HARTZELL, H.C., HIRAYAMA, Y. AND PETIT-JACQUES, J. (1995). Effects of protein phosphatase and kinase inhibitors on the cardiac L-type Ca current suggest two sites are phosphorylated by protein kinase A and another protein kinase. J. Gen. Physiol. **106**: 393-414.
- HEISE, H.A. (1951). Symptoms of hay fever caused by algal. II - *Microcystis*, another form of algae producing allergenic reactions. Ann. Allergy. **9**: 100-101.
- HENLEY, W.J. (1993). Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. J. Phycol. **29**: 729-739.
- HERMANSKY, S.J., WOLFF, S.N. AND STOHS, S.J. (1990). Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity. Pharmacol. **41**: 231-236.
- HONKANEN, R.E., ZWILLER, J., MOORE, R.E., DAILY, S.L., KHATRA, B.S., DUKELOW, M. AND BOYNTON, A.L. (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. J. Biol. Chem. **265**(32): 19401-19404.
- HOOSER, S.B., BEASLEY, V.R., WAITE, L.L., KUHLENSCHMIDT, M.S., CARMICHAEL, W.W. AND HASCHEK, W.M. (1991). Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Vet. Pathol. **28**: 259-266.
- HUGHES, E.O., GORHAM, P.R. AND ZEHNDER, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. Can. J. Microbiol. **4**: 225-236.
- HUMPHRIES, S.E. AND LYNE, V.D. (1988). Cyanophyte blooms: The role of cell buoyancy. Limnol. Oceanogr. **33**(1): 79-91.



- HUMPHRIES, S.E. AND WIDJAJA, F. (1979). A simple method for separating cells of *Microcystis aeruginosa* for counting. Br. Phycol. J. **14**: 313-316.
- IBELINGS, B.W. (1996). Changes in photosynthesis in response to combined irradiance and temperature stress in cyanobacterial surface waterblooms. J. Phycol. **32**: 549-557.
- JOHNSTONE, P. (1994). Cyanobacteria in Australia - an overview. In: Toxic cyanobacteria current status of research and management, Steffensen, D.A. and Nicholson, B.C. (eds.). Proceedings of an international workshop - Adelaide, Australia, march 22-26: 3-14p.
- JONES, G.J., BOURNE, D.G., BLAKELEY, R.L. AND DOELLE, H. (1994). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. Nat. Toxins. **2**: 228-235.
- JONES, G.J., FALCONER, I.R. AND WILKINS, R.M. (1995). Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from lake Mokoan, Australia. Environ. Toxicol. Water Qual.: Inter. J. **10**: 19-24.
- JONES, G.J. AND ORR, P.T. (1994). Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. Wat. Res. **28**(4): 871-876.
- JUNGMANN, D. (1992). Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC 7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. Limnol. Oceanogr. **37**(8): 1777-1783.
- KATZ, E AND DEMAIN, A.L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriol. Rev. **41**(2): 449-474.
- KIVIRANTA, J., SIVONEN, K., LAHTI, K., LUUKKAINEN, R. AND NIEMELÄ, S.I. (1991). Production and biodegradation of cyanobacterial toxins - a laboratory study. Arch. Hydrobiol. **121**(3): 281-294.
- KLEINKAUF, H. AND DOHREN, H. (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. Eur. J. Biochem. **192**: 1-15.
- KLEMER, A.R. (1982). Cyanobacterial blooms: Carbon and nitrogen limitation have opposite effects on the buoyancy of *Oscillatoria*. Science **215**: 1629-1631.
- KNÜBEL, G., LARSEN, L.K., MOORE, R.E., LEVINE, I.A. AND PATTERSON, G.M.L. (1990). Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae. J. Antibio. **XLIII** (10): 1236-1239.
- KOTAK, B.G., LAM, A.K.-Y., PREPAS, E.E., KENEFICK, S.L. AND HRUDEY, S.E. (1995). Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. J. Phycol. **31**: 248-263.

- KRISHNAMURTHY, T., CARMICHAEL, W.W. AND SARVER, E.W. (1986). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. Toxicon. **24**(9): 865-873.
- KROMKAMP, J. (1987). Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. New Zealand J. Mar. Fresh. Res. **21**: 457-465.
- KROMKAMP, J., BOTTERWEG, J. AND MUR, L.R. (1988). Buoyancy regulation in *Microcystis aeruginosa* grown at different temperatures. FEMS Microbiol. Ecol. **53**: 231-237.
- KRÜGER, G.H.F., ELOFF, J.N. AND PRETORIUS, J.A. (1981). Morphological changes in toxic and non-toxic *Microcystis* isolates at different irradiance levels. J. Phycol. **17**: 52-56.
- LAMBERT, T.W., HOLMES, C.F.B., HRUDEY, S.E. (1994). Microcystin class of toxins: Health effects and safety of drinking water supplies. Environ. Rev. **2**: 167-186.
- LAWTON, L.A., EDWARDS, C. AND CODD, G.A. (1994). Extraction and high-performance liquid-chromatographic method for the determination of microcystins in raw waters. Analyst. **119**: 1525-1530.
- LAZCANO, A. AND MILLER, S.L. (1994). How long did it take for life to begin and evolve to cyanobacteria? J. Mol. Evol. **39**: 546-554.
- LEHMANN, H. AND JOST, M. (1971). Kinetics of the assembly of gas vacuoles in the blue green alga *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elek. Arch. Mikrobiol. **79**: 59-68.
- LEHTIMÄKI, J., SIVONEN, K., LUUKKAINEN, R. AND NIEMELA, S.I. (1994). The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia spumigena*. Arch. Hydrobiol. **130**(3): 269-282.
- LIN, J.R. AND CHU, F.S. (1994). *In vitro* neutralization of the inhibitory effect of microcystin-LR to protein phosphatase 2A by antibody against the toxin. Toxicon. **32**(5): 605-613.
- LINDHOLM, T. AND MERILUOTO, J.A.O. (1991). Recurrent death of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **48**: 1629-1633.
- LONG, E.G., WHITE, E.H., CARMICHAEL, W.W., QUINLISK, P.M., RAJA, R., SWISHER, B.L., DAUGHARTY, H. AND COHEN, M. (1991). Morphologic and staining characteristics of a cyanobacterium-like organism associated with diarrhea. J. Infect. Diseases. **164**: 199-202.
- LUKAC, M. AND AEGERTER, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. **31**(3): 293-305.

- MACKINNEY, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**: 315-322.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P. AND CODD, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* **264**: 189-192.
- MAHMOOD, N.A. AND CARMICHAEL, W.W. (1986). The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* **24**(5): 425-434.
- MAHMOOD, N.A. AND CARMICHAEL, W.W. (1987). Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* **25**(11): 1221-1227.
- MATTHIENSEN, A., YUNES, J.S. AND CODD, G.A. (1996). Ocorrência de cianobactérias tóxicas no estuário da lagoa dos Patos. IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambu - MG - Brasil.
- MATSUSHIMA, R.; YOSHIKAWA, S.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.-I.; FURUSAWA, M.; CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. (1990). In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystin and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **171**: 867-874.
- MEREISH, K.A., BUNNER, D.L., RAGLAND, D.R. AND CREASIA, D.A. (1991). Protection against microcystin-LR induced hepatotoxicity by silymarin: Biochemistry, histopathology, and lethality. *Pharmac. Res.* **8**(2): 273-277.
- MOORE, R.E., CHEUK, C., YANG, X.G. AND PATTERSON, G.M.L. (1987). Hepalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte *Hapalosiphon fontinalis*. *J. Org. Chem.* **52**: 1036-1043.
- MOORHEAD, G., MACKINTOSH, R.W., MORRICE, N., GALLAGHER, T. AND MACKINTOSH, C. (1994). Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett.* **356**: 46-50.
- MOORHEAD, G., MACKINTOSH, C., MORRICE, N. AND COHEN, P. (1995). Purification of hepatic glycogen-associated form of protein phosphatase-1 by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett.* **362**: 101-105.
- MURPHY, J., CROMPTON, C.M., HAINEY, S., CODD, G.A. AND HUTCHISON, C.J. (1995). The role of protein phosphorylation in the assembly of a replication competent nucleus: investigations in *Xenopus* egg extracts using the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *J. Cell Science.* **108**: 235-244.

- MYKLESTAD, S. AND HAUG, A. (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (gran) Hustedt. I - Effect of the concentration nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **9**: 125-136.
- NAGATA, S., SOUTOME, H., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A., SEKIJIMA, M., SUGAMATA, M., HARADA, K.-I., SUGANUMA, M. AND UENO, Y. (1995). Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. Nat. Toxins. **3**: 78-86.
- NEGRI, A.P. AND JONES, G.J. (1995). Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinales* by the freshwater *Alanthyrta condola*. Toxicon. **33**(5) :667-678.
- NEHRING, S. (1991). Lethal effects of a *Nodularia spumigena* bloom at the North sea coast. Red Tide News. **4**(2 &3): 8-9.
- NEILAN, B.A., BASS, R.A. AND JACOBS, D. (1995). Putative genetic loci for cyclic peptide toxin biosynthesis found across several cyanobacterial. First International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). 20-24 August 1995, Rønne, Denmark.
- NEWMAN, J.R. AND BARRETT, P.R.F. (1993). Control of *Microcystis aeruginosa* by decomposing barley straw. J. Aquat. Plant Manage. **31**: 203-206.
- NICHOLSON, B.C., ROSITANO, J. AND BURCH, M.D. (1994). Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. Wat. Res. **28**(6): 1297-1303.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., NISHIWAKI, S., OHTA, T., YOSHIZAWA, S., SUGANUMA, M., HARADA, K.-I., WATANABE, M.F. AND FUJIKI, H. (1991). Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. Jpn. J. Cancer Res. **82**: 993-996.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. J. of Cancer Res. Clin. Oncol. **113**: 420-424.
- NIZAN, S., DIMENTMAN, C. AND SHILO, M. (1986). Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. Limnol. Oceanogr. **31**(3): 497-502.
- OHTA, T., SUEOKA, E., IIDA, N., KOMORI, A., SUGANUMA, M., NISHIWAKI, R., TATEMATSU, M., KIM, S.-J., CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. (1994). Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. Cancer Res. **54**: 6402-6406.

- OHTANI, I., MOORE, R.E. AND RUNNEGAR, M.T.C. (1992). Cyindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cyindrospermopsis raciborskii*. J. Am. Chem. Soc. **114**: 7942-7944.
- PAERL, H.W. (1983). Partitioning of CO<sub>2</sub> fixation in the colonial cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: Mechanism promoting formation of surface scums. Appl. Environ. Microbiol. **46**(1): 252-259.
- PAERL, H.W. (1994). Spatial segregation of CO<sub>2</sub> fixation in *Trichodesmium* spp.: Linkage to N<sub>2</sub> fixation potential. J. Phycol. **30**(5): 790-799.
- PAERL, H.W., BLAND, P.T., BOWLES, N.D. AND HAIBACH, M.E. (1985). Adaptation to high-intensity, low-wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. **49**(5): 1046-1052.
- PAERL, H.W., TUCKER, J. AND BLAND, P.T. (1983). Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. Limnol. Oceanogr. **28**(5): 847-857.
- PAERL, H.W. AND USTACH, J.F. (1982). Blue-green algal scums: An explanation for their occurrence during freshwater blooms. Limnol. Oceanogr. **27**(2): 212-217.
- PARK, H.-D AND WATANABE, M.F. (1996). Toxic *Microcystis* in eutrophic lakes. In: Toxic Microcystis. Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Carmichael, W.W. and Fujiki, H. (Eds.), CRC Press, New York: 103-148.
- PATTERSON, G.M.L., BALDWIN, C.L., BOLIS, C.M., CAPLAN, F.R., KARUSO, H., MOORE, R.E., LARSEN, L., LEVINE, I.A., NELSON, C.S., TSCHAPPAT, K.D. AND TUANG, G.D. (1991). Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). J. Phycol. **27**: 530-536.
- PATTERSON, G.M.L., BAKER, K.K., BALDWIN, C.L., BOLIS, C.M., CAPLAN, F.R., LARSEN, L.K., LEVINE, I.A., MOORE, R.E., NELSON, C.S., TSCHAPPAT, K.D., TUANG, G.D. BOYND, M.R., CARDELLINA II, J.H., COLLINS, R.P., GUSTAFSON, K.R., SNADER, K.M., WEISLOW, O.S. AND LEWIN, R.A. (1993). Antiviral activity of cultured blue-green algae (cyanophyta). J. Phycol. **29**: 125-130.
- PHILIPS, E.J. ZEMAN, C. AND HANSEN, P. (1989). Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (Cyanophyta). J. Appl. Phycol. **1**: 137-145.
- PROSPERI, C.H. (1994). A cyanophyta capable to fixing nitrogen under high levels of oxygen. J. Phycol. **30**: 222-224.

- RAPALA, J., LAHTI, K. SIVONEN, K. AND NIEMELÄ (1994). Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. Lett. Appl. Microbiol. **19**: 423-428.
- RIJN, J.V. AND SHILO, M. (1986). Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and its effects on macromolecular synthesis. Appl. Environ. Microbiol. **52**(2): 340-344.
- RINEHART, K.L., HARADA, H.-I., NAMIKOSHI, M., CHEN, C., HARVIS, C.A., MUNRO, M.H.G., BLUNT, J.W., MULLIGAN, P.E., BEASLEY, V.R., DAHLEN, A.M. AND CARMICHAEL, W.W. (1988). Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. J. Am. Chem. Soc. **110**: 8557-8558.
- RINEHART, K.L., NAMIKOSHI, M. AND CHOI, B.W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J. Appl. Phycol. **6**: 159-176.
- ROUHIAINEN, L., BUIKEMA, W., PAULIN, L., SIVONEN, K. AND HASELKORN, R. (1995). Cloning and characterization of peptide synthetase genes from a hepatotoxic *Anabaena* strain. First International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). 20-24 August 1995, Rønne, Denmark.
- RÜCKER, J., KOHL, J.-G. AND KAISER, K. (1995). Responses of carotenoids and chlorophylls to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. Algol Stud. **77**: 51-65.
- RUNNEGAR, M.T., BERNDT, N. AND KAPLOWITZ, N. (1995). Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. Toxicol. Appl. Pharmacol. **134**: 264-272.
- RUNNEGAR, M.T., FALCONER, I.R. AND SILVER, J. (1981). Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Arch. Pharmacol. **317**: 268-272.
- RUNNEGAR, M.T., FALCONER, I.R. (1986). Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. Toxicon. **24**(2): 109-115.
- SENN, P.A.C. (1987). Estudo das cianofíceas continentais no Brasil: Passado, presente e perspectivas futuras. Nerítica. **2**: 1-32.
- SHAPIRO, J. (1990). Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 38-54.

- SHI, L., CARMICHAEL, W.W. AND MILLER, I. (1995). Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. Arch. Microbiol. **163**: 7-15.
- SHIRAI, M., MATUMARU, K. AND OHOTAKE, A. (1989). Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (Cyanobacteria). Appl. Environ. Microbiol. **55**(10): 2569-2571.
- SHUN-ZHANG, Y. (1989). Drinking water and primary liver cancer. In: Primary liver cancer. Tung, Z.-G., Wu, M.-C., Xia, S.-S. (eds.) China Academic Publishers, Beijing: 30-37.
- SILVA, E.D., WILLIAMS, D.E., ANDERSEN, R.J., KLIX, H., HOLMES, C.F.B. AND ALLEN, T.M. (1992). Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* gray. Tetrah. Lett. **33**(12): 1561-1564.
- SILVA, L.M.T. (1995). Efeito da temperatura na fotoinibição da cianobactéria *Anabaena siamensis*. Tese de Mestrado, Instituto de Química, UFRJ, p. 85.
- SKULBERG, O.M., CODD, G.A. AND CARMICHAEL, W.W. (1984). Toxic blue-green algal blooms in Europe: A growing problem. Ambio **13**: 244-247.
- SIVONEN, K. (1990). effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol. **56**(9): 2658-2666.
- SIVONEN, K., KONONEN, K., CARMICHAEL, W.W., DAHLEM, A.M., RINEHART, K.L., KIVIRANTA, J. AND NIEMELA, S.I. (1989). Occurrence of hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. Appl. Environ. Microbiol. **55**(8): 1990-1995.
- SPIVAK, C.E., WITKOP, B AND ALBUQUERQUE, E.X. (1980). Anatoxin-a: a novel, potent agonist at the nicotinic receptor. Mol. Pharmacol. **18**: 384-394.
- STONER, R.D., ADAMS, W.H., SLATKIN, D.N. AND SIEGELMAN, H.W. (1990). Cyclosporine A inhibition of microcystin toxins. Toxicon. **28**(5): 569-573.
- TAKAI, A, SASAKI, K., NAGAI, H., MIESKES, G., ISOBE, M., ISONO, K. AND YASUMOTO, T. (1995). Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatase 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: Method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target protein. Biochem. J. **306**: 657-665.
- TANDEAU DE MARSAC, N. AND HOUMARD, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. FEMS Microbiol. Rev. **104**: 119-190.

- TEIXEIRA, M.G.L.C., COSTA, M.C.N., CARVALHO, V.L.P., PEREIRA, M.S. E HAGE, E. (1993). Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. Bol. Sanit. Panam. **114**(6): 502-511.
- THOMAS, R.H. AND WALSBY, A.E. (1986). The effect of temperature on recovery of buoyancy by *Microcystis*. J. Gen. Microbiol. **132**: 1665-1673.
- TILZER, M.M. (1987). Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. New Zealand J. Mar. Fresh. Res. **21**: 401-412.
- TSUJI, K., NAITO, S., KONDO, F., ISHIKAWA, N., WATANABE, M.F., SUZUKI, M. AND HARADA, K.-I. (1994). Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. Environ. Sci. Technol. **28**: 173-177.
- TUNDISI, J.G. AND MATSUMURA-TUNDISI, T. (1992). Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: Algae and environment: a general approach. Cordeiro-Marinho, M., Azevedo, M.T.P., Sant'anna, C.L., Tomita, N.Y. and Plastino, E.M. (eds.). Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo: 1-33p.
- UTKILEN, H. AND GJØLME, N. (1992). Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. Appl. Environ. Microbiol. **58**(4): 1321-1325.
- UTKILEN, H. AND GJØLME, N. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. **61**(2): 797-800.
- VAN LIERE, L. AND MUR, L.R. (1979). Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. J. Gen. Microbiol. **115**: 153-160.
- VAN LIERE, L., MUR, L.R., GIBSON, C.E. AND HERDMAN, M. (1979). Growth and physiology of *Oscillatoria agardhii* Gomont cultivated in continuous culture with a light-dark cycle. Arch. Microbiol. **123**: 315-318.
- VOET, D. AND VOET, J.G. (1995). Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: 1-1361.
- VONSHAK, A. AND GUY, R. (1992). Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga, *Spirulina platensis* grown outdoors. Plant Cell Environ. **15**: 613-616.
- WATANABE, M.F., HARADA, K.-I., MATSUURA, K., WATANABE, M. AND SUZUKI, M. (1989). Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). J. Appl. Phycol. **1**: 161-165.



- WATANABE, M.F. AND OISHI, S. (1985). Effects of Environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. **49**(5): 1342-1344.
- WATANABE, M.F.; OISHI, S.; HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; KAWAI, H. AND SUZUKI, M. (1988). Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon. **26**(11): 1017-1025.
- WATANABE, M.M., KAYA, K. AND TAKAMURA, N. (1992). Fate of the toxic heptapeptides, the microcystins, from bloom of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. J. Phycol. **28**: 761-767.
- WESTHUIZEN, A.J. AND ELOFF, J.N.. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). Planta **163**: 55-59.
- WICKS, R.J AND THIEL, P.G. (1990). Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. Environ. Science Technol. **24**(9): 1413-1418.
- YASUNO, M. AND SUGAYA, Y. (1991). Toxicities of *Microcystis viridis* and the isolated hepatotoxic polypeptides on cladocerans. Verh. Internat. Limnol. **24**: 2622-2626.
- YOO, R.S., CARMICHAEL, W.W., HOEHN, R.C. AND HRUDEY, S.E. (1995). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: A resource guide. AWWA Research Foundation and American Water Works Association, USA: 1-229 p.
- YOSHIZAWA, S., MATSUSHI, R., WATANABE, M.F., HARADA, K.-I., ICHIHARA, A., CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. (1990). Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. J. Cancer Res. **116**: 609-614.
- ZAGATTO, P.A. (1995). Evaluation ecotoxicologique du reservoir Guarapiranga - SP - Bresil, en relation avec le probleme des algues toxiques et des algicides. Tese de Doutorado, Centre des Sciences de l' Environnement, Universite de Metz - France, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) São Paulo - Brasil, 86p.
- ZEVENBOON, W AND MUR, L.R. (1984). Growth and photosynthetic response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in relation to photoperiodicity and irradiance. Arch. Microbiol. **139**: 232-239.
- ZHANG, Q.-X., CARMICHAEL, W.W., YU, M.J. AND LI, S.-H. (1991). Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater cyanobacterial (blue-green algae) waterblooms collected in Central China. Environ. Toxicol. Chem. **10**: 313-321.

ZOHARY, T. (1989). Cyanobacterial hyperscums of hypertrophic water bodies. In: Microbial mats - physiological biology of benthic microbial communities. Cohen, Y. and Rosenberg, E. (eds), American Society of Biology, Washigton, 52-63p.

ZOHARY, T. AND BREEN, C.M. (1989). Environmental factors favouring the formation of *Microcystis aeruginosa* hyperscums in a hypertrophic lake. Hydrobiol. **178**: 179-192.

ZOHARY, T. (1985). Hyperscums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in hypertrophyc lake (Hartbeespoort Dam, South Africa). J. Plankton Res. **7**: 399-409.

**7 - ANEXOS**

**Tabela I - Valores de desvios-padrão das análises de clorofila *a***

<b>EXPERIMENTO I</b>			
Dias	40µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	40 para 180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>
0	0,00	-	0,06
3	0,02	-	0,02
6	0,03	-	0,00
9	0,03	-	0,06
12	0,04	-	0,02
13	-	-	0,04
13,3	-	-	0,04
14	-	-	0,04
14,3	-	-	0,04
15	0,02	0,02	0,03
15,3	0,05	0,02	0,03
16	0,01	0,00	0,04
16,3	0,05	0,00	0,02
17	0,03	0,02	0,01
17,3	0,02	0,02	0,01
18	0,00	0,01	-
18,3	0,00	0,02	-
19	0,01	0,05	-
19,3	0,03	-	-
<b>EXPERIMENTO II</b>			
Dias	40µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	40 para 180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>
0	0,01	-	0,03
2	0,00	-	0,02
4	0,03	-	0,00
5	-	-	0,01
5,3	-	-	0,00
6	0,02	-	0,03
6,3	-	-	0,01
7	0,01	0,02	0,01
7,3	0,03	0,03	0,00
8	0,03	0,01	0,01
8,3	0,03	0,02	0,01
9	0,02	0,03	0,02
9,3	0,02	0,02	0,01
10	0,03	0,01	-
10,3	0,01	0,02	-
11	0,03	0,01	-
11,3	0,03	0,02	-

**Tabela II - Valores de desvios-padrão das análises de carboidratos totais**

<b>EXPERIMENTO I</b>			
Dias	40µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	40 para 180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>
0	0,63	-	0,63
3	0,24	-	0,37
6	0,61	-	0,28
9	0,24	-	0,12
12	0,52	-	0,83
13	-	-	0,73
13,3	-	-	0,37
14	-	-	0,29
14,3	-	-	0,63
15	0,36	0,73	-
15,3	1,02	0,26	-
16	0,44	0,26	0,55
16,3	0,47	0,72	0,72
17	0,94	0,16	-
17,3	0,36	0,55	-
18	0,29	0,66	-
18,3	0,64	-	-
19	0,41	0,23	-
19,3	0,44	0,32	-
<b>EXPERIMENTO II</b>			
Dias	40µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	40 para 180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	180µmoles fótons . m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>
0	0,04	-	0,03
2	0,01	-	0,55
4	0,17	-	0,20
5	-	-	0,26
5,3	-	-	0,05
6	0,30	-	0,21
6,3	-	-	0,22
7	0,19	0,12	0,21
7,3	0,29	0,66	0,38
8	0,14	0,16	0,41
8,3	0,11	0,35	0,20
9	0,34	0,04	0,27
9,3	0,25	0,22	0,28
10	0,09	0,16	-
10,3	0,07	0,41	-
11	0,04	0,26	-
11,3	0,32	0,32	-

**Tabela III - Valores de desvios-padrão das análises de proteínas totais**

<b>EXPERIMENTO I</b>			
Dias	40µmoles fótons $m^{-2} s^{-1}$	40 para 180µmoles fótons $m^{-2} s^{-1}$	180µmoles fótons $m^{-2} s^{-1}$
0	-	-	0,05
3	-	-	0,41
6	-	-	0,12
9	0,21	-	0,06
12	0,06	-	0,41
13	-	-	-
13,3	-	-	0,18
14	-	-	0,26
14,3	-	-	-
15	0,13	0,62	0,23
15,3	0,30	0,23	0,19
16	0,14	0,43	0,17
16,3	0,02	0,00	0,04
17	0,19	0,00	-
17,3	0,20	0,06	0,17
18	0,11	0,09	-
18,3	0,28	0,39	-
19	0,19	0,39	-
19,3	0,44	0,30	-
<b>EXPERIMENTO II</b>			
Dias	40µmoles fótons $m^{-2} s^{-1}$	40 para 180 µmoles fótons $m^{-2} s^{-1}$	180µmoles fótons $m^{-2} s^{-1}$
0	-	-	0,18
2	0,22	-	0,18
4	0,21	-	0,28
5	-	-	0,23
5,3	-	-	0,09
6	0,35	-	0,17
6,3	-	-	0,20
7	0,32	0,27	0,14
7,3	0,47	0,08	0,17
8	0,26	0,12	0,30
8,3	0,23	0,21	0,17
9	0,14	0,18	0,11
9,3	0,09	0,09	0,12
10	0,16	0,16	-
10,3	0,10	0,11	-
11	0,13	0,04	-
11,3	0,08	0,03	-