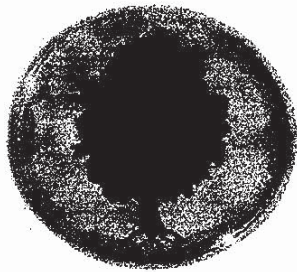


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*
(Cyanophyceae) E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA EM CULTIVOS
UNIALGAIS E MISTOS.

Ana Cláudia Pimentel de Oliveira



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
1997

ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *S. aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) E A
SUA PRODUÇÃO DE HEPATOTOXINAS EM CULTIVOS UNIALGAIS E
MISTOS.

Ana Cláudia Pimentel de Oliveira

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
1997

FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, A.C.P.

ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA EM CULTIVOS UNIALGAIS E MISTOS.

Ana Cláudia Pimentel de Oliveira, UFRJ, 1997.

96 p.; 15 figuras, 7 tabelas.

anexo: 43 tabelas

Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Biotecnologia Vegetal

Palavras chaves: 1. Cianofíceas; 2. Cultivos mistos 3. Hepatotoxinas; 4. Microcistinas; 5. *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*

ORIENTADORA:

Profª Drª Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Aos meus pais, Tuninha e João pela oportunidade e incentivo que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

- À Profª Sandra Azevedo pela sua orientação, incentivo e grande amizade;
- À Profª Célia Vilac pelas suas sugestões e contribuição na avaliação final do presente trabalho;
- À coordenação do Programa de Biotecnologia Vegetal pelo excelente trabalho desenvolvido nesses poucos anos de atuação;
- Ao Prof. Ricardo Chaloub pela colaboração e amizade;
- Ao Prof. Alfredo e sua equipe pelo uso de suas instalações e equipamentos do seu laboratório;
- Aos amigos do Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas: Aloysio, Marcelo, Pati, Patricia, Raquel, Simone, Sílvia e Renato (estão em Caruaru), Juliene e Karine pela amizade, paciência e companherismo durante estes anos;
- À querida Paty (está em Brasília) pela grande amizade;
- À minha amiga Simone um agradecimento especial pelos incentivos e ajuda nos momentos difíceis;
- A todos os colegas do Laboratório de Apoio: Marli, Celso, Bete, Elza, Joaquim e Cosme;
- Ao Profº Antonio Jorge e sua equipe: Cristina, Elimar e Eduardo pela utilização dos equipamentos da Central Analítica;
- Em especial a Elimar pela paciência e grande ajuda durante as análises de HPLC;
- Ao Alexandre pela ajuda no 'scanner';
- Ao Bias, João e Rose do Laboratório de Limnologia, pela ajuda nas análises de determinação de nitrato e ortofosfato;
- Ao Prof. Luís Otávio pela ajuda na realização e interpretação das análises estatísticas;
- Ao Aloysio pela ajuda na tradução do resumo;
- Aos meus irmãos Tati e Téo pelo grande aprendizado e amizade;
- À CAPES pela bolsa de estudo concedida;
- A todos que de alguma forma me auxiliaram na realização desse trabalho;
- Ao meu amor Carlos pelo incentivo, amizade e companherismo.

RESUMO

ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA EM CULTIVOS UNIALGAIS E MISTOS.

A ocorrência de 'blooms' tóxicos de cianofíceas em lagos eutróficos, rios e reservatórios têm sido freqüente.

As toxinas de cianofíceas podem causar envenenamento de mamíferos, aves, peixes e efeitos diversos na saúde pública. As hepatotoxinas são as toxinas mais comum produzidas pelas cianofíceas, e têm recebido uma maior atenção devido a sua atividade biológica e ampla distribuição. Entretanto, os mecanismos controladores dessas cianotoxinas ainda não foram devidamente esclarecidos, embora já existam evidências da dependência de fatores nutricionais para a estimulação do crescimento e da síntese dessas hepatotoxinas.

Estudos prévios com a cepa (NPBS-2) da espécie *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* demonstraram que essa cepa apresentava um alto grau de hepatotoxicidade quando crescida em cultivos mistos com a clorofíceia *Monorraphyidium convolutum*.

Em vista de tal fato, realizaram-se experimentos com cultivos unialgais e mistos com as espécies citadas acima, visando compreender quais os possíveis fatores que poderiam estar estimulando a produção de microcistina pela espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis*.

Para tanto foram realizados cultivos das espécies nos meios padrões: ASM-1 e Z-8 e em meios modificados chamados por nós de 'Especial' e 'Reconstituído'. Nesses meios a composição nutricional foi diferenciada dos meios padrões de cultivo utilizados.

Durante os experimentos, acompanhamos o estado fisiológico das culturas através da contagem de células e por análises de clorofila *a*, carboidratos e proteínas intra e extracelulares.

A variação de produção de microcistina foi avaliada por bioensaios com camundongos, imunoenaios e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Os cultivos realizados em meio Z-8, que apresenta em sua composição uma concentração de nitrato 3 vezes maior que no meio ASM-1, apresentaram um bom

crescimento celular. No entanto, nesse meio de cultivo as células crescidas em condições unialgais e mistas não se mostraram tóxicas. Já os cultivos mistos realizados em meio ASM-1 apresentaram uma alta toxicidade.

A composição química dos nutrientes dos meios de cultivos utilizados alterou significativamente a taxa de crescimento de ambas as espécies crescidas em cultivos unialgais e mistos. A produção de microcistinas também variou nessas diferentes condições de cultivo.

Os cromatogramas obtidos por HPLC evidenciaram que as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* crescidas com proporções diferentes de *M. convolutum* apresentaram uma variação quali-quantitativa na produção de microcistinas.

Portanto, devemos considerar que além dos fatores físicos e químicos, já determinados em outros trabalhos, o crescimento celular das cianofíceas e a produção de microcistinas por esses organismos podem ser afetados por fatores biológicos associados a relações interespecíficas.

ABSTRACT

ECOPHYSIOLOGICAL STUDIES OF *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) AND MICROCYSTIN PRODUCTION IN UNIALGAL AND MIXED CULTURES.

The occurrence of toxic 'blooms' of Cyanophyceae in eutrophic lakes, rivers and reservoirs has been frequent.

Cyanophyceae toxins may cause poisoning of mammals, birds, fishes and several effects in public health. Hepatotoxins are the most common toxins produced by cyanophyceae and have been receiving more attention due to their biological activity and wide distribution. Nevertheless, the controlling mechanisms of cyanotoxins production has not been fully understood yet, although there are already some evidences of dependency on nutritional factors for the stimulation of growth and synthesis of these hepatotoxins.

Previous studies with the strain NPBS-2 of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* have shown that this strain presented a high degree of hepatotoxicity when grown in mixed cultures with the Chlorophyceae *Monorraphyidium convolutum*.

Due to this fact, experiments with unialgal and mixed cultures were carried out with both species with the aim of understanding which are the likely factors that would be stimulating the production of microcystins by *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*.

The cultures of both species were carried out in ASM-1 and Z-8 standard media and in modified 'Special' and 'Reconstituted' media which have the nutritional composition modified from ASM-1 and Z-8 media respectively.

During the experiments, we followed the physiological state of the cultures by cell counting and by analysis of chlorophyl-a, intra and extracellular carbohydrates and protein.

The variation in microcystin production was evaluated by mouse bioassay, immunoassay and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The cultures carried out in Z-8 medium, which is three times more concentrated in nitrate than ASM-1 medium, showed a good cellular growth. However, in this culture medium, cells grown in unialgal and mixed conditions have shown no toxicity. Nevertheless, the mixed cultures carried out in ASM-1 medium showed high toxicity.

The chemical composition of the culture media significantly affected the growth of both species in unialgal and mixed cultures. Microcystins production also varied under these different culture conditions.

The chromatograms obtained by HPLC evidenced that *S. aquatilis* f. *aquatilis* grown in different proportions of *M. convolutum* presented a variation in both quality and quantity of microcystins production.

Therefore, one must consider that besides the physical and chemical factors already determined in other studies, the cellular growth of cyanophyceae and microcystins production by these organisms may be affected by biological factors related to interespecific interations.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA _____	iii
AGRADECIMENTOS _____	vi
RESUMO _____	vii
ABSTRACT _____	ix
 1.0 - INTRODUÇÃO:	
1.1 - Considerações Gerais _____	1
1.2 - As Neurotoxinas _____	2
1.3 - As Hepatotoxinas _____	5
1.4 - Efeitos Ecológicos _____	8
1.5 - Efeitos na Saúde Pública _____	8
1.6 - Fatores Ambientais que Influenciam a produção de Toxinas _____	11
2.0 - OBJETIVOS: _____	15
 3.0 - MATERIAL E MÉTODOS:	
3.1 - Condição de cultivo: _____	
3.1.1 - Cultivos unialgais e mistos em meio ASM-1 _____	17
3.1.2 - Cultivos unialgais e mistos em meio Z-8 _____	18
3.1.3 - Cultivos unialgais em meio ASM-1 Especial _____	19
3.1.4 - Cultivos unialgais em meio Z-8 Especial _____	19
3.1.5 - Cultivos unialgais em meio ASM-1 Reconstituído _____	20
3.1.6 - Cultivos unialgais em meio ASM-1 Modificado _____	20
 3.2 - Parâmetros fisiológicos analisados durante os cultivos:	
3.2.1.- Contagem de células para determinação da taxa de crescimento, tempo médio de duplicação e razão máxima de crescimento _____	21
3.2.2 - Concentração de clorofila <i>a</i> _____	22
3.2.3.- Concentração de proteínas intra e extracelulares _____	22
3.2.4 - Concentração de carboidratos intra e extracelulares _____	23

3.3 - Análise de Toxicidade:	23
3.3.1 - Bioensaios	24
3.3.2 - Imunoensaios	24
3.3.4 - Extração e Purificação das Hepatotoxinas	24
3.4 - Testes Estatísticos:	25
4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:	
4.1 - Crescimento da espécie <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>	27
4.2 - Crescimento da espécie <i>M. convolutum</i>	29
4.3 - Concentração de carboidratos intra e extracelulares	33
4.4 - Concentração de proteínas intra e extracelulares	36
4.5 - Concentração de clorofila <i>a</i>	40
4.6 - Produção de microcistina:	
4.6.1 - Análise por bioensaios e imunoensaios	42
4.6.2 - Análise por HPLC	46
5.0 - DISCUSSÃO FINAL	53
6.0 - CONCLUSÕES	54
7.0 - BIBLIOGRAFIA	55
8.0 - ANEXOS	66

INDÍCE DE TABELA:

Tabela 1 - Composição do meio ASM-1 _____	17
Tabela 2 - Composição do meio Z-8 _____	18
Tabela 3 - Resumo das condições de cultivo _____	26
Tabela 4 - Resultados das taxas de crescimento (μ), número de divisão por dia (G) e razão máxima de crescimento (R) _____	30
Tabela 5 - Resultados dos bioensaios e imunoenaios _____	43
Tabela 6 - Área dos picos de microcistina determinadas para os extratos analisados em coluna semi-preparativa e analítica _____	47
Tabela 7 - Área dos picos de microcistina determinado para os extratos analisados em coluna analítica _____	52

INDÍCE DE FIGURA:

Figura 1 - Estrutura das neurotoxinas _____	4
Figura 2 - Estrutura das microcistinas _____	7
Figura 3 - Estrutura das nodularinas _____	7
Figura 4 - Curva de crescimento das células de <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> e <i>M. convolutum</i> crescidas em condições unialgais nos meios ASM-1, Z-8, ASM-1 Especial e Z-8 Especial _____	31
Figura 5 - Curva de crescimento das células de <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> crescidas em condições unialgais no meio ASM-1 Reconstituído _____	32
Figura 6 - Curva de crescimento das células de <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> e <i>M. convolutum</i> crescidas em cultivo misto nos meios ASM-1 e Z-8 _____	32
Figura 7 - Variação das concentrações de carboidratos intra e extracelulares das espécies <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> e <i>M. convolutum</i> crescidas em condições unialgais no meio ASM-1 e ASM-1 Reconstituído _____	35
Figura 8 - Variação das concentrações de proteínas intra e extracelulares das espécies <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> e <i>M. convolutum</i> crescidas em condições unialgais no meio ASM-1 e ASM-1 Reconstituído _____	38

Figura 9 - Variação das concentrações de carboidratos e proteínas intra e extracelulares das espécies <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> e <i>M. convolutum</i> crescidas em cultivos mistos no meio ASM-1 _____	39
Figura 10 - Variação das concentrações de clorofila <u>a</u> das espécies <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> e <i>M. convolutum</i> crescidas em condições unialgais e mistas no meio ASM-1 e Z-8 _____	41
Figura 11 - Variação das concentrações de clorofila <u>a</u> da espécie <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> crescidas em condições unialgais no meio ASM-1Reconstituído _____	41
Figura 12 - Resultados dos testes ELISA _____	44
Figura 13 - Cromatogramas por HPLC dos cultivos mistos com 11% e 21% de <i>M. convolutum</i> _____	48
Figura 14 - Cromatogramas por HPLC dos cultivos mistos com 41% e 80% de <i>M. convolutum</i> _____	49
Figura 15 - Espectro de absorção da microcistina-LR _____	50

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais:

A classe Cyanophyceae faz parte do único grupo de algas que possui organização celular procariótica, uma das formas mais primitivas de vida. As cianofíceas também são conhecidas como cianobactérias e diferem dos eucariotos por não apresentarem uma estrutura organizada do seu material genético, citoplasmático e ausência de núcleo (Carmichael, 1994).

As cianofíceas são o único grupo de microorganismos procariontes que possuem um sistema fotossintético similar ao dos eucariotos (Ho & Krogmann, 1992). São formadas por espécies unicelulares, colônias e filamentosas (Gibson & Smith, 1982), podem apresentar mucilagem ao redor de sua membrana citoplasmática, que as protegem do estresse ambiental. Algumas espécies possuem estruturas especializadas na fixação de nitrogênio atmosférico, chamadas de heterocistos. A fixação do nitrogênio é favorecida quando as concentrações de nitrato e amônia do ambiente aquático se tornam muito baixas. Esse nitrogênio atmosférico é convertido em amônia pela ação da enzima nitrogenase. Os processos bioquímicos que envolvem a fixação de nitrogênio são complexos e requerem a transferência de energia das células vegetativas para os heterocistos (Yoo *et al.*, 1995).

A capacidade das cianofíceas em armazenar os nutrientes, quando a sua concentração no meio está em excesso, confere grande vantagem, visto que essas reservas podem ser utilizadas para o crescimento celular em condições de limitação de nutrientes.

O nitrogênio é armazenado principalmente nas cianoficinas, estruturas exclusivas das cianofíceas, que são polímeros de alto peso molecular, compostos de aspartato e arginina (Newman *et al.*, 1987). O fósforo é armazenado em corpos de polifosfatos.

Algumas espécies podem produzir células diferenciadas, chamadas de acinetos, que são estruturas especializadas que funcionam como um esporo de resistência em condições ambientais adversas, permitindo à célula sobreviver por longos períodos (Yoo *et al.*, 1995).

Todas as cianofíceas contém como pigmentos a clorofila *a* e as ficobilinas, que são complexos de pigmentos protéicos, baseados em ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina, que determinam a cor característica do organismo - verde-azulada. As ficobilinas compõem um sistema de antena que auxilia na captação de luz para a fotossíntese e protege a clorofila da fotooxidação (Kromkamp, 1987).

profundidade em que tanto a intensidade luminosa quanto os nutrientes sejam satisfatório para o seu crescimento (Kromkamp *et al.*, 1987; Humphries & Lyne, 1988).

As cianofíceas são conhecidas por produzirem uma ampla variedade de metabólitos secundários, que incluem compostos que agem como hormônios, antibióticos, aleloquímicos e toxinas (Gleason & Wood, 1987; Carmichael, 1991; Cood, 1994). Esses metabólitos secundários vêm despertando grandes interesses bioquímicos, farmacológicos e biotecnológicos.

As toxinas são conhecidas há mais de 100 anos (Francis 1878-citado em Moore, 1977), e estão classificadas em dois grupos principais: as neurotoxinas e as hepatotoxinas.

1.2. - As Neurotoxinas :

As neurotoxinas (figura 1) são alcalóides produzidos principalmente pelos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium* (Mahmood & Carmichael, 1986; Sivonen *et al.*, 1989; Carmichael *et al.*, 1990; Skulberg *et al.*, 1992). Esses gêneros estão caracterizados por produzirem cinco tipos diferentes de neurotoxinas, quimicamente já definidas.

A anatoxina-a (antx-a), um análogo da cocaína, foi a primeira toxina de cianofíceas de água doce a ser definida. É uma amina secundária bicíclica 2-acetil-9-azabicyclo(4.2.1) de peso molecular de 165 daltons. Esse alcalóide neurotóxico age nas ligações sinápticas como um potente agente despolarizador e bloqueador neuromuscular, afetando os receptores de acetilcolina nicotínicos e muscarínicos. Essa toxina compete pelos receptores da acetilcolina, entretanto não é degradada pela acetilcolinesterase, levando a uma super estimulação dos músculos (Edwards *et al.*, 1992; Carmichael, 1994; Sivonen, 1996)

Os sinais clínicos de neurotoxicoses em animais de laboratório são: fasciculação muscular, diminuição dos movimentos, colapso neuromuscular, dor abdominal, cianose, convulsões e morte. A morte pode ocorrer de poucos minutos à poucas horas. A concentração letal média¹ (CL₅₀) aplicada em camundongos intraperitonealmente (i.p.) é de 200 µg/kg da toxina purificada (Carmichael, 1991).

A anatoxina-a(s) - (Antx-a(s)) é uma outra neurotoxina produzida por algumas espécies de cianofíceas, que promovem, além dos sintomas já descritos, uma intensa

salivação. Antx-a (s) é um organofosforado, inibidor da colinesterase (Mahmood & Carmichael, 1986b, 1987- citados em Carmichael, 1992).

Estruturalmente, a Antx-a(s) é um único ester N-hidroxi guanidina metil fosfato, de peso molecular de 252 daltons, sendo 10 vezes mais tóxica que a Antx-a, com CL_{50} de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Carmichael, 1991; Sivonen, 1996).

As afantoxinas também são neurotoxinas, produzidas por algumas cianofíceas. Evidências cromatográficas e farmacológicas estabeleceram que as afantoxinas são formadas, principalmente, de dois alcalóides extremamente tóxicos; as saxitoxinas (STX) e as neosaxitoxinas (NEOSTX). Essas toxinas já são conhecidas. São produzidas pelos dinoflagelados marinhos, que formam as marés vermelhas (PSP - paralytic shellfish poisoning). As afantoxinas agem, inibindo a condução nervosa, bloqueando o canal de sódio, afetando, assim, o transporte sódio-potássio pela membrana (Carmichael, 1991)

¹ - Valor que representa a dose estimada, que causa a morte de 50% da população exposta à toxina.

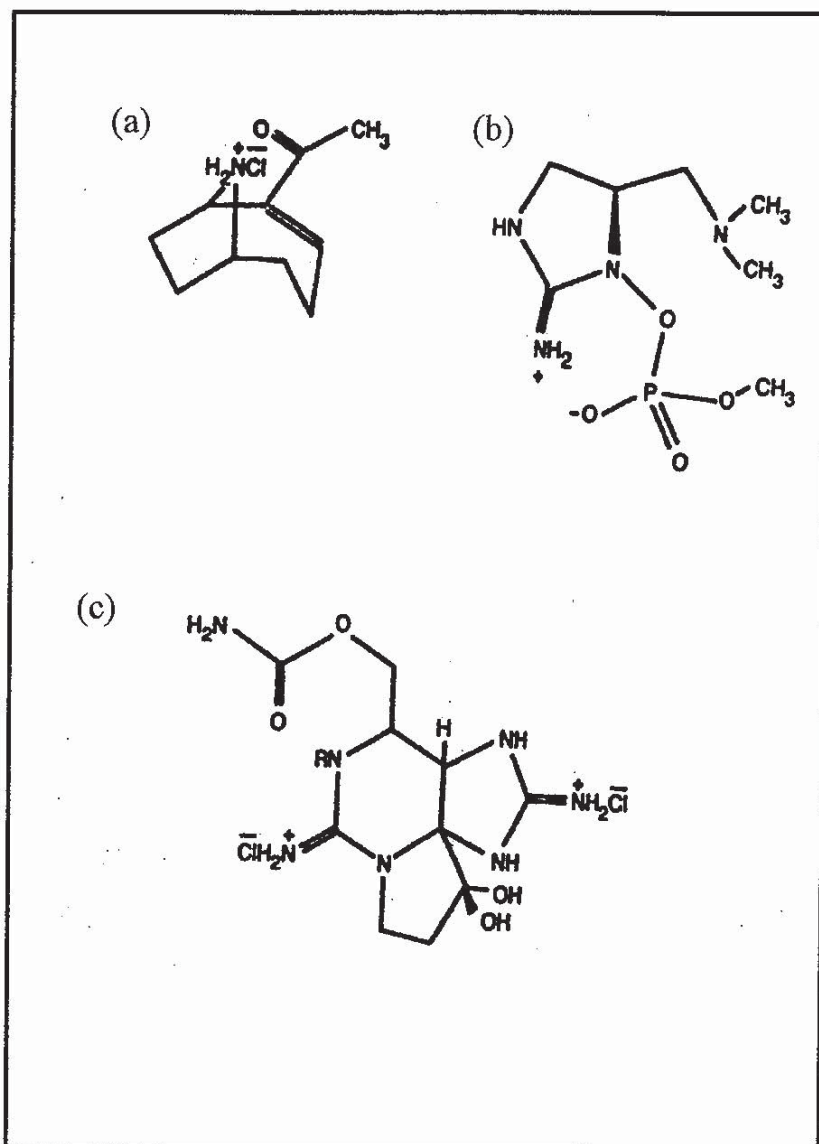


Figura 1 - Estrutura das neurotoxinas produzidas por cepas dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Oscillatoria*, (a) anatoxina-a, (b) anatoxina-a(s) e (c) saxitoxina (se R for um H) ou neosaxitoxina (se R for uma OH).

1.3 - As Hepatotoxinas :

As hepatotoxinas são as toxinas mais comumente produzidas por cianofíceas, principalmente dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* (Carmichael,1992; Carmichael & Falconer,1993).

A maioria das hepatotoxinas, até agora, caracterizadas, são heptapeptídeos cíclicos, conhecidos como microcistinas ou pentapeptídeos, chamados nodularinas. São inibidores potentes e específicos de proteína fosfatases, dos tipos 1A e 2A (PP1 e PP2) (Falconer & Bucker,1989; Erickson *et al.*,1990; Honkanen *et al.*,1990., Mackinitosh *et al.*,1990; Carmichael, 1994, Vasconcelos *et al.*,1995). As hepatotoxinas causam danos aos hepatócitos, as células do fígado, através dos receptores dos ácidos biliares, promovendo uma desorganização dos filamentos intermediários e dos microfilamentos de actina, que são os polímeros protéicos do citoesqueleto. Assim, ocorre uma diminuição do tamanho dos hepatócitos. Consequentemente, o fígado perde a sua arquitetura e passa a desenvolver graves problemas hepáticos (Nakano *et al.*,1991; Lindholm *et al.*,1992; Chen *et al.*,1993; Carmichael,1994; Yu,1994.; Claeysens *et al.*,1995).

Os heptapeptídeos tóxicos de cianofíceas têm peso molecular de, aproximadamente, 1000 daltons (Kenefick *et al.*,1992), e são considerados, quimicamente, bastante estáveis. Em experimentos de laboratório, observou-se que essas toxinas podem permanecer ativas, na água, por aproximadamente 3 semanas (Harada *et al.*,1996).

Os sinais clínicos das hepatotoxicoses têm sido observados em animais de laboratório e de campo e incluem fraqueza, anorexia, vômito, extremidades do corpo frias e pálidas e diarreia. A morte pode ocorrer de poucas horas a poucos dias após a exposição inicial à toxina, resultado de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, caracterizado pelo aumento de cerca de 100% do peso do fígado (Carmichael,1994).

As microcistinas (figura 2) foram as primeiras hepatotoxinas identificadas, isoladas da espécie *Microcystis aeruginosa* (Bishop *et al.*,1959). A estrutura dessas microcistinas foi determinada como sendo um heptapeptídeo monocíclico, composto de três D-aminoácidos, dois L-aminoácidos e dois aminoácidos não usuais: N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4, 6-ácido dienóico, conhecido abreviadamente como: Adda (Nakano *et al.*, 1991; Luukkainen *et al.*, 1994).

A diferença estrutural das, aproximadamente, 50 microcistinas já descritas, depende principalmente das variações de dois L-aminoácidos e da presença ou ausência de grupos metilados em β -Me-Asp e/ou Mdha (Carmichael, 1992). As variações dos dois L-aminoácidos podem gerar combinações, conhecidas como microcistina-LA (leucina-alanina); -LR (leucina-arginina); -YR (tirosina-arginina); -YA (tirosina-alanina); -RR (arginina-arginina) e YM (tirosina-metionina). Outra característica importante da molécula de microcistina é a presença do β -aminoácido Adda. Esse aminoácido aumenta a hidrofobicidade de toda a molécula de microcistina, sendo também encontrado nas nodularinas. É considerado essencial para sua atividade biológica (Carmichael, 1994; Harada *et al.*, 1996; Sivonen, 1996).

As nodularinas (figura 3) são pentapeptídeos cíclicos e sua estrutura é bastante semelhante à das microcistinas γ -D-ácido glutâmico, β -D-eritro- β -ácido metil aspártico, L-arginina, 2-(metilamino)-2-ácido dehidrobutírico (Mdhb) e Adda (JiSi & Carmichael, 1994).

As microcistinas e nodularinas estão envolvidas na promoção de tumores de fígado em pessoas expostas à doses sub-letais por longos períodos, sendo que a principal via de contágio é a água, de consumo oral (Carmichael, 1994; Ohta *et al.*, 1994; Rudolph-Böhner *et al.*, 1994).

A cilindrospermopsina, recentemente isolada de *Cylindrospermopsis raciborskii*, representa um novo tipo de hepatotóxina. É um alcalóide citotóxico, com peso molecular de 415 daltons. A sua CL_{50} em camundongos (i.p.) é de 2,1 mg/kg, em 24 horas e 0,2 mg/kg, em 5-6 dias. Essa cianotóxina mostra os mesmos sintomas das hepatotoxinas já descritas, e ainda pode causar danos nos rins, timo e coração (Harada *et al.*, 1994; Ohtani *et al.*, 1992-citados em Sivonen, 1996).

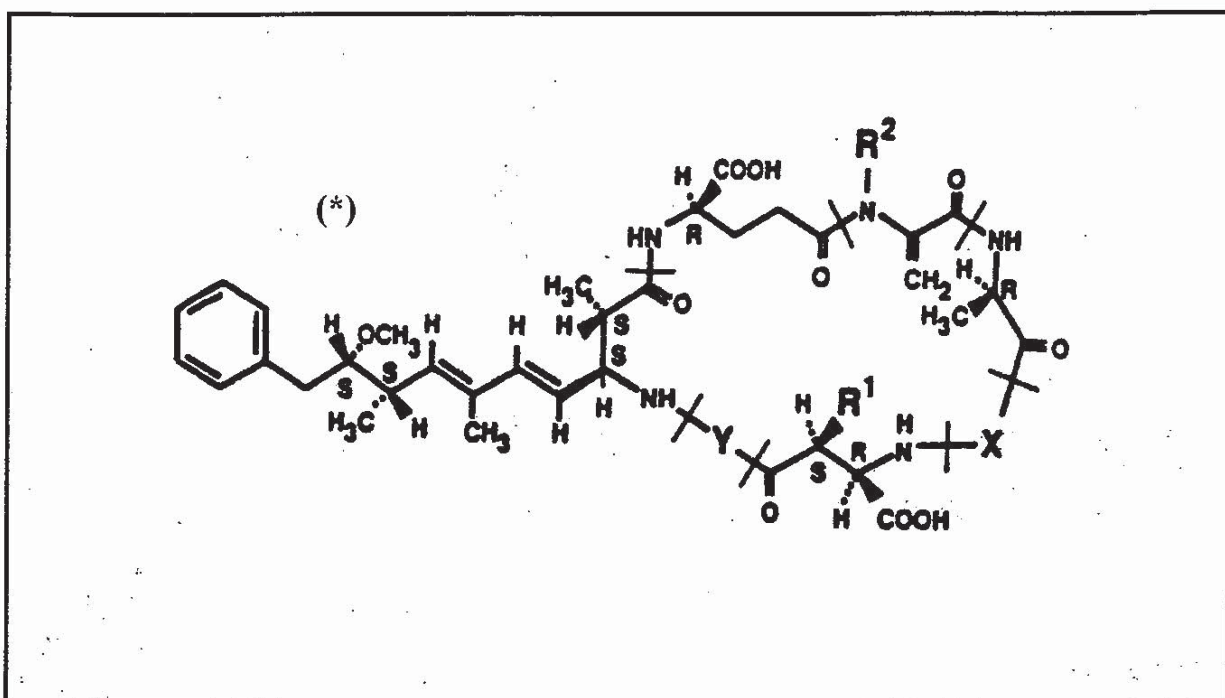


Figura 2- Estrutura das microcistinas, X e Y representam os dois aminoácidos que podem variar e R^1 e R^2 são os locais de possíveis metilações, (*) indica o aminoácido Adda.

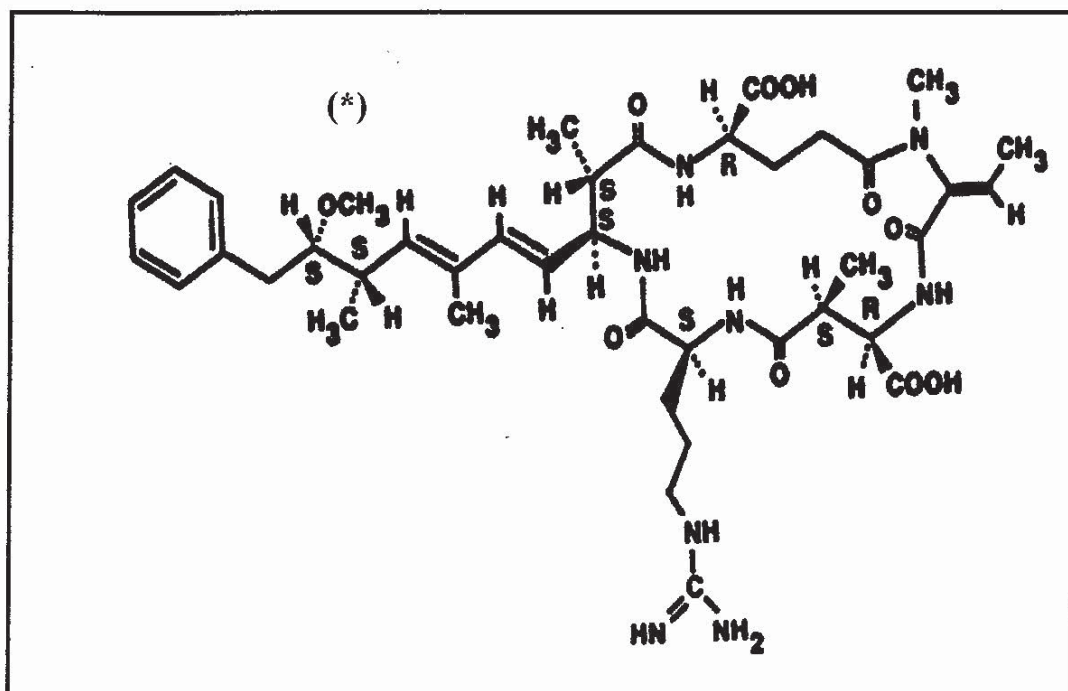


Figura 3 - Estrutura das nodularinas produzidas por cepas da espécie *Nodularia spumigena* (*) indica o aminoácido Adda.

1.4 - Efeitos Ecológicos :

As principais conseqüências do crescimento intensificado das cianofíceas são a mortandade dos animais aquáticos (peixes, zooplâncton e macroinvertebrados), devido a presença das cianotoxinas ou a desoxigenação da água, e o agravamento da qualidade de água resultante da decomposição dessa matéria orgânica (Barica *et al.*,1980)

As cianotoxinas já foram detectadas em quase todos os ecossistemas aquáticos, causando vários danos para a sociedade. Os animais selvagens e domésticos podem ser afetados através da ingestão da água de locais contaminados com células tóxicas, que se concentram às margens do corpo d'água ou em locais de fácil acesso (Tester, 1991).

Edwards *et al.*(1992) relataram casos de cachorros mortos na Escócia após a ingestão de água contaminada com cianofícea tóxica, o que foi confirmado com as análises do conteúdo estomacal.

Segundo Anderson *et al.*(1993), nos últimos verões dos EUA, vêm se observando sérios problemas na indústria pesqueira de salmão, tendo sido observado um inibidor de proteína fosfatase nos fígados dos peixes, que foi cromatograficamente igual a microcistina-LR.

1.5- Efeitos na Saúde Pública :

As cianofíceas também apresentam um risco para a saúde pública. As intoxicações humanas podem ocorrer pelo contato com a água com células tóxicas, pelo consumo de peixes de locais contaminados e pela contaminação de reservatórios de abastecimento público (Hunter,1992).

A utilização da água contaminada com cianofíceas tóxicas para consumo humano, sem o tratamento adequado para a retenção das células tóxicas ou das toxinas, pode ser a causa de surtos de doenças agudas e crônicas, dependendo da dose e tempo de exposição (Vasconcelos,1994; Hunter,1992).

Vários casos de intoxicações humanas já foram relatadas. YU (1994) fez uma pesquisa na China, onde constatou uma alta taxa de mortalidade por carcinoma hepatocelular. Verificando-se uma maior incidência de câncer de fígado na população que era abastecida com água contaminada com cianofíceas tóxicas, predominando o gênero *Microcystis*. Sabendo-se que as microcistinas são promotoras de tumores, este autor

associou as áreas de abastecimento de água não tratada ao alto número de casos de carcinoma hepatocelular.

No Brasil, 75% das cepas isoladas dos corpos d'água contaminados com cianofíceas mostraram-se tóxicas nos bioensaios com camundongos (Costa & Azevedo, 1994; Azevedo *et al.*, 1994).

Em 1988, ocorreu na Bahia uma grave epidemia de gastroenterite que atingiu a região de Paulo Afonso, logo após o alagamento do reservatório de Itaparica. Foram registrados aproximadamente 88 óbitos, devido a uma intensa diarreia. Todas as 2.392 pessoas² infectadas apresentaram os sintomas típicos das hepatotoxicoses. As análises da água revelaram a presença de algas flageladas pigmentadas e cianofíceas do gênero *Anabaena* e *Microcystis* (Teixeira *et al.*, 1993).

Os sinais clínicos das intoxicações humanas por esses peptídeos hepatotóxicos incluem rinites alérgicas, conjutivites e dermatites; nos casos mais agudos pode-se ainda observar febre, diarreia, vômitos, anorexia, hepatomegalia e hepatite (Hunter, 1992).

Um outro caso grave aconteceu em 1996 na cidade de Caruaru, Pernambuco, onde várias pessoas que faziam o tratamento de hemodiálise passaram a desenvolver os sintomas típicos das hepatotoxicoses, o que ocasionou até agora o óbito de mais de 60 pessoas. Foi verificado a presença de microcistina no sangue e nos fígados das pessoas infectadas, assim como no filtro de carvão ativado da clínica de hemodiálise (Azevedo, 1996).

Estudos realizados na Finlândia têm mostrado que o tratamento convencional da água que inclui os processos de coagulação com sulfato de alumínio ou cloreto de ferro, filtração em areia e cloração, não são suficientes para a remoção das hepatotoxinas e neurotoxinas. As baixas concentrações de carvão ativado (5 mg/L) removem somente 20-30% das hepatotoxinas e 60% das neurotoxinas, enquanto que a remoção de 95-100% das toxinas se dá apenas quando utilizados os processos de ionização e adsorção com carvão ativado. É importante ressaltar que a remoção das toxinas está ligada à natureza da água e à qualidade e quantidade de carvão ativado utilizado (Bernazeu & Eaux-Dumez, 1994).

² - 70,6% dos indivíduos hospitalizados faziam parte de uma faixa etária com menos de 5 anos.

Falconer *et al.* (1994) relatou que, na Austrália, um reservatório de abastecimento público estava contaminado com células tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e o único tratamento foi a cloração. Após uma semana foi notificado uma epidemia de hepatointerites que hospitalizou 136 pessoas.

O processo de degradação das hepatotoxinas pode levar de várias semanas a meses, enquanto que as neurotoxinas são facilmente degradadas pelos microorganismos, convertendo-as em produtos não tóxicos. A degradação total das microcistinas em ambientes aquáticos irá depender da sua concentração inicial, dos microorganismos presentes, da temperatura da água, do pH e das disponibilidades de outras fontes de carbono orgânico (Jones & Orr.,1994).

De acordo com o "Guidelines for Canadian Drinking Water Quality-Supporting Documentation" (órgão responsável pelo controle de águas no Canadá), a concentração máxima permitida de peptídeos tóxicos nas águas de abastecimento público é de 1µg/L, e nas águas utilizadas para recreação o número máximo de cianofíceas é de 20.000 células/mL (Falconer *et al.*,1994)

Ainda não há um tratamento adequado para aplicar nas pessoas intoxicadas com as hepatotoxinas produzidas pelas cianofíceas. Alguns antibióticos têm sido utilizados experimentalmente em camundongos, na prevenção da ação das microcistinas no fígado. Podemos citar a ciclosporina-A, rifamicina e silimarina. Esses antagonistas têm se mostrado eficazes quando administrados antes ou ao longo do contato com a toxina (Yoo *et al.*, 1995). A ciclosporina-A bloqueia a toxicidade das microcistinas nos hepatócitos, oferecendo completa proteção à dose letal, quando administrada 24 horas antes do contato com as microcistinas (Hermansky *et al.*,1990; Stoner *et al.*,1990).

1.6 - Fatores Ambientais que Influenciam a Produção de Toxina :

As cianofíceas são freqüentes em ambientes aquáticos eutrofizados, principalmente os ricos em fontes de nitrogênio e fósforo. O crescente aumento do processo de eutrofização nos rios, lagos, reservatórios e no mar, devido às grandes descargas de esgotos domésticos, resíduos de fábricas e embarcações, vem ocasionando um crescimento intensificado de cianofíceas em todo o mundo (Yoo *et al.*, 1995; Lindholm *et al.*, 1992).

As cianofíceas, principalmente dos gêneros *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Anabaena*, quando apresentam um crescimento intenso, podem formar "blooms" ou "scuns". Os "blooms" ocorrem quando o excesso de nutrientes propiciados pelas condições já mencionadas, convergem com outros fatores como alta intensidade luminosa, temperatura de 15 a 30°C, ventos calmos e pH de 6 a 9 (Carmichael, 1994; Utkilen & Gjølme., 1992), formando na superfície do corpo d'água uma intensa camada de células que podem atingir a espessura de até 75 centímetros. Nos "scuns" há um intenso crescimento de microalgas que ficam dispersas na coluna d'água. Os "blooms" ou "scuns" são formados pela predominância de uma determinada espécie, esta pode apresentar cepas tóxicas e não tóxicas. Além disso, podem ter uma aparência desagradável, exalar forte odor e comprometerem os usos potenciais do corpo d'água (Carmichael, 1992, 1994; Azevedo *et al.*, 1994).

As toxinas contidas nas células são liberadas somente quando ocorre a lise celular ou mudanças na permeabilidade da membrana celular (Lukac & Aegerter., 1993)

Os fatores que determinam a toxicidade de um "blooms" ou "scuns" ainda não estão esclarecidos, mas já se sabe que a disponibilidade de nutrientes, intensidade luminosa, pH, temperatura e a morfometria do corpo d'água podem influenciar na predominância de cepas tóxicas. Sabe-se, entretanto, que as condições favoráveis para um ótimo de crescimento celular não são necessariamente as mesmas que determinam uma alta produção de toxinas (Carmichael, 1986, 1992).

A temperatura é conhecida como um dos fatores que afetam a produção de toxinas. Altas temperaturas de 32 a 36°C promovem uma alta taxa de crescimento e uma redução de até 4 vezes a produção de hepatotoxina pela espécie *Microcystis aeruginosa*, quando comparadas com as células mantidas em temperatura de 28°C (Robarts & Zohary, 1987). Esses dados concordam com os resultados de Sivonen (1994) que verificou uma atenuação

na produção das neurotoxinas e hepatotoxinas produzidas pelas espécies *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Anabaena* e *Aphanizomenon*, quando cultivadas em temperaturas mais baixas.

Utkilen & Gjølme (1992) verificaram que a produção de hepatotoxina pela espécie *Microcystis aeruginosa*, em condições de cultivo, aumentava com a intensidade luminosa e observaram uma diminuição na produção de toxina a partir de $40 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Molica (1996) também observou em seus experimentos uma diminuição na produção de microcistina, com a alteração de intensidade luminosa de 40 para $180 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

As altas intensidades luminosas e temperatura também podem afetar a capacidade das células para a produção de vacúolos gasosos, dificultando assim a flutuabilidade das células (Yoo *et al.*, 1995).

O efeito do pH na produção de toxina e crescimento celular de *Microcystis aeruginosa* foi observado por Ellof & Van Der Westhuizen (1981) e seus resultados mostraram que uma menor toxicidade foi obtida em pH 9,0, onde ocorreu um bom crescimento celular.

Entre os vários metais pesados testados, somente zinco e ferro mostraram afetar significativamente a produção de microcistinas pela espécie *M. aeruginosa*. Lukac & Aegerter (1993) verificaram que o zinco era necessário para o ótimo de crescimento celular e produção de toxina, enquanto que, a ausência de ferro estimulava de 20 a 40% a produção de toxina e inibia o crescimento celular. Esses autores levantaram a hipótese de que a produção de microcistina pode ser uma resposta a condição de estresse ambiental.

É sabido que a produção de toxina é afetada pela composição do meio de cultivo, por razões ainda não esclarecidas (Watanabe, 1996).

De acordo com Carmichael (1986), a toxicidade de uma cepa de *Anabaena flos-aquae* tornou-se mais fraca ou indetectável quando a espécie foi transferida do meio ASM-1 para o meio BG-11, que possui em sua composição 2,7 vezes mais nitrato que o meio ASM-1. A habilidade da cepa para produzir toxina foi restabelecida quando novamente cultivada em meio ASM-1.

Entretanto, segundo Sivonen (1990), o aumento da produção de hepatotoxinas por *Oscillatoria agardhii* se deu com o aumento da concentração de nitrogênio de 0,42 mg/L para 0,84 mg/L no meio de cultivo. Esses dados concordam com os de Watanabe & Oshi (1985) que reportaram uma diminuição da toxicidade da espécie *M. aeruginosa*, quando a concentração de nitrogênio no meio MA foi reduzida de 1/10 para 1/20 do nível

Cood & Poon (1988) verificaram esse mesmo comportamento no meio BG-11, quando foram reduzidas as concentrações de nitrogênio e carbono inorgânico do meio de cultivo.

Sivonen (1994) relatou que baixas concentrações de fósforo diminuíram a produção de hepatotoxinas, mas não alteraram a síntese das neurotoxinas.

Watanabe (1996) observou que quando nitrato era adicionado em uma cultura de *Nodularia*, onde a produção de toxina e a clorofila estavam diminuindo, o resultado foi um aumento para ambos.

As cepas tóxicas mantidas por muito tempo em meio rico em nutrientes podem perder ou diminuir a sua capacidade de produzir toxinas (Carmichael,1986). No Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas, UFRJ, também foi observado esse comportamento em algumas cepas: *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, *Microcystis* sp. (hepatotoxinas) e *Anabaena flos-aquae* (neurotoxina).

A razão N:P também é um importante fator que influencia a produção de toxinas. Sabe-se que as cianofíceas preferem ambientes aquáticos com a razão N:P menor que 29. Além disso, alguns estudos sugerem que os 'blooms' de cianofíceas estão associados com uma baixa taxa N:P (McQueen & Lean,1987).

As cianofíceas geralmente são os tipos de algas dominantes nos ecossistemas aquáticos e a ocorrência e dominância estão diretamente ligadas a baixa taxa N:P. A espécie dominante nem sempre é a espécie fixadora de nitrogênio. Isso pode indicar que algumas espécies são capazes de assimilar o nitrogênio orgânico, através do seu próprio metabolismo ou viver em sinergismo com as bactérias (Yoo *et al.*,1995).

Domingos *et al.*, (1994) verificaram que durante um crescimento intenso de cianofíceas na Lagoa da Barra, Maricá - RJ, a disponibilidade de nitrogênio na coluna d'água teve papel preponderante sobre a estrutura e o funcionamento da comunidade fitoplanctônica. As cianofíceas se mostraram dominantes quando as concentrações de nitrogênio no meio foram menores que 2-3 $\mu\text{mol/L}$.

Keating (1987) e Jones (1988) estudaram alguns produtos excretados em cultivo misto de algas e bactérias, e verificaram que esses produtos poderiam ter uma ação estimuladora, inibidora e/ou competitiva quanto ao crescimento, dependendo da sua concentração e das condições de cultivo. Os principais produtos excretados pelas algas são de baixo peso molecular: carboidratos, lipídeos, peptídeos, fosfatos orgânicos, substâncias voláteis, vitaminas, antibióticos e toxinas (Hama & Handa,1987; Jones,1988).

Guartier *et al.* (1978) observaram que a produção de antibiótico pelas espécies *Asterionella japonica* e *Chaetoceros lauderi* era estimulada na presença de luz. Essas espécies quando crescidas na presença do dinoflagelado *Prorocentrum micans*, apresentavam uma produção ainda maior de antibiótico, sugerindo que *P. micans* poderia estar excretando substâncias para o meio de cultivo, que induziriam uma maior produção de antibiótico.

São poucos os trabalhos que relatam a produção de toxina pelo gênero *Synechocystis*. Azevedo & Carmouze (1994) observaram um crescimento intenso de cianofíceas na Lagoa da Barra, com predominância da espécie *S. aquatilis* f. *salina*, provavelmente relacionada com uma mortandade de peixes filtradores da espécie *Brevortia tyrannus aurea* (savelha). Esses peixes apresentaram sinais evidentes de morte causada por hemorragia das vias respiratórias e digestivas o que levou a hipótese de intoxicação.

Na Florida (EUA), a espécie *Synechocystis* sp. era utilizada como um suprimento protéico na dieta alimentar para as aves e porcos. A dieta alimentar com 10 a 20% dessa alga para as aves ocasionou a mortandade de 100% destes animais. As aves com suprimento protéico de apenas 5% de algas apresentaram sintomas de paralisia. Todas as aves mortas exibiram severas lesões no fígado. Os porcos não mostraram sintomas cianotóxicos (Lincoln & Carmichael, 1989).

O presente trabalho originou-se de um estudo sobre a produção de hepatotoxinas pela espécie *Synechocystis aquatilis* forma *aquatilis*. No decorrer dos experimentos foi observado que os cultivos tóxicos estavam contaminados com a espécie *Monorraphyidium convolutum* (Chlorophyceae). Iniciou-se então um processo de reisolamento da cianofícea e, para nossa surpresa, resultou em cultivos unialgais de *S. aquatilis* f. *aquatilis* que não apresentavam toxicidade.

Em vista de tais fatos, foi levantada a hipótese de que, provavelmente, a produção de toxina pela cianofícea era influenciada ou estimulada pela presença de *Monorraphyidium convolutum* nas culturas, já que não há relatos na literatura de espécies de clorofíceas produtoras de toxinas.

2- OBJETIVOS

Para verificação da hipótese levantada, o presente trabalho teve como objetivo principal:

- Compreender melhor quais os possíveis fatores que poderiam estar estimulando a produção de hepatotoxinas pela espécie *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*;

E como objetivos secundários:

- Estudar o crescimento e variações fisiológicas da espécie *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (NPBS-3) sob condições unialgais em diferentes meios de cultivo, e verificar a produção de toxinas nas condições de cultivo unialgais.
- Estudar o crescimento da espécie *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo misto com *Monoraphidium convolutum* nos meios ASM-1 e Z-8, e verificar a produção de toxinas nos cultivos mistos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Condições de Cultivo:

As espécies *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (NPBS-2) (Cyanophyceae) e *Monoraphidium convolutum* (NPBS-3) (Chlorophyceae) estão sendo mantidas em culturas unialgais e mistas, no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas, no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, UFRJ, em condições não axênicas.

A espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* foi isolada a partir de amostras fitoplanctônicas da população natural da Baía de Sepetiba (Lat. 22° 50' 00''S, Long. 43° 50' 00''W), por arrastros horizontais com rede de 20 µm.

A espécie *M. convolutum* foi isolada a partir de uma contaminação nos cultivos iniciais de *S. aquatilis* f. *aquatilis*.

O cultivo misto consiste no crescimento simultâneo da espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* com *M. convolutum* em diferentes percentuais. Os diferentes percentuais de *M. convolutum* foram estabelecidos através da contagem do número de células.mL⁻¹ das duas espécies no final do cultivo.

Neste trabalho, essas espécies foram cultivadas utilizando-se como meios padrões o ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964 - citado em Gibson & Smith, 1982) e o Z-8 (Staub, 1961), sob intensidade luminosa de 55 µmol de fluxo de fótons m⁻².s⁻¹, sob temperatura de 25±2°C, pH 8,0, aeração contínua e fotoperíodo natural, obtido com uso de uma foto-célula colocada próximo a janela da sala de cultivo.

Foram realizados cultivos unialgais das duas espécies em meios modificados chamados por nós de "Especial" e "Reconstituído". Nesses meios, a composição química nutricional foi diferenciada do meio de cultivo padrão utilizado.

Todos os experimentos realizados, nas diferentes condições de cultivo, utilizaram triplicatas para cada condição testada.

3.1.1 - Cultivos Unialgais e Misto em meio ASM-1:

As espécies citadas acima foram cultivadas em condições unialgais e mista, em meio ASM-1 (Tabela 1).

Os cultivos mistos foram realizados a partir de uma contaminação no cultivo da espécie *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* com *Monoraphidium convolutum* (clorofícea)

Durante o cultivo das espécies foram analisados os seguintes parâmetros:

- contagem diária do número de células.mL⁻¹;
- determinação da concentração de clorofila *a*, de 3 em 3 dias;
- determinação da concentração de proteínas intracelulares e extracelulares, de 3 em 3 dias;
- determinação da concentração de carboidratos intracelulares e extracelulares, de 3 em 3 dias;
- verificação da concentração de hepatotoxinas no final do cultivo.

Tabela 1 - Composição do meio ASM-1 (mg.L⁻¹):

NaNO ₃	170,7
MgCl ₂ .6H ₂ O	40,9
MgSO ₄ .7H ₂ O	48,9
CaCl ₂ .2 H ₂ O	29,0
KH ₂ PO ₄	17,3
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	35,7
H ₃ BO ₃	2,47
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,38
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08
ZnCl ₂	0,32
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,08
CuCl ₂	0,014
EDTA.Na ₂	0,92
Água deionizada	1000 ml

3.1.2 - Cultivos Unialgais e Misto em meio Z-8:

As mesmas espécies foram cultivadas em meio Z-8 (Tabela 2), em culturas unialgais e mista. Durante os cultivos das espécies foram determinados os seguintes parâmetros:

- contagem do número de células.mL⁻¹, de 3 em 3 dias;
- determinação da concentração de clorofila a, de 3 em 3 dias;
- verificação da concentração de hepatotoxinas no final do cultivo.

Tabela 2 - Composição do meio Z-8 (mg.L⁻¹):

NaNO ₃	466,9
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	59,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,97
K ₂ HPO ₄	24,0
Na ₂ CO ₃	21,10
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,80
EDTA-Na ₂	3,70
NaNO ₄ .2H ₂ O	0,27
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .2H ₂ O	0,87
KBr	1,19
KI	0,83
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,80
Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,26
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,45
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,24
NiSO ₄ (NH ₄)SO ₄ .6H ₂ O	1,88
Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,40
V ₂ O ₅	0,11
Al ₂ (SO ₄) ₃ .9H ₂ O	2,52
H ₃ BO ₃	31,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,2
Água deionizada	1000 mL

3.1.3 - Cultivos em meio "ASM-1 Especial":

Cultivo de *M. convolutum* foi realizado com 1500 mL de meio ASM-1, durante 25 dias. Esse cultivo teve suas células separadas do meio por centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtro de borosilicato (Millipore AP-20 - 47mm) e acetato celulose (Millipore - 25mm, poro de 0,65 µm) em condições assépticas, sendo então utilizado para o preparo de um novo meio ASM-1, chamado por nós de meio "ASM-1 Especial".

Nesse novo meio foi inoculada e cultivada a espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis*.

O mesmo procedimento foi realizado a partir de cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em meio ASM-1. Esse cultivo após 25 dias teve suas células separadas por centrifugação e o sobrenadante tratado da mesma forma descrita acima, sendo então utilizado para o crescimento da espécie *M. convolutum*.

Durante o crescimento das espécies no meio "ASM-1 Especial" foram analisados os seguintes parâmetros:

- contagem do número de células.mL⁻¹, de 2 em 2 dias;
- verificação da concentração de hepatotoxinas no final do cultivo.

3.1.4 - Cultivos em meio "Z-8 Especial":

As espécies *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* foram cultivadas, seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.1.3, utilizando-se o meio de cultivo Z-8.

Durante esses cultivos foram analisados os mesmos parâmetros citados no item 3.1.3.

3.1.5 - Cultivos em meio "ASM-1 Reconstituído":

Foram realizados cultivos de *M. convolutum*, em triplicatas, utilizando-se 8 litros de meio ASM-1 para cada cultura. Durante o 7^o, 14^o e 21^o dia de cultivo foram retirados 1500 mL, sendo as células separadas do meio de cultivo por centrifugação. O sobrenadante foi filtrado em filtros de borosilicato e acetato de celulose, sob condições assépticas, como descrito no item 3.1.3. Esse filtrado foi utilizado para o preparo de um novo meio ASM-1, chamado por nós de "ASM-1 Reconstituído".

Para tanto, analisou-se previamente as concentrações de nitrato e ortofosfato ainda presentes nos filtrados, seguindo a metodologia de Mackareth *et al.* (1978).

As concentrações determinadas para ortofosfato e nitrato (μmol) com 7, 14 e 21 dias foram:

	ortofosfato	nitrato
7 dias	60,15	730,65
14 dias	63,29	947,15
21 dias	57,42	1.288,61

A partir dos resultados dessas análises, houve uma complementação desses nutrientes, de acordo com a concentração original do meio ASM-1 (nitrato - 2000 μmol e ortofosfato - 200 μmol). Os demais nutrientes foram acrescentados na concentração original do meio ASM-1. Neste meio "ASM-1 Reconstituído" foi inoculada e cultivada a espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis*.

Durante os cultivos foram analisados os mesmos parâmetros citados em 1.1.

3.1.6 - Cultivos com meio "ASM-1 Modificado":

Foram realizados cultivos unialgais e misto com as espécies citadas, utilizando-se o meio "ASM-1/2", que corresponde a concentração de nutrientes original do meio reduzida a metade. A outra variação do meio de cultivo foi ASM-1 com as concentrações de nitrato e fosfato reduzidas a metade, o "ASM-1 com NP/2".

Nestas condições, as culturas não foram analisadas para nenhum parâmetro de crescimento. Após 20 dias de cultivo, as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação, liofilizadas e testadas quanto a sua toxicidade.

Todas as condições de cultivo estão resumidas na Tabela 3.

3.2 - Parâmetros fisiológicos analisados durante os cultivos:

3.2.1 - Contagem de células para determinação da taxa de crescimento, tempo médio de duplicação e razão máxima de crescimento:

A contagem do número de células.mL⁻¹ foi realizada em microscópio ótico, utilizando Hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal. A taxa de crescimento relativo (μ) e tempo médio de duplicação (G) foram calculadas segundo as equações descritas em Fogg & Thake (1987),

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

onde:

μ = Taxa de crescimento (velocidade específica de crescimento),

N_2 e N_1 = Números de células.mL⁻¹ nos tempos t_2 e t_1 .

A partir de μ podemos calcular o tempo médio de duplicação (G),

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

Determinamos a razão máxima de crescimento (R) das culturas, que corresponde ao número máximo de células.mL⁻¹ atingido durante a curva de crescimento dividido pelo número de células.mL⁻¹ do inóculo.

$$R = R_1 / R_0$$

onde:

R_1 = Número máximo de células.mL⁻¹

R_0 = Número inicial de células.mL⁻¹.

3.2.2 - Concentração de clorofila a:

As variações das concentrações de clorofila a foram determinadas após a filtração de um volume conhecido da amostra em filtro de borosilicato (AP-20 Millipore - 13mm). A este filtro foram adicionados 5 mL de metanol 100 % e, após a agitação em vortex, a suspensão foi incubada durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada a 1600g por 10 minutos, em centrífuga Fanen modelo 206-R.

O sobrenadante foi retirado e a detecção da clorofila a foi determinada por espectrofotometria a 665 nm (Shimadzu, modelo UV - 1601). Para o cálculo da concentração de clorofila a, utilizou-se o coeficiente de extinção determinado por Mackinney (1941).

3.2.3 - Concentração de proteínas intra e extracelulares:

De acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976), as análises para a determinação das proteínas intracelulares foram iniciadas filtrando-se um volume conhecido da amostra em filtros de borosilicato (Millipore AP-20 - 13mm). A estes filtros foi adicionado 1 mL de NaOH 1M, promovendo uma digestão alcalina. Os filtros foram então incubados por 15 minutos em banho-maria a 100°C. Posteriormente, neutralizou-se as amostras com 1 mL de HCl 1M, centrifugou-se e retirou-se 1 mL das amostras, ao qual foi adicionado um volume igual do reagente Coomassie-blue.

A determinação das proteínas extracelulares foi realizada utilizando-se 1 mL do filtrado de cada amostra. Ao filtrado foi adicionado um volume igual do reagente de Coomassie-blue.

A absorbância foi determinada a 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV -1601). O cálculo das concentrações das proteínas intra e extracelulares foi feito utilizando-se uma curva de soro albumina bovina como padrão.

3.2.4 - Concentração de carboidratos intra e extracelulares:

As análises de carboidratos foram realizadas seguindo a adaptação do método de Dubois (1956) para amostras fitoplanctônicas, proposta por Myklestad & Haug (1972).

A extração dos carboidratos intracelulares se deu após a filtração de um volume conhecido da amostra, em filtro de borosilicato (Millipore AP-20 - 13mm). Ao filtro foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 80 %. Essa mistura foi mantida por 24 horas à temperatura ambiente, sendo a reação interrompida com a adição de 6 mL de água deionizada, em banho de gelo. A amostra foi então centrifugada e retirou-se 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 0,5 mL de fenol 5% e posteriormente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O frasco contendo o extrato permaneceu esfriando em água, à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

A determinação dos carboidratos extracelulares foi realizada utilizando-se 1 mL do filtrado de cada amostra. Ao filtrado foi adicionado 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, deixando essa solução esfriar, à temperatura ambiente, por 30 minutos.

A absorbância foi determinada a 485 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV - 1601). O cálculo das concentrações de carboidratos intra e extracelulares foi realizado utilizando-se uma curva padrão de glicose.

3.3 - Análise de Toxicidade:

A verificação da concentração de hepatotoxinas foi realizada utilizando-se pelo menos um dos três métodos de detecção: bioensaios, imunoenaios ou HPLC. Esses três métodos diferem quanto ao nível de detecção, e a escolha do método foi em função da disponibilidade de biomassa para análise e/ou nível de sensibilidade desejado.

3.3.1 - Bioensaios:

Em todos os cultivos testados quanto a toxicidade, as células se encontravam na fase estacionária de crescimento.

Os testes de toxicidade foram realizados através de bioensaios com camundongos Swiss (peso corpóreo variando de 19 a 25 gramas) por injeções intraperitoniais (i.p.) do material celular liofilizado ressuspense em solução de cloreto de sódio 0,9 %.

Foram realizadas inoculações em volumes decrescentes do material celular liofilizado, até a não ocorrência da morte, chegando-se a concentração letal mínima (CL_{min.}), confirmada com a inoculação em pelo menos 3 animais.

Todos os sintomas foram observados e o peso do fígado de cada animal morto foi verificado logo após a morte.

3.3.2 - Imunoensaios:

Essa parte do trabalho foi realizada com a colaboração do Laboratório do Prof. Wayne W. Carmichael da Wright State University, Dayton, Ohio, EUA

Células liofilizadas de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e de *M. convolutum*, em condições de cultivo unialgais e mista, foram testadas para a verificação da produção de microcistinas por imunoensaios, realizados com anticorpos policlonais para microcistina-LR, através da técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), descrita para detecção de microcistinas por Chu *et al.* (1989).

3.3.3 - Extração e Purificação das Hepatotoxinas:

A extração das toxinas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Krishnamurthy *et al.* (1986), onde o material celular liofilizado sofreu extração com uma solução de butanol/metanol/água (20:5:75 v/v), durante 1 hora, com agitação em temperatura ambiente.

Esta suspensão foi centrifugada por 30 minutos, em uma centrífuga Fanen, modelo FR 22 a 3500g, recolhendo-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com o precipitado.

Os sobrenadantes obtidos foram reunidos e evaporados até a redução a 1/3 do seu volume inicial. Este extrato foi passado em um cartucho de octadesilsilano (C-18), sendo o material retido eluído com 30 mL de água deionizada, metanol 20 % e metanol 100 %, respectivamente.

A fração de MetOH 100 % foi evaporada a secura e ressolubilizada em água deionizada; este volume foi determinado de acordo com o peso de células liofilizadas utilizadas para iniciar a extração. Essa solução foi então filtrada em filtro de nylon (diâmetro de 13 mm, poro de 0,45 μm , Millipore) e purificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em um aparelho Shimadzu com detector U.V./Vis. SPD-10A, bombas LC-10AS e integrador CR6A. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, sendo utilizada uma coluna semi-preparativa (Supercosil LC-18, 5 μm , 25cm \times 10 mm), com fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 3 mL.min⁻¹ e absorção a 238 nm.

Cada um dos picos obtidos na separação semi-preparativa foi evaporado a secura e ressuspenso em 1 mL de água deionizada. Esta suspensão foi filtrada em filtros de nylon e então realizada uma nova purificação em uma coluna analítica (Lickrospher 100 RP-18, 125mm \times 4 mm), utilizando-se a mesma fase móvel da condição anterior, com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

O espectro de absorção de cada pico foi analisado numa faixa de 195 a 300nm, com auxílio de um fotodetector de diodo (detector SPD-M10A - Diode array (PDA), bombas LC-10AD), podendo-se, portanto, verificar se o pico apresentava um espectro de absorção semelhante ao padrão de microcistina-LR.

Todas as análises obtidas no processo de extração e purificação de toxinas foram padronizadas de modo a expressar dados quantitativos.

3.4 - Testes Estatísticos:

- Análise de variância e comparação de médias:

O tratamento estatístico das taxa de crescimento nas diferentes condições de cultivo foi realizado através de análise de variância e posterior comparação de médias (Teste de Tukey), adotando-se um nível de significância de 5%. Essas análises foram realizadas através do pacote estatístico Statistic 4.0 (Siegel, 1985).

Tabela 3 - Resumo das condições de cultivo das espécies *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em cultivos unialgais e mistos. Para maiores detalhes, vide texto.

MEIOS DE CULTIVOS	COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL	PARÂMETROS ANALISADOS
ASM-1 *	Tabela 1	- número de células.mL ⁻¹ ; - clorofila <i>a</i> ; - proteínas; - carboidratos; - toxicidade.
ASM-1 Especial	Meio ASM-1 com matéria orgânica excretada pelo cultivo prévio da cianofícea ou da clorofícea. Foram adicionados todos os nutrientes do meio ASM-1.	- número de células; - toxicidade.
ASM-1 Reconstituído *	Meio ASM-1 com matéria orgânica excretada pelo cultivo prévio da cianofícea ou da clorofícea. As concentrações de nitrato e ortofosfato foram complementadas de modo que as concentrações desses nutrientes fossem iguais ao do meio ASM-1	- número de células.mL ⁻¹ ; - clorofila <i>a</i> ; - proteínas; - carboidratos; - toxicidade.
ASM-1 Modificado*	ASM-1/2 ASM-1 com NP/2	- toxicidade.
Z-8 *	Tabela 2	- número de células; - toxicidade.
Z-8 Especial *	Preparado igual ao meio ASM-1 Especial, utilizando o meio padrão Z-8.	- número de células; - toxicidade.

* - cultivos realizados em triplicatas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 - Crescimento da espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis*:

Todos os dados estão apresentados como a média das três culturas realizadas para cada condição experimental, exceto para as culturas crescidas no meio "ASM-1 Especial", onde foi analisada uma amostra para cada condição experimental.

As curvas de crescimento das espécies *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* mantidas em cultivos unialgais e mistos nas diferentes condições de cultivo se encontram nas figuras 4, 5 e 6. Os valores das médias do número de células.mL⁻¹ e o desvio padrão se encontram nas tabelas de 1 a 13 do anexo. Na tabela 4 estão apresentados os valores obtidos para as taxas de crescimento (μ), tempo de geração (G) e razão máxima de crescimento (R).

Os cultivos unialgais realizados nos meios ASM-1 e Z-8 mostraram que a espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* apresentou um aumento significativo da taxa de crescimento relativo (μ) no meio Z-8 e conseqüentemente um menor tempo de duplicação (G) (Tabela 4 e 37-anexo).

A composição nutricional do meio Z-8 é mais complexa, sendo rica em fontes de nitrogênio e micronutrientes, o que pode ter sido um dos fatores que estimularam a melhor taxa de crescimento da espécie.

Os cultivos realizados nos meios "ASM-1 Especial" e "ASM-1 Reconstituído" (Figura 4 e 5, Tabela 4), apresentaram valores próximos em suas taxas de crescimento (μ), demonstrando que não houve influência da complementação de nutrientes inorgânicos no meio. Entretanto, pode-se verificar que a cultura "ASM-1 Especial" mostrou uma maior razão máxima de crescimento. Tal aumento do número de células pode ter sido ocasionado por uma maior disponibilidade de nitrogênio e fósforo no meio "ASM-1 Especial", uma vez que nessa condição houve uma complementação total dos nutrientes utilizados no meio ASM-1, sem se considerar as concentrações de nitrogênio e fósforo ainda presentes no meio. Desta forma, uma maior concentração de nitrogênio e fósforo no meio "ASM-1 Especial" teria permitido às células manterem sua taxa de duplicação por um maior período e, conseqüentemente, obteve-se uma maior razão de crescimento.

No meio "ASM-1 Reconstituído", o maior tempo de cultivo prévio de *M. convolutum* parece não ter influenciado o aumento da taxa de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis*, uma vez que as culturas com 7, 14 e 21 dias não apresentam uma variação significativa em nenhuma das três condições de cultivo testadas (Tabela 37 do anexo).

A taxa de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis* no meio ASM-1 foi inferior às obtidas nos meios "ASM-1 Especial" e "ASM-1 Reconstituído", indicando que a presença da matéria orgânica excretada nos meios de cultivos, dada pelo crescimento prévio de *M. convolutum*, estimulou a obtenção de maiores valores na taxa de crescimento (Tabela 4). Para essas condições, a análise estatística (Tabela 37 do anexo) revelou que ocorreu uma variação significativa entre os resultados do meio ASM-1 e os do meio "ASM-1 Reconstituído".

Os dados da taxa de crescimento referentes aos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* no meio "ASM-1 Especial" não foram analisados estatisticamente, pois para esses cultivos não temos resultados em réplicas.

O cultivo das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em meio "Z-8 Especial" apresentou taxa de crescimento menor que as obtidas para os meios Z-8, "ASM-1 Especial" e "ASM-1 Reconstituído" (Tabela 4). Para esta condição de cultivo, observamos que o complemento nutricional acrescido da matéria orgânica excretada pelo *M. convolutum* não favoreceram a obtenção de uma maior taxa de crescimento.

A razão máxima de crescimento para as células em meio "Z-8 Especial" foi quase 3 vezes menor que a determinada no meio Z-8. Portanto, pode-se dizer que nesta condição de cultivo o complemento nutricional e/ou matéria orgânica excretada pelo *M. convolutum* no meio de cultivo inibiu significativamente a taxa de crescimento (Tabela 37-anexo) e a razão máxima de crescimento. Esses resultados podem ter sido influenciados pela composição nutricional do meio de cultivo. Tilman *et al.* (1982 - citado em Smith, 1983) relataram que tanto as cianofíceas fixadoras como as não fixadoras de nitrogênio são predominantes em lagos com baixa razão N:P, não observando a dominância desse grupo de algas em meios aquáticos com alta taxa N:P. O meio Z-8 tem uma razão N:P igual a 30, valor três vezes superior ao utilizado para o meio ASM-1. Outra hipótese seria uma variação qualitativa da matéria orgânica excretada neste meio de cultivo.

Verificamos que no cultivo misto em meio ASM-1, a cianofícea apresentou uma taxa de crescimento maior que a determinada para o cultivo unialgal (Tabela 40). A razão máxima de crescimento no cultivo misto em ASM-1 foi somente menor ao valor determinado no cultivo unialgal no meio Z-8. Assim, o número máximo de divisões celulares durante o cultivo misto, em ASM-1, foi 6 vezes maior que o resultado para a condição unialgal, nesse meio de cultivo.

Esses resultados sugerem que no meio ASM-1 a presença de matéria orgânica excretada pelo *M. convolutum*, influenciou positivamente o crescimento da cianofíceia. Tal fato não foi verificado nos cultivos mistos em Z-8, onde a taxa de crescimento foi 2 vezes menor que o valor obtido para as células mantidas em cultivos unialgais.

Entretanto, não se pode desconsiderar que o diferente percentual de *M. convolutum* nas condições de cultivo misto pode também justificar total ou parcialmente as diferenças observadas.

Os valores obtidos com a análise estatística das taxas de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo misto (Figura 39-anexo), demonstraram que ocorreu uma diferença significativa nos resultados do meio ASM-1 e Z-8.

4.2 - Crescimento da espécie *M. convolutum*:

A espécie *M. convolutum* mantida em condições unialgais, nos meios ASM-1 e Z-8 (Figura 4-b), apresentou valores significativamente iguais para as taxas de crescimento (Tabela 4 e 38-anexo). Porém, a razão máxima de crescimento foi praticamente duplicada nos cultivos em meio Z-8.

Nos cultivos realizados em meio "ASM-1 Especial" e "Z-8 Especial" (Figuras 4-b), também foram observados valores próximos de suas taxas de crescimento. Entretanto esses resultados foram inferiores aos obtidos nos meios ASM-1 e Z-8.

A matéria orgânica excretada pelo cultivo prévio de *S. aquatilis* f. *aquatilis* no meio "Z-8 Especial" parece ter tido um efeito inibidor sobre o crescimento de *M. convolutum*.

Para os cultivos mistos, foi observado que, nos dois meios de cultivo, as taxas de crescimento de *M. convolutum* também foram inibidas com a presença das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* ou dos seus produtos excretados (Tabela 4).

Os resultados da análise estatística demonstraram que as taxas de crescimento de *M. convolutum* foram inibidas nos meios com matéria orgânica excretada ("Z-8 Especial") e nos cultivos mistos nos meios ASM-1 e Z-8 (Tabela 38, 39 e 40 do anexo).

Tabela 4 - Valores da taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação em dias (G) e a razão máxima de crescimento para as culturas de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* mantidas em condições uniaxiais e mistas, nos meios ASM-1, Z-8, "ASM-1 Especial", "Z-8 Especial" e "ASM-1 Reconstituído".

Condição de Cultivo	Meios de Cultivo	<i>Synechocystis aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>			<i>Monoraphidium convolutum</i>		
		Taxa de Crescimento (μ)	Tempo de Duplicação(dias) (G)	Razão máxima de crescimento (R)	Taxa de Crescimento (μ)	Tempo de Duplicação (dias) (G)	Razão máxima de crescimento (R)
Cultivos	ASM-1	0,28	2,38	13,27	0,40	1,68	25,92
	Z-8	0,54	1,31	94,77	0,38	1,77	41,78
	"ASM-1 Especial"	0,45	1,53	41,15	0,31	2,17	27,41
Uniaxiais	"Z-8 Especial"	0,36	1,93	28,50	0,29	2,32	16,24
	"ASM-1 Reconst." 07 dias	0,43	1,48	27,26	-	-	-
	14 dias	0,44	1,58	28,70	-	-	-
Cultivos	21 dias	0,46	1,57	34,60	-	-	-
	ASM-1 (*)	0,38	1,78	81,91	0,26	2,61	21,20
Mistos	Z-8 (**)	0,22	3,08	17,82	0,29	2,34	19,00

Obs: (-) não foram realizados experimentos nessas condições.

(*) percentual final de *M. convolutum* igual a 20%.

(**) percentual final de *M. convolutum* igual a 50%.

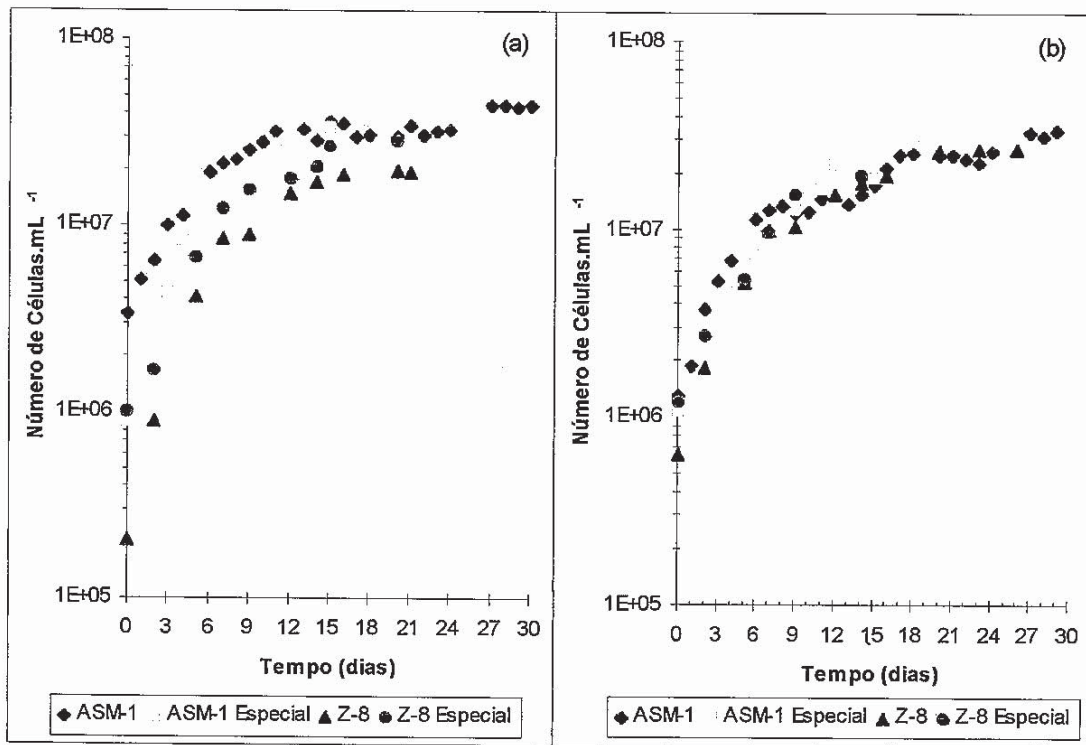


Figura 4 - Curvas de crescimento de (a) *S. aquatilis f. aquatilis* e (b) *M. convolutum* cultivadas em condições unialgais nos meios ASM-1, "ASM-1 Especial", Z-8 e "Z-8 Especial".

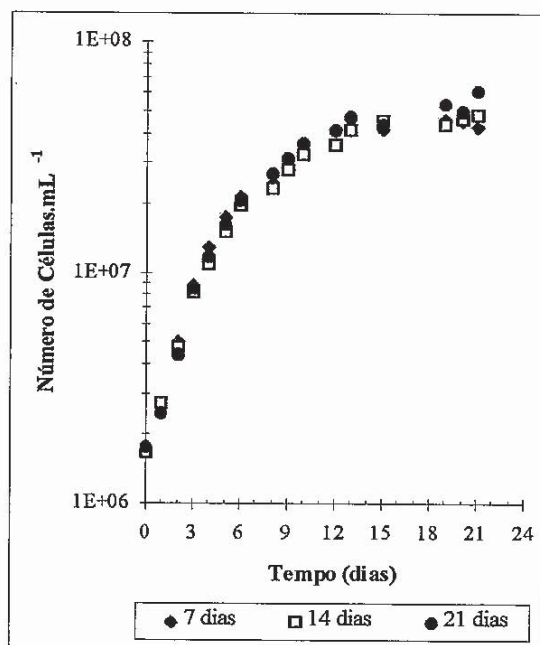


Figura 5 - Curvas de crescimento de *S. aquatilis f. aquatilis* crescidas em condições unialgais no meio "ASM-1 Reconstituído" (7, 14 e 21 dias).

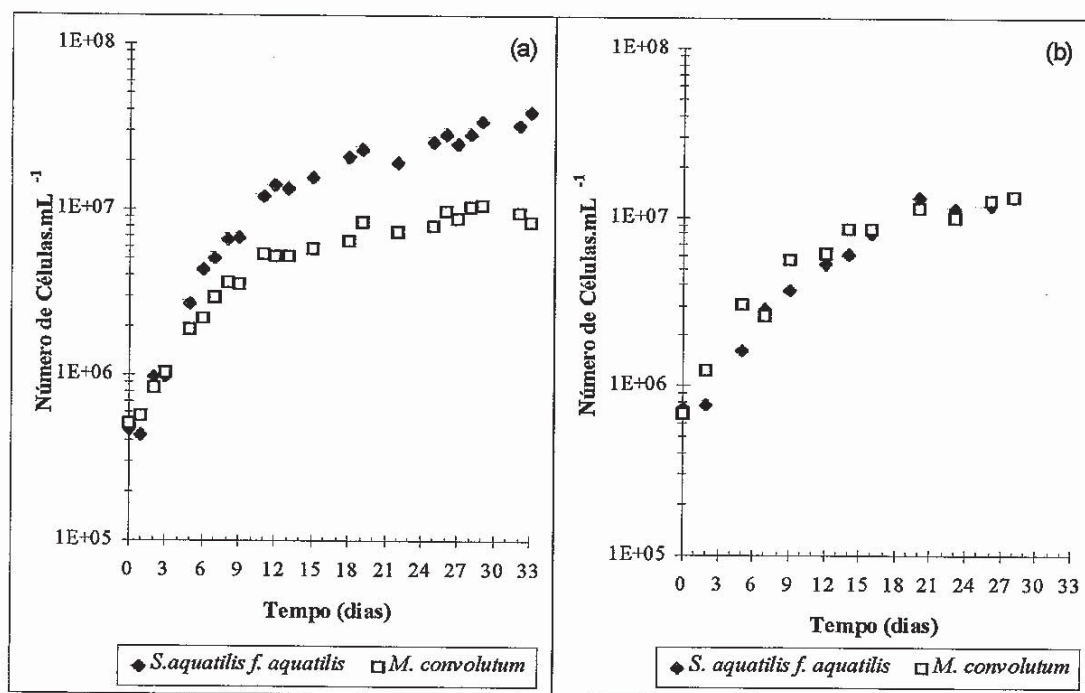


Figura 6 - Curvas de crescimento de *S. aquatilis f. aquatilis* e *M. convolutum* crescidas em cultivo misto nos meios (a) ASM-1 e (b) Z-8.

4.3 - Concentração de Carboidratos Intra e Extracelulares:

Os valores das concentrações de carboidratos intracelulares e extracelulares das espécies *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* e *Monorraphyidium convolutum*, suas médias e desvio padrão estão apresentados nas tabelas 14 a 21-anexo.

Nos experimentos com a espécie *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*, crescida em condições unialgais nos meios ASM-1 e "ASM-1 Reconstituído" (Figura 7), as concentrações de carboidratos intracelulares foram inicialmente maiores no primeiro dia de cultivo, ocorrendo uma diminuição com o início da fase exponencial de crescimento.

As concentrações de carboidratos intracelulares passaram a aumentar consideravelmente no final do cultivo das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis*. Esses dados concordam com os das curvas de crescimento da espécie, indicando que as células se encontram na fase estacionária, na qual é comum observar-se um acúmulo de carboidratos intracelulares devido à diminuição da divisão celular e conseqüente baixa atividade metabólica. À medida que os nutrientes do meio de cultivo vão sendo consumidos, principalmente o nitrogênio, as células entram na fase estacionária de crescimento, que é caracterizada pelo aumento na produção de compostos de reserva, como os carboidratos (Kromkamp, 1987).

Os maiores valores de carboidratos excretados foram observados nos primeiros dias de cultivo, para todas as condições testadas. Provavelmente, as células do inóculo se encontravam em meio com limitações de nutrientes, propiciando uma situação de estresse nutricional. De acordo com Moore & Tischer (1964 - citados em Borowitzka, 1988), o valor máximo de polissacarídeos excretados pelas cianofíceas é de 28% da produção total. Entretanto, fatores ambientais como exaustão de nutrientes e outros fatores que mantêm a alga sob condição de estresse, podem estimular o aumento dessa taxa.

Podemos verificar que no meio ASM-1 (Figura 7-a e 7-b), as variações das concentrações de carboidratos intra e extracelulares apresentaram uma tendência análoga às determinadas no meio "ASM-1 Reconstituído" (Figura 7-c e 7-d) e no cultivo misto (Figura 9). Entretanto, um maior acúmulo de carboidratos intracelulares foi verificado nas células cultivadas em "ASM-1 Reconstituído" por 7 dias (Figura 7-c), em relação as demais culturas do meio reconstituído.

Nos cultivos mistos (Figura 9), as concentrações de carboidratos intracelulares foram maiores, ocorrendo um maior acúmulo de carboidratos intracelulares durante todas as fases de crescimento.

Comparando as concentrações de carboidratos intracelulares nas três condições experimentais, podemos verificar que no cultivo misto a concentração final de carboidratos intracelulares foi 5 vezes maior que os valores obtidos nos cultivos unialgais nos meios ASM-1 e "ASM-1 Reconstituído". A matéria orgânica excretada presente no meio "ASM-1 Reconstituído" parece não ter causado grandes variações nessas concentrações, se analisarmos esse resultado com os do meio ASM-1.

As altas concentrações de carboidratos intracelulares, no cultivo misto, podem estar relacionadas à presença de *M. convolutum* no cultivo. Esta condição estaria estimulando o acúmulo de carboidratos intracelulares, devido a condição de estresse propiciado pela competição por nutrientes.

As maiores concentrações de carboidratos extracelulares seriam uma consequência da excreção de carboidratos para o meio, determinada pelo maior acúmulo interno desses compostos.

O conteúdo de carboidratos intracelulares (Figura 7-a) determinado para a espécie *M. convolutum*, cultivada em meio ASM-1, mostrou que essa espécie acumula menos carboidratos que a *S. aquatilis* f. *aquatilis*.

Verificou-se uma alta concentração de carboidratos extracelulares nas células de *M. convolutum* crescidas em meio ASM-1 (Figura 7-b) no primeiro dia de cultivo. Essa alta concentração pode ser vista como um reflexo da condição nutricional do inóculo, sendo possível verificar uma diminuição nas concentrações de carboidratos extracelulares a partir do 3º dia de cultivo.

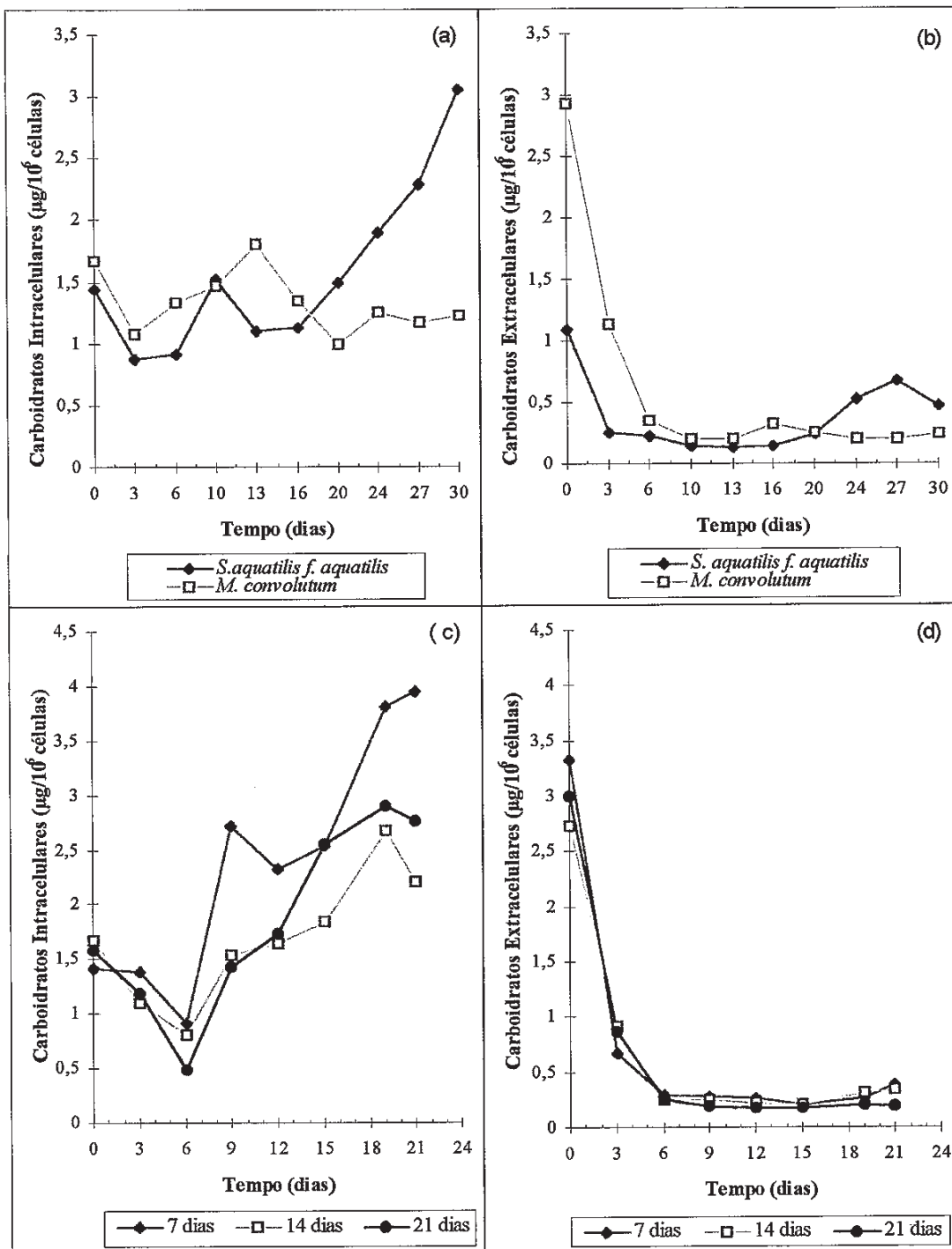


Figura 7 - Variação das concentrações de carboidratos intracelulares e extracelulares: (a) e (b) de *S. aquatilis f. aquatilis* e *M. convolutum* crescidas em condições unialgais no meio ASM-1, e (c) e (d) de *S. aquatilis f. aquatilis* mantida em meio "ASM-1 Reconstituído" (7,14 e 21 dias).

4.4 - Concentração de Proteínas Intra e Extracelulares:

Os valores das concentrações de proteínas intracelulares e extracelulares de *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* e *Monorraphyidium convolutum*, suas médias e desvio padrão estão apresentados nas tabelas 22 a 29-anexo.

Durante o crescimento das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* no meio ASM-1 (Figura 8-a) ocorreu um aumento gradativo nas concentrações de proteínas intracelulares. No entanto, durante a fase estacionária de crescimento foi possível verificar do 16º dia ao 24º dia de cultivo um aumento na concentração de proteínas intracelulares. Tal fato deve ser devido a um aumento da síntese de ficobiliproteínas como resposta a um processo de auto-sombreamento.

A fase exponencial de crescimento é caracterizada, em várias espécies de algas, por um aumento do conteúdo protéico de até 70 % do seu peso seco, alto conteúdo de clorofila, baixas concentrações de carboidratos e alta atividade fotossintética e respiratória (Fogg & Thake, 1987).

As Figuras 7, 8 e 9-b mostram que durante a fase exponencial de crescimento (Figuras 1 e 2), houve uma diminuição nas concentrações de carboidratos e aumento de proteínas, indicando que nesta fase do crescimento ocorreu a síntese de novos produtos intracelulares, que favorecem o crescimento celular.

Com a limitação de nitrogênio, a síntese protéica é alterada para a via de compostos de reserva não nitrogenados (Myklestad & Haug, 1972).

Variações do conteúdo de proteínas intracelulares nas cianofíceas podem ocorrer devido a diferenças nas concentrações de ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas fazem parte dos pigmentos acessórios e têm como função absorver os fótons e transmitir energia absorvida ao fotossistema II. Devido a sua composição protéica, agem também como uma fonte de reserva nitrogenada (Boussiba & Richamond, 1980; Kana *et al.*, 1992).

A degradação das ficobiliproteínas é vista como uma maneira de redistribuir o nitrogênio celular, deslocando os pigmentos que captam luz para a síntese de novas proteínas. Essas são utilizadas para a síntese de compostos que permitam a divisão celular.

A variação do conteúdo de proteínas intracelulares para as três condições de cultivo (Figura 8 e 9-b) foi bastante similar. O mesmo não foi verificado para as concentrações de proteínas extracelulares. Nos cultivos mistos, pode-se determinar um aumento na concentração de proteínas extracelulares, a partir do 6º dia de cultivo. Acreditamos que o

aumento na taxa de excreção de proteínas pode ter sido ocasionado pela presença das duas espécies no cultivo, pois como demonstrado na Figura 7 e 8, as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* apresentam valores reduzidos para a concentração de proteínas e carboidratos excretados em cultivos unialgais.

As concentrações de proteínas intracelulares observadas nos cultivos unialgais de *M. convolutum* (Figura 8-a) foram menores que as concentrações apresentadas pela cianofícea, no entanto, a curva apresentada mostra a mesma tendência exibida por *S. aquatilis* f. *aquatilis*. Os resultados das análises de proteínas extracelulares revelaram baixas excreções durante todo o cultivo.

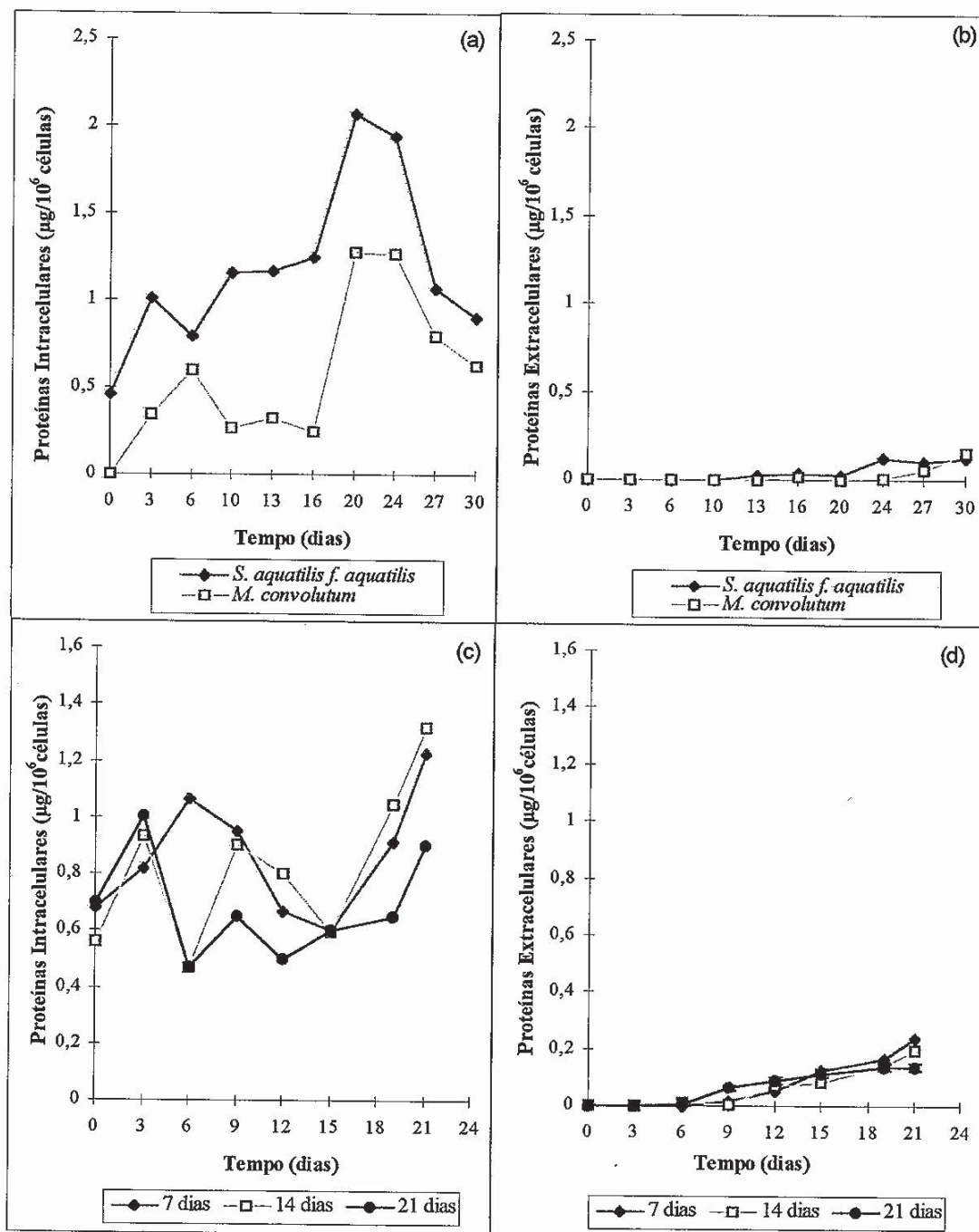


Figura 8 - Variação das concentrações de proteínas intracelulares e extracelulares: (a) e (b) de *S. aquatilis f. aquatilis* e *M. convolutum* crescidas em condições unialgais no meio ASM-1, e (c) e (d) de *S. aquatilis f. aquatilis* crescida em meio "ASM-1 Reconstituído" (7,14,21 dias).

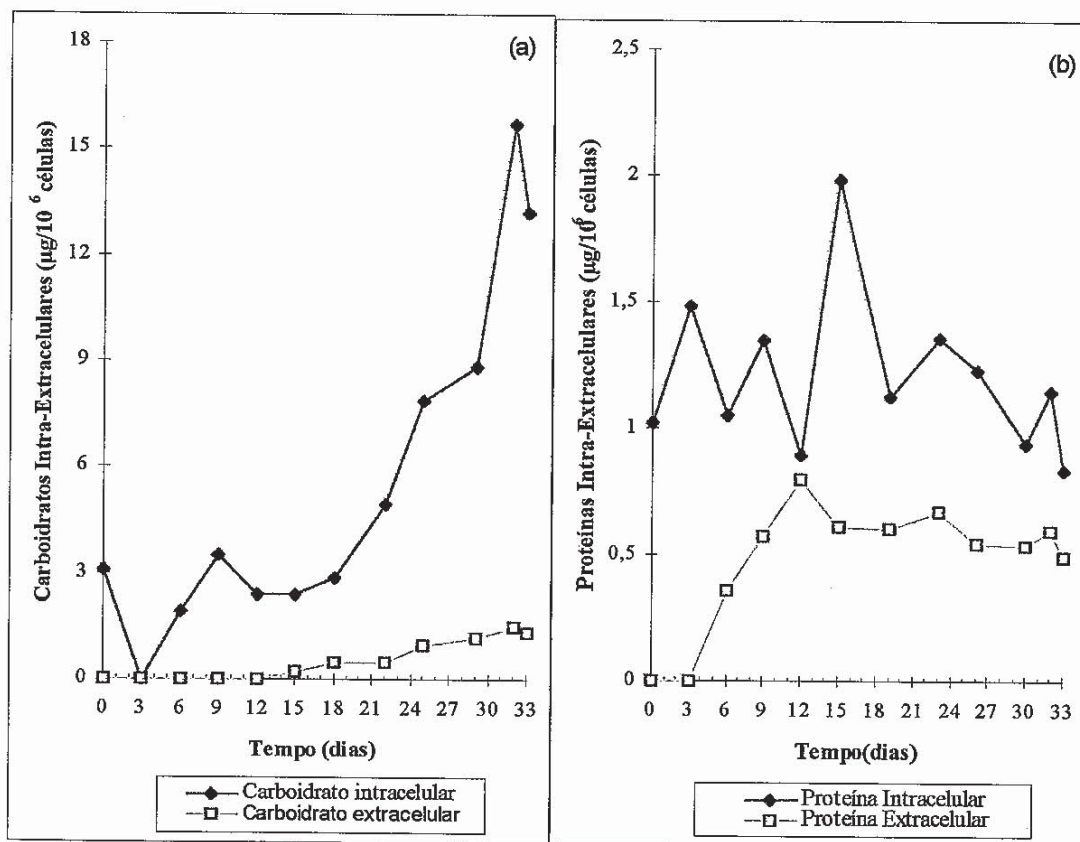


Figura 9 - Variação das concentrações de (a) carboidratos intracelulares e extracelulares e (b) proteínas intracelulares e extracelulares de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* crescidas em cultivo **misto** no meio ASM-1.

4.5 -Concentração de Clorofila a:

Os valores das concentrações de clorofila a das espécies *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum*, suas médias e desvio padrão estão apresentados nas tabelas 30 a 36-anexo.

As Figuras 10-a e 10-b mostram os valores das médias determinadas para as concentrações de clorofila a das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* cultivadas em condições unialgais e mistas. Pode-se observar que as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis*, crescidas em meio ASM-1 (Fig. 10-a) apresentaram uma redução nas concentrações de clorofila a, após o 21º dia de cultivo. Esta redução foi decorrência da fase estacionária de crescimento (Fig. 4-a), na qual as células apresentaram um metabolismo mais lento, voltado para o acúmulo de compostos de reservas, ficando a síntese de moléculas nitrogenadas como a clorofila a bastante reduzida.

Além disso, Allen & Smith (1969 - citados em Kana *et al.* 1992) verificaram que a limitação de nitrogênio na capacidade fotossintética das cianofíceas geralmente causa degradação da clorofila, devido à drástica redução no conteúdo de ficobiliproteínas.

Entretanto, as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* cultivadas nas três condições do meio "ASM-1 Reconstituído" (Fig. 11), não exibiram grandes diferenças nas concentrações de clorofila a durante todo o período de cultivo. Comparando esses resultados com os obtidos em meio ASM-1, verificamos que a matéria orgânica excretada nos cultivos com 7, 14 e 21 dias não induziram o aumento das concentrações de clorofila a.

Os cultivos mistos apresentaram valores intermediários aos obtidos para *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum*, nos dois meios de cultivo utilizados. Entretanto, no meio ASM-1 observou-se que esses cultivos mistos apresentaram uma maior concentração de clorofila a, que pode ser um efeito de auto-sombreamento, uma vez que nessa condição obteve-se um número total de células.mL⁻¹ maior.

A espécie *M. convolutum* apresentou maiores concentrações de clorofila a no meio ASM-1 em relação ao meio Z-8.

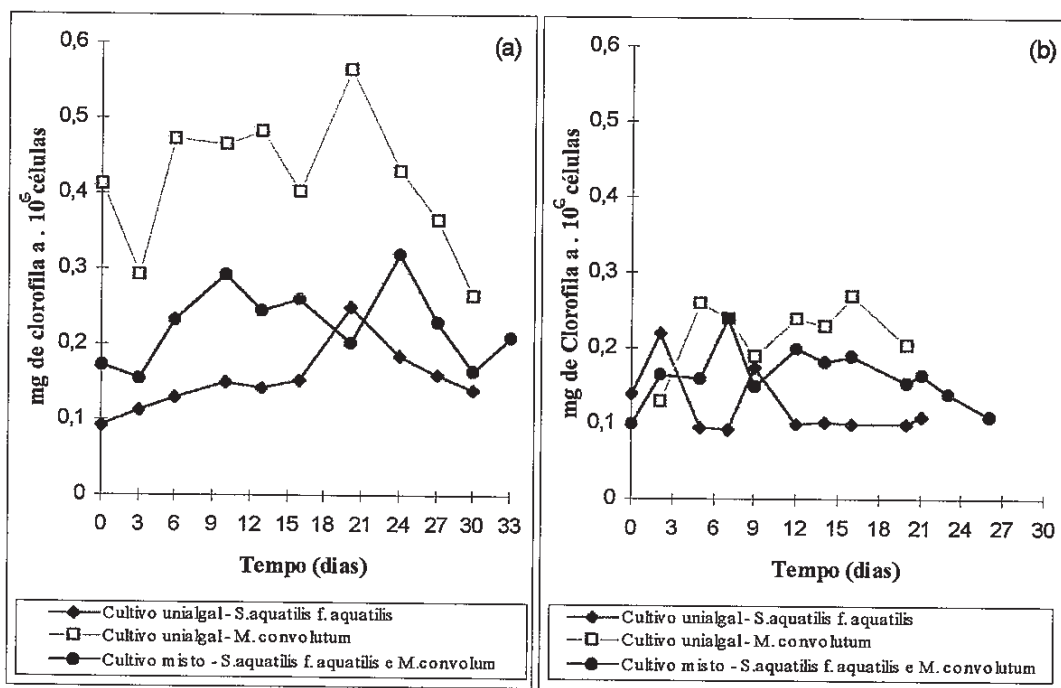


Figura 10 - Variação das concentrações de clorofila *a* de *S. aquatilis f. aquatilis* e *M. convolutum* crescidas em condições unialgais e mista, nos meios (a) ASM-1 e (b) Z-8.

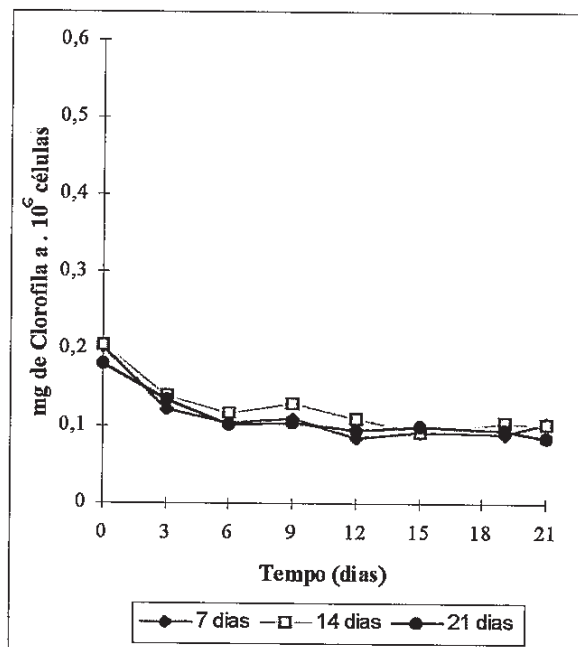


Figura 11- Variação das concentrações de clorofila *a* de *S. aquatilis f. aquatilis*, crescidas em condições unialgais, no meio "ASM-1 Reconstituído" (7,14 e 21 dias).

4.6 - Produção de Microcistinas:

4.6.1 - Análise por bioensaios e imunoenaios:

Os resultados dos testes de toxicidade com as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum*, crescidas tanto nas condições unialgais como mista, no meio Z-8 mostraram que essas células não eram tóxicas, em nenhuma condição de cultivo.

Esses resultados levantam a questão para as condições fisiológicas e ambientais que determinam a produção de toxinas, em determinadas cepas.

Os meios Z-8 e ASM-1 (Tabelas 4 e 5) diferem nas concentrações de seus nutrientes e micronutrientes. A concentração de fontes nitrogenadas no meio Z-8 é aproximadamente 3 vezes maior que a do meio ASM-1.

Os bioensaios realizados em camundongos Swiss com as células liofilizadas de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* crescidas em condições unialgais nos meios "ASM-1 Especial" e "Z-8 especial" também não apresentaram toxicidade, ou o método utilizado para detectar a presença das hepatotoxinas estava abaixo do limite de detecção.

Watanabe & Oishi (1985), relataram que o decréscimo na concentração de fósforo tem um efeito mínimo na variação da toxicidade de espécies do gênero *Microcystis*, enquanto que o decréscimo nas concentrações de nitrogênio passam a ter efeitos mais pronunciados no aumento da produção de cianotoxinas.

Entretanto, McQueen & Lean (1987) verificaram que, para algumas cianofíceas, a produção de toxinas está diretamente relacionada à razão N:P do meio. Sabe-se que os "blooms" de cianofíceas estão associados a ambientes aquáticos com baixa taxa N:P.

Esses resultados concordam com os encontrados em nosso trabalho, onde verificamos que a produção de toxinas ocorreu apenas no meio com a menor taxa N:P, o ASM-1. O meio Z-8 apresenta uma razão N:P igual a 30, valor 3 vezes maior que o encontrado no meio ASM-1.

A Tabela 5 mostra diferentes valores da concentração letal mínima (CLmin.) determinada nos bioensaios utilizando-se células crescidas em cultivos mistos, com diferentes percentuais de *M. convolutum*. As variações das concentrações de microcistinas observadas nos imunoenaios também estão apresentadas.

As células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* cultivadas em condições unialgais no meio ASM-1 não apresentaram efeitos tóxicos nos animais testados nos bioensaios. No entanto,

as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* crescidas em cultivo misto com *M. convolutum* no meio ASM-1 apresentaram uma alta produção de microcistinas (Tabela 5).

Foram então, realizados vários experimentos para a confirmação desse resultado. Verificamos inicialmente que a maior concentração na produção de toxina se deu nos cultivos mistos com maior número de células.mL⁻¹ de *M. convolutum*.

Além disso, pode-se observar que a concentração de toxina também era variável em relação ao tempo de cultivo.

Tabela 5 - Resultados dos bioensaios e dos imunoenaios (ELISA) realizados com as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum*, crescidas em condições unialgais e mista, nos meios ASM-1.

Tempo de cultivo (dias)	% final de <i>M. convolutum</i>	CL min. (mg/kg)	Ocorrência de morte em horas.	"ELISA" ng/mg de microcistina
20	100	NL	-	ND
25	80	15,36	24	1000
32	76	33,16	24	700
42	68	92,06	24	150
23	59	38,29	1:30'	-
29	41	46,54	2:30'	833
33	32	43,3	24	600
25	31	32,84	24	500
24	27	NL	-	1,2
25	21	129,6	24	54
26	11	316,3	24	15
21	12	NL	-	3,13
20	7	NL	-	-
20	0	NL	-	1

NL - Não letal nos bioensaios realizados com camundongos.

ND - Não detectado a presença de microcistina.

(-) - Não analisado.

Os bioensaios realizados com as células tóxicas, em camundongos Swiss, demonstraram acentuados sintomas hepatotóxicos. Os fígados dos animais mortos apresentaram um aumento de cerca de 100 % de seu peso. Essa sintomatologia é típica das hepatotoxicoses.

De acordo com Sivonen (1996), as hepatotoxinas e a anatoxina-a ficam retidas nas células, enquanto estas se encontram em condições favoráveis de crescimento. A concentração das hepatotoxinas aumenta durante a fase logarítmica de crescimento, atingindo o máximo da sua concentração no final dessa fase.

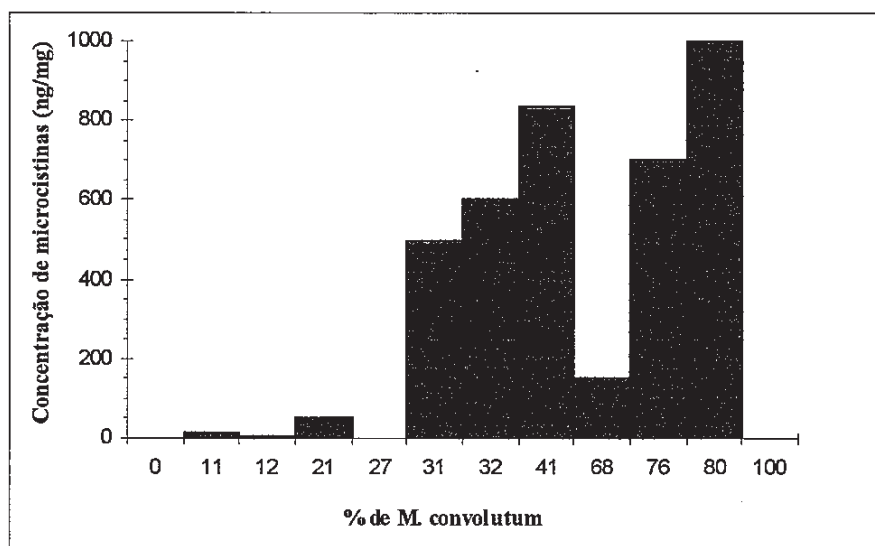


Figura 12 - Resultados dos testes ELISA realizados em células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* mantidas em cultivos unialgais e misto.

Os testes de toxicidade das células, mantidas em cultivos mistos com diferentes percentuais de *M. convolutum*, variando de 11% a 80%, revelaram uma maior produção de hepatotoxinas nos cultivos com maior número de células.mL⁻¹ de *M. convolutum*.

Por outro lado, de acordo com a Tabela 5, podemos verificar a influência do tempo de cultivo nas culturas com percentuais próximos de *M. convolutum*. Tal fato pode ser observado nos resultados obtidos das culturas com 32% e 31%; 80% e 76% de células de *M. convolutum*. A diferença dos resultados, provavelmente, como já mencionado, foi

ocasionada pelo tempo do cultivo para cada condição analisada, ou seja, as células se encontravam em fases de crescimento distintas.

As culturas com 80% e 31% de *M. convolutum* apresentam o mesmo tempo de cultivo, e os dados dos seus bioensaios diferem quanto a concentração letal mínima (CL_{min.}). O cultivo com 80% de *M. convolutum* apresentou uma toxicidade duas vezes maior que o resultado encontrado na cultura com 31% de *M. convolutum*. Esses resultados foram confirmados com o teste ELISA. A produção de microcistinas no cultivo com 80% de *M. convolutum* foi de 1000 ng/mg, enquanto que para o cultivo com 31% foi a metade deste valor.

O resultado do teste Elisa realizado com as células do cultivo misto com 41% de *M. convolutum* pode estar superestimados devido ao fato que, para essa condição de cultivo, a metodologia utilizada para a análise por imunoenaios sofreu algumas modificações nas concentrações dos anticorpos utilizados (Carmichael, comunicação pessoal), o que pode ter ocasionado esse resultado.

Acredita-se que *M. convolutum* esteja agindo como uma espécie competidora de nutrientes, estimulando assim a produção de hepatotoxinas pelas cianofíceas.

Entretanto, podemos dizer que ocorreu uma afinidade específica entre essas espécies. Foram realizados cultivos mistos dessa cianofícea com uma outra espécie de *Monoraphidium* e com uma cepa, não tóxica, de *Microcystis*. Os resultados dos bioensaios mostraram que nestas duas condições de cultivo misto, as células não apresentaram toxicidade nos animais testados.

Na literatura são poucos os trabalhos relacionados com a produção de ficotoxinas em cultivos mistos. Ogata *et al.* (1990) relatam a produção de toxina pelo dinoflagelado *Protogonyaulax tamarensis* associado a *Moraxella* sp., uma bactéria. Eles verificaram que ambas espécies eram produtoras de toxinas. No entanto, a presença da bactéria se dava apenas nas culturas tóxicas de *P. tamarensis*. Bates *et al.* (1995) verificaram que em cultivos não axênicos a diatomácea *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries* intensificava a produção de ácido domóico em até 115 vezes mais que nas culturas livres de bactérias.

Entretanto, não foi possível encontrar na revisão bibliográfica realizada nenhum trabalho estudando a produção de toxinas de cianofíceas em cultivos mistos.

A produção de toxina pela espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condições unialgais foi somente detectada utilizando o teste ELISA, devido a baixa produção desses peptídeos

hepatotóxicos nesta condição de cultivo. Para *M. convolutum* não foi detectada a presença de microcistinas em nenhuma condição experimental.

A cultura com 68% de *M. convolutum* (figura 12), com 42 dias de cultivo, apresentou uma baixa concentração de microcistina. Essa redução pode ser devido a uma lise celular ou a um processo de excreção. Já se sabe que, nas fases estacionária e senescente de crescimento celular, as toxinas podem ser liberadas para o meio de cultivo (Sivonen, 1990).

No decorrer dos experimentos, foi verificado nos cultivos mistos com 27%, 21%, 11% e 12% de células de *M. convolutum* uma redução gradual da síntese dessas hepatotoxinas. Foi observado nos últimos dois anos de estudo, uma grande diminuição na produção de toxina. Por outro lado, ainda era mantida uma relação entre produção de toxina e a presença de *M. convolutum*. Tal fato é concordante com os dados já observados por vários autores (Carmichael, 1986; Sivonen, 1996), que relatam uma redução na produção de toxinas por cepas de cianofíceas, mantidas em condições de cultivo por longo período.

4.6.2 - Análise por HPLC:

A análise de microcistinas por técnicas de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), realizada com o extrato das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* crescidas em condições unialgais em meio ASM-1, não demonstrou a presença de hepatotoxina. Isto indica que a concentração de microcistina, nessa condição de cultivo, era muito baixa não sendo detectável pelo método usado.

Os dados obtidos com as análises por HPLC, com os extratos dos cultivos mistos com diferentes percentuais de *M. convolutum*, evidenciaram que a produção de microcistina variava quantitativamente (Figuras 13 e 14). Esses dados corroboram a variação quantitativa observada nos bioensaios e imunoenaios (Tabela 5).

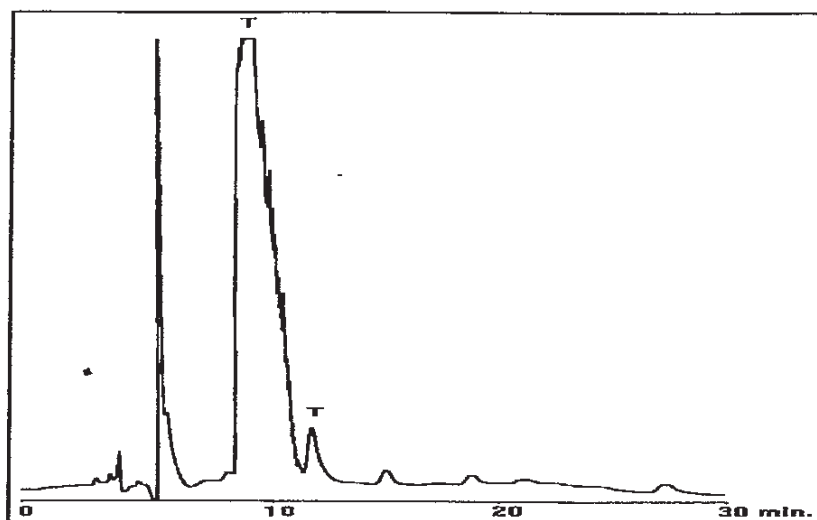
Tabela 6 - Áreas dos picos de microcistinas determinadas para os extratos celulares analisados em coluna semi-preparativa e analítica, nas diferentes condições de cultivo. Os valores representam a média dos dados obtidos em pelo menos 2 cromatogramas.

Meio de Cultivo	Condição de Cultivo	Área do Pico Tóxico
Meio ASM-1	Misto - 80 % de <i>M. convolutum</i>	4.445.773
	Misto - 41 % de <i>M. convolutum</i>	10.098.974
	Misto - 21 % de <i>M. convolutum</i>	1.608.898
	Misto - 11 % de <i>M. convolutum</i>	1.036.613
	unialgal - <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>	-
* Área do pico tóxico de microcistina-LR		26.176.526

* A concentração do padrão de microcistina-LR utilizado foi de 20 µg/mL.

As Figuras 13 e 14 mostram os cromatogramas realizados em uma coluna semi-preparativa a partir da fração com metanol 100 %.

(a)



(b)

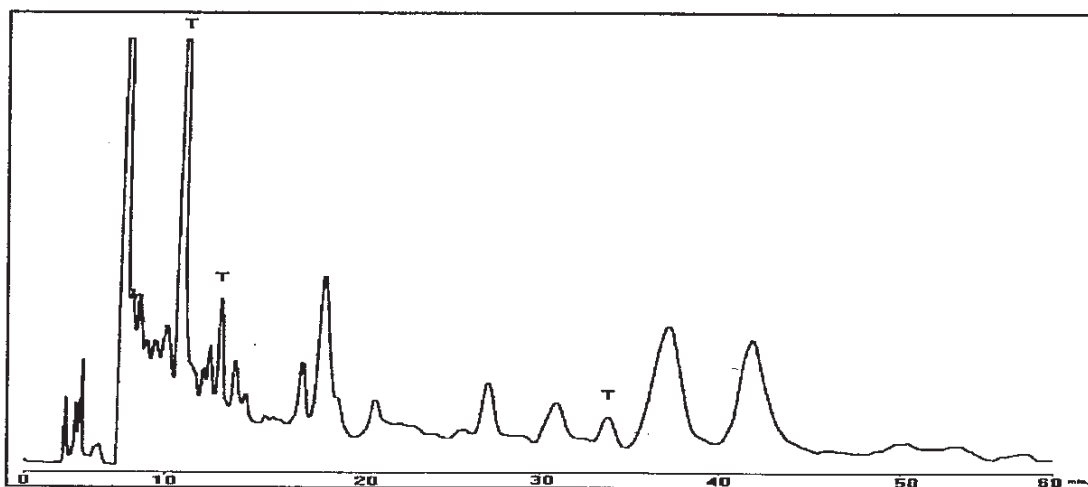
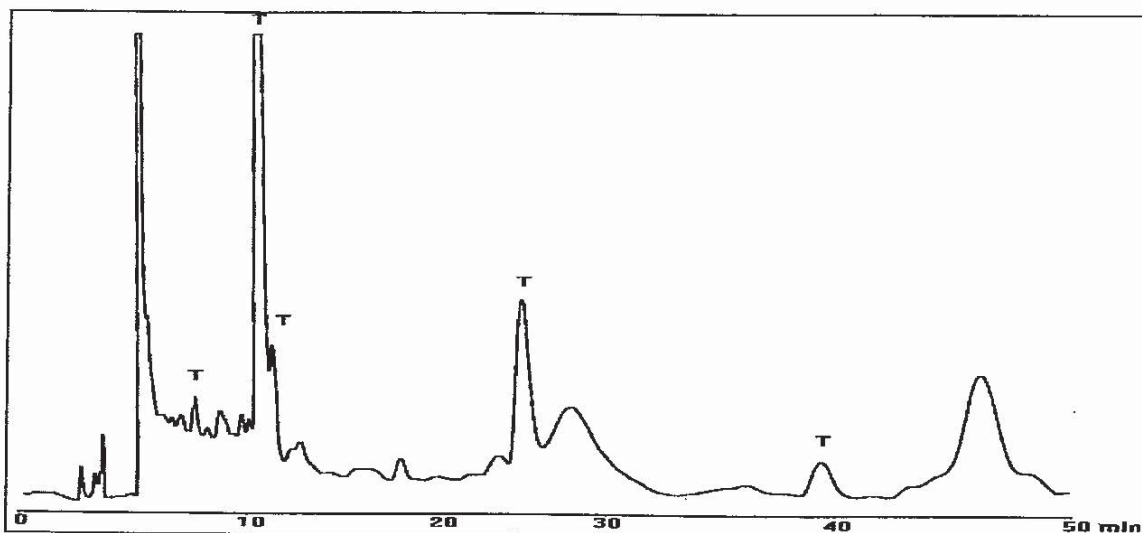


Figura 13 - Cromatogramas por HPLC da fração metanol 100 % dos cultivos mistos (a) com 11% de células de *M. convolutum* e (b) 21 % de *M. convolutum*. Condições analíticas: coluna semi-preparativa, fase reversa (C18 (5 μ m), 250 mm \times 10 mm). Condição isocrática: fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5.0 (28:72 v/v), fluxo de 3 mL.min e comprimento de onda de 238 nm; (T) indica os picos tóxicos cujos os espectros de absorção foram iguais aos da microcistina-LR.

(a)



(b)

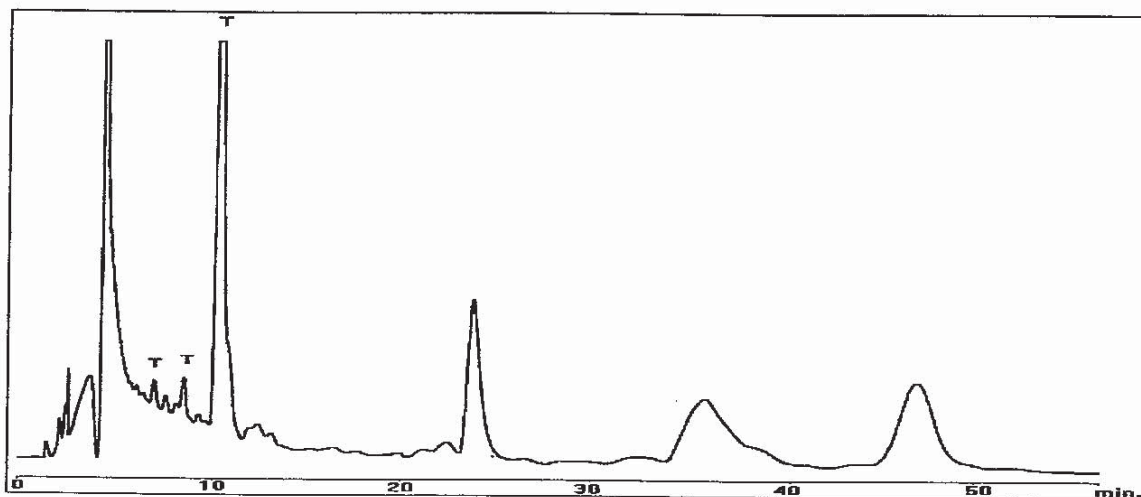


Figura 14 - Cromatogramas por HPLC da fração metanol 100 % dos cultivos mistos (a) com 41 % de células de *M. convolutum* e (b) 80 % de *M. convolutum*. Condições analíticas: coluna semi-preparativa, fase reversa (C18 (5 μ m), 250mm \times 10 mm). Condição isocrática: fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5.0 (28:72 v/v), fluxo de 3 mL.min e comprimento de onda de 238 nm; (T) indica os picos tóxicos cujos os espectros de absorção foram iguais aos da microcistina-LR.

Pode-se verificar que os cultivos mistos (Figuras 13 e 14) com os maiores percentuais de *M. convolutum* apresentaram variação quali-quantitativa para a produção de toxina.

Assim como os resultados dos bioensaios e dos imunoenaios, as análises por HPLC também revelaram que as culturas com maior percentual de *M. convolutum* apresentaram uma maior produção de toxinas (Tabela 5, Figuras 13 e 14). Além disso, podemos verificar que os cultivos com percentuais de 21 % e 41 % de *M. convolutum* mostraram 3 picos tóxicos com o espectro de absorção apresentando um índice de similaridade superior a 92% ao do padrão de microcistina-LR (Figura 15).

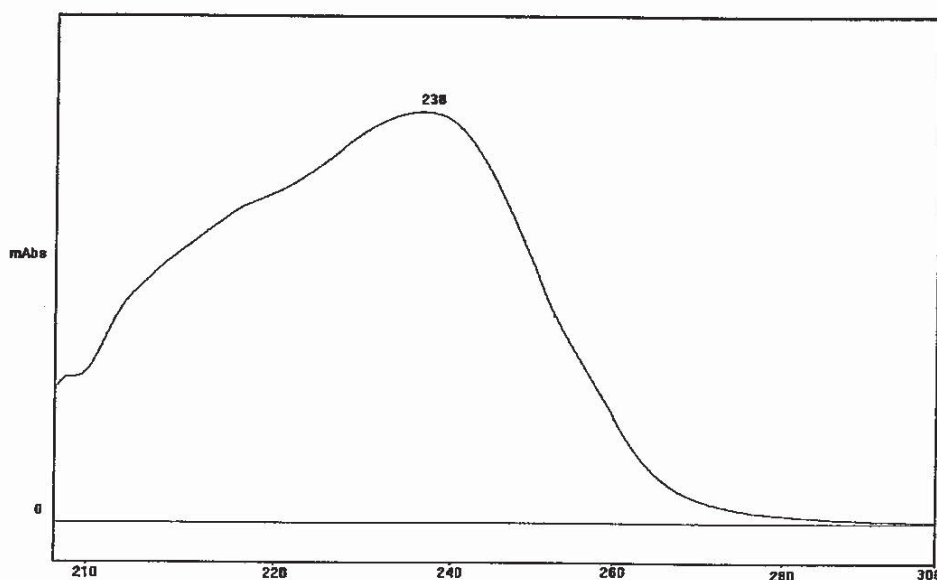


Figura 15 - Espectro de absorção entre 195 e 300 nm, típico da maioria das microcistinas. Determinado em um sistema HPLC-PDA.

A caracterização de cada uma destas microcistinas não foi feita, pois é necessário a purificação de uma maior quantidade de material celular para que se possa utilizar as técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrofotometria de massas (FAB/MS/MS). Além disso, esta caracterização ficou bastante dificultada, pois esses

cultivos mistos no decorrer dos experimentos apresentaram uma grande redução na produção de microcistinas (Tabela 5).

Carmichael (1988) e Watanabe *et al.* (1988) relataram que é comum algumas cepas de cianofíceas produzirem mais de um tipo de microcistina. No entanto, a microcistina mais freqüente em "blooms" tóxicos é a LR, exceto no Japão onde a mais comum é a microcistina-RR (Park & Watanabe, 1996).

Entretanto, a área do pico tóxico para as células crescidas em cultivo misto com 80% de *M. convolutum* não foi concordante com os resultados apresentados pelos bioensaios, imunoensaios e HPLC (Tabela 5 e 6). Diante desse dado, foi realizado um novo teste ELISA, com o mesmo material liofilizado, que revelou uma diminuição acentuada na concentração de microcistina. A concentração de microcistina neste segundo teste foi de apenas 428 ng/mg. Essas células foram mantidas por um longo período em freezer, sob condições não adequadas. Tal fato pode ter acarretado um processo de degradação das microcistinas. Krishnamurthy *et al.* (1986) descreveram que a temperatura ideal para a manutenção de células tóxicas é de -80°C , a qual não dispomos em nosso laboratório.

Os cromatogramas referentes aos cultivos misto com 11%, 41% e 80% de *M. convolutum* apresentaram picos, com baixas concentrações de microcistinas, próximos à um pico maior. Esses pequenos picos podem ter sido determinados devido a produtos de degradação do pico maior.

Os cromatogramas realizados com 11%, 21%, 41% e 80% de *M. convolutum* apresentaram um pico tóxico com o tempo de retenção bastante próximo. Isto pode indicar que nessas culturas ocorreu a produção de uma mesma microcistina.

Tabela 7 - Valores da área dos picos de microcistina determinados para os extratos analisados em coluna analítica, em aparelho de HPLC com fotodetector de diodo (PDA), para as condições de cultivo abaixo.

Meio de Cultivo	Condição de Cultivo	Área do Pico Tóxico
ASM-1	<i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> -07 dias	101.597
Reconstituído	<i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> -14 dias	147.500
	<i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i> -21 dias	85.748
Meio	unialgal - <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>	-
ASM-1/2	misto - 30 % de <i>M. convolutum</i>	2.703.475
Meio	unialgal - <i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>	-
ASM-1 NP/2	misto - 30 % de <i>M. convolutum</i>	764.682

As células cultivadas nos meios "ASM-1 Reconstituído", ASM-1/2 e ASM-1 NP/2 (Tabela 7) foram analisadas quanto à produção de microcistinas em HPLC, utilizando apenas uma coluna analítica, devido a pequena massa celular produzida nesses cultivos.

As cromatografias realizadas em condições analíticas sugerem que as células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* cultivadas em meio "ASM-1 Reconstituído" produziram uma pequena concentração de microcistinas. Portanto, podemos dizer que a matéria orgânica excretada no meio de cultivo pode ter influência no aumento da produção de toxinas.

As análises das células de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condições unialgais, mantidas em meio ASM-1/2 e ASM-1 com NP/2, não apresentaram produção de toxina.

Nos cultivos mistos verificou-se uma maior concentração de microcistina quando as células da cianofíceia e clorofíceia foram cultivadas em ASM-1/2. Parece que a possível limitação de todos os nutrientes do meio ASM-1 estimulou o aumento da produção de toxina, se compararmos esses dados com os do meio ASM-1 com NP/2.

5 - DISCUSSÃO FINAL

As diferenças observadas nas taxas de crescimento e na produção de microcistina pela espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* se devem à composição nutricional dos meios de cultivos utilizados, ao tempo de cultivo e ao percentual de *M. convolutum*.

Os nossos resultados mostraram que a composição nutricional é um dos importantes fatores que determinam o crescimento intenso das cianofíceas nos meios aquáticos. Verificamos também que a matéria orgânica excretada, pelo cultivo prévio de *M. convolutum*, estimulou o aumento da taxa de crescimento e a produção de microcistina.

Os dados referentes aos cultivos mistos das espécies, citadas acima, demonstraram claramente que o percentual da clorofíceas atua significativamente no crescimento e na produção de microcistina. Altas concentrações de microcistinas foram determinadas nos cultivos com maior número de células.mL⁻¹ de *M. convolutum*.

Por outro lado, o crescimento celular da espécie *M. convolutum* nos cultivos mistos e nos cultivos com matéria orgânica excretada, pelo cultivo prévio de *S. aquatilis* f. *aquatilis*, foi inibido. Tal fato levanta a hipótese de que os produtos excretados por essas espécies apresentam um efeito diferenciado, promovendo assim respostas distintas dessas duas espécies.

Deste modo, verificamos que além dos fatores físicos e químicos, a produção de microcistina e o crescimento celular da espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* parecem ser controlados por fatores biológicos como: a composição fitoplanctônica e os seus produtos excretados.

De acordo com esses resultados, podemos dizer que em um ecossistema aquático, além dos fatores físicos e químicos, a predominância das cianofíceas e a produção de hepatotoxinas podem também receber forte influência da comunidade fitoplanctônica presente no ambiente.

Portanto, este estudo demonstra a necessidade de maiores investigações das relações interespecíficas como um dos possíveis fatores controladores da produção de microcistinas por cianofíceas.

6 - CONCLUSÕES

- O meio Z-8 favoreceu um ótimo crescimento celular de *S. aquatilis* f. *aquatilis*, porém não favoreceu a produção de microcistina nos cultivos unialgais e mistos;
- No meio "Z-8 Especial" a matéria orgânica excretada pela clorofícea teve uma ação contrária a determinada nos meios "ASM-1 Especial e Reconstituído", o que pode ter sido ocasionado ou pela diferença nutricional dos dois meios padrões: ASM-1 e Z-8, ou por diferença quali-quantitativa da matéria orgânica excretada;
- A matéria orgânica excretada pela espécie *M. convolutum* no meio "ASM-1 Reconstituído" favoreceu um aumento na taxa de crescimento celular da espécie *S. aquatilis* f. *aquatilis* e estimulou a produção de microcistinas;
- Nas três condições do meio "ASM-1 Reconstituído" (7,14 e 21 dias) não observamos diferenças significativas nas taxas de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis*;
- A matéria orgânica excretada pela cianofícea, utilizada no meio "ASM-1 Especial" inibiu a taxa de crescimento de *M. convolutum*. O mesmo fato foi observado nos cultivos mistos;
- As maiores concentrações de microcistinas mostraram-se estar diretamente relacionadas com os maiores percentuais de *M. convolutum* nas culturas;
- O tempo de cultivo e a composição do meio de cultura também influenciaram a produção de microcistina.

7 - BIBLIOGRAFIA:

- ANDERSON, R.J.; LUU,H.A.; CHEN, D.Z.X.; HOLMES,C.F.B.; KENT, M.L.; LE BLANC, M.; TAYLOR, F.J.R.M. and WILLIAMS, D.E. (1993). Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. Toxicon **31**(10): 1315-1323.
- AZEVEDO, S.M.F.O. (1996). Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. Conferência: Causas e conseqüências do envenenamento por microcistina-LR em pacientes renais, submetidos à hemodiálise no IDR-Caruaru, Brasil. VI Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia. Ed. Sociedade Brasileira de Toxinologia, 06 a 11 de outubro de 1996, 17.
- AZEVEDO, S.M.F.O. and CARMOUZE, J.P. (1994). Une mortalité de poisons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophyceae. Rev. Hydrobiol. Trop. **27**(3): 265-267.
- 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.
- BARICA, J.; KLING, H. and GIBSON,J. (1980). Experimental manipulation of algal bloom composition by nitrogen addition. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **37**: 1175:1183.
- BATES, S.S.; DOUGLAS, D.J.; DOUCETTE, G.J. and LEGER, C. (1995). Effects of reintroducing bacteria on domoic acid production by axenic cultures of diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries*. In: Harmful marine Algal Blooms: Proliférations d'algues marines nuisibles. Lassus, P.; Arzul; Erard-Le Denn, E.; Gentien, P. & Marcaillou-Le baut (eds.). 401-406.

- BERNAZEU, F. and EAUX-DUMÉZ, L. (1994). Can microcystins enter drinking water distribution systems? In: Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management, Steffensen, D.A. & Nicholson, B.C. (eds.). Proceedings of an International Workshop - Adelaide, Australia, March 22-26: 115-118.
- 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. physiol. **37**: 453-471.
- BOROWITZKA, M.A. (1988). Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge University Press, New York, 153-196.
- BOUSSIBA, S. and RICHAMOND, A.E. (1980). C-phycocyanin 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 Biochemistry **72**: 248-254.
- CARMICHAEL, W.W. (1986). Isolation, culture and toxicity testing of toxic freshwater cyanobacteria (blue-green algae). In: Fundamental Research in Homogenous Catalysis. Shilo (ed.). Gordon & Breach Publ., New York **3**: 1249-1262.
- CARMICHAEL, W.W. (1988). Toxins of freshwater algal. In: Handbook of Natural Toxins. Tu, A.T. (ed.). Marcell Dekker, New York, 121-147.
- CARMICHAEL, W.W. (1991). Blue-green algae: An overlooked health threat. Health & Environment. A publication of Freshwater Foundation **5(6)**: 1-8.
- CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. **72**: 445-459.

- CARMICHAEL, W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. Scien. American **270**(1): 63-72.
- CARMICHAEL, W.W. and FALCONER, I.R. (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Harcourt Brace & Company Publishers (eds.). Academic Press, INC, San Diego, 187-209.
- 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. & Strichartz, G. (eds). American Chemical Society, Washington, 87-106.
- CHEN, D.Z.X.; BOLAND, M.P.; SMILLIE, M.A.; KLIX, H.; PTAK, C.; ANDERSON, R.J. and HOLMES, C.F.B. (1993). Identification of protein phosphatases inhibitors of the microcystin class in the marine environment. Toxicon **31**(11): 1407-1414.
- CHU, F.S.; HUANG, X. and WEI, R.D. (1989). Production and characterization of antibodies against microcystin. Appl. Environ. Microbiol. **55**(8): 1928-1933.
- CLAEYSSSENS, 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.
- CODD, G.A. (1994). Biological aspects of cyanobacterial toxins. In: Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management. Proceedings of an International Worksop. Steffensen, D.A. & Nicholson, B.C. (eds.). Adelaide, Australia, March 22-26.
- COOD, G.A. AND POON, G.K. (1988). Cyanobacterial toxins. In: Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. Rogers, L.J. & Gallon, J.R. (eds), Proceedings of Phytochem. Soc. Europe, vol. 28, Oxford University Press, Oxford, 283-296.

- COSTA, S.M. and AZEVEDO, S.M.F.O. (1994). Implantação de um banco de cultivo de cianofíceas tóxicas. Iheringia, Sér. Bot., **45**: 69-74.
- DOMINGOS, P.; HUSZAR, V.L.M. and CARMOUZE, J-P. (1994). Composition et biomasse du phytoplancton d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. Rev. Hydrobiol. Trop. **27** (3): 235-250.
- 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.
- EDWARDS, C.; BEATTIE, K.; SCRIMGEOUR, C.M. and CODD, G.A. (1992). Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. Toxicon **30**(10): 1165-1175.
- ELLOF, J.N. and VAN DER WESTHUIZEN, A.J. (1981). Toxicological studies on *Microcystis*, on the water environment: In: Algal toxins and Health. Carmichael, W.W. (ed.). Plenum Press, New York, 343.
- ERICKSON, J.E.; GRÖNBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J.P. and MERILLOTO, J.A.O. (1990). Hepatocellular uptake of ³H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. Bioch. Biophys. Acta. **1025**: 60-66.
- FALCONER, I.R. and BUCKER, T.H. (1989). Tumor promotion by *Microcystis* sp., a blue-green alga occurring in water supplies. Med. J. Australia, 150-351.
- FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M. and COVERDALE, O.R. (1994). Toxicity of 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.
- FOGG, G.E. and THAKE (1987). Algae Cultures and Phytoplankton Ecology, 3rd edition. The University of Wisconsin Press. London. 269.

- 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, 463-490.
- GLEASON, F.K. and WOOD, J.M. (1987). Secondary metabolism in the cyanobacteria. In: The Cyanobacteria, Fay, P. & Van Bealen, C. (eds). Elsevier Science Publishers, New York, 436-451.
- GUARTIER, M.J.; BERNARD, P. & AUBERT, M. (1978). Modification de la fonction antibiotique de deux diatomées marines, *Asterionella japonica* (Cleve) et *Chaetoceros lauderi* (Ralfs), par le dinoflagellé *Prorocentrum micans* (Ehrenberg). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **33**: 37-50.
- HAMA, T. and HANDA, N. (1987). Pattern of organic matter production by natural phytoplankton population in a eutrophic lake - 2. Extracellular products. Arch. Hydrobiol. **109**(2): 227-243.
- HARADA, K-I.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI, M. and KONDO, F. (1996). Mass spectrometric screening method for microcystis in cyanobacteria. Toxicon **34**(6): 701-710.
- HARADA, K-I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; WATANABE, M. and TERAOKA, K. (1994). Isolation of cilindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon **32** (1): 73-84.
- HO, K.K. and KROGMANN, D.W. (1992). Photosynthesis. The Biology of Cyanobacteria. Carr, N.G. & Whitton, B.A. (eds.). Blackwell Scientific Publications. 191-214.
- 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.; KHATA, B.S.; DUKELOW, M. and BOYNTON, A.L. (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatases. J. Biol. Chem. **265** (32): 19401-19404.
- HUMPHRIES, S.E. and LYNE, V.D. (1988). Cyanophyte blooms: The role of cell buoyancy. Limnol. Oceanogr. **33**(1): 79-91.
- HUNTER, P.R. (1992). Cyanobacteria and human health. J. Med. Microbiol. **36**: 301-302.
- JISI, A. and CARMICHAEL, W.W. (1994). Use of colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. Toxicon **32**(12): 1495-1507.
- JONES, A.K. (1988). Algal extracellular products - antimicrobial substances. In: Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. Clarendon Press Oxford (ed.). 257-281.
- 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.
- KANA, T.M.; FEIWEL, N.L. and FLYNN, L.C. (1992). Nitrogen starvation in marine *Synechococcus* strains: clonal differences in phycobiliprotein breakdown and energy coupling. Mar. Ecol. Prog. Ser. **88**: 75-82.
- KENEFICK, S.L.; HRUDEY, S.E.; PETERSON, H.G. and PREPAS, E.E. (1992). Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. In: Symposium on Health-Related Water Microbiology, Water Quality International'92, Washington, D.C., May.

- KEATING, K.I. (1987). Blue-green algal inhibition of diatom growth: Transition from mesotrophic to eutrophic community structure. Science **199**(3): 971-973.
- 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 Zeal. J. Mar. and Fresh. Res. **21**: 457-465.
- LINCOLN, E.P. and CARMICHAEL, W.W. (1989). Preliminary tests of toxicity of *Synechocystis* sp. grown on wastewater medium. In: The Water Environment: Algal Toxins and Health. Carmichael, W.W. (ed.). New York: Plenum Press, 223-230.
- LINDHOLM, T.; ERIKSSON, J.E. and REINIKAINEN, M. (1992). Ecological effects of hepatotoxic cyanobacteria. Envir. Toxicol. and Water Quality **7**: 87-93.
- LUKAC, M. and AEGERTER, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon **31**(3): 293-305.
- LUUKKAINEN, R.; NAMIKOSHI, M. SIVONEN, K.; RINEHART, K.L. and NIEMELÄ, S.L. (1994). Isolation and identification of 12 microcystins from strains and two bloom samples of *Microcystis* spp., structure of a new hepatotoxin. Toxicon **32**(1): 133-139.
- MACKARETH, F.J.H.; HERON, J. and TALLING, J.F. (1978). Water analysis some revised methods for limnologists. Freshwater Biologist Association Scientific Publication, n° 36.

- MACKINTOSH, C.; BEATTLE, K.A.; KLUMPP,S.; COHEN, P. and CODD, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibition of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. Febs Lett. **264**: 189-192.
- MACKINNEY, G. (1941). Absorption of light by chorophyll solutions. J. Biol. Chem. **140**: 315-322.
- MAHMOOD, N. A. & CARMICHAEL, W.W. (1986). The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRR-525-17. Toxicon, **24**: 425-435.
- McQUEEN, D.J. and LEAN, D.R.S. (1987). Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus rations on dominance of blue-green algae in lake St. George,Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **44**: 598-604p.
- MOLICA, R.J.R. (1996). Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin (Cyanophyceae). Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, UFRJ, 87.
- MOORE, R.E. (1977). Toxins from blue-green algae. BioScience **27**(12): 797-802.
- MYKLESTAD, S. and HAUG, A. (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. Willei (gran) Hustedt. I - Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **9**: 125-136.
- NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N. and NAKANO, M. (1991). Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. Appl. Environ. Microbiol. **57**(1): 327-330.

- NEWMAN, J.; WYMAN, M. and CARR, N.G. (1987). Absence of the nitrogen reserve polymer cyanophycin from marine *Synechococcus* species. FEMS. Microbiol. Lett. **44**: 221-224.
- OGATA, T.; KODAMA, M.; KOMARU, K.; SAKAMOTO, S.; SATO, S. and SIMIDU, U. (1990). Production of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from toxic dinoflagellates. In: Toxic Marine Phytoplakton. Graneli *et al.*, (eds.). 311-315.
- OHTA, T.; SUEOKA, E.; LIDA, N.; KOMORI, A.; SUGAMUNA, M.; NISHIWAKI, R.; TATEMATSU, M.; KIM, S-J.; CARMICHAEL, W.W. and FUJIKI, H. (1994). Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, Is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. Cancer Res. **54**: 6402-6406.
- 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, 57-77.
- ROBARTS, R.D. and ZOHARY, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. **21**: 391-399.
- RUDOLPH-BÖHNER, S.; MIERKE, D.F. and MORODER, L. (1994). Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promotion microcystins. Febs lett. **349**: 319-323.
- SIEGEL, J. (1985). Statistic. User's Manual. Analytical Software, USA.
- 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. (1994). Occurrence of toxic cyanobacteria in Finnish fresh waters and Baltic Sea. 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, 15-18.
- SIVONEN, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. Phycologia 35(6): 12-24.
- 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.
- SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; ANDERSON, R.A.; MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E. and SKULBERG, R. (1992). Investigations of a neurotoxic oscillatoriacean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. Environ. Toxicol. Chem. 11: 321-329.
- SMITH, V.H. (1983). Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science 221: 669-670.
- STAUB, R. (1961). Ernährungsphysiologisch - autökologische untersuchungen an der plancktonische blualge *Oscillatoria rubescens* DC. - Schweiz. Z. hydrol. 23: 82-198.
- 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.
- TEIXEIRA, M.G.L.; 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. of Sanit. Panam. 114(6): 502-511.
- TESTER, P.A. (1991). Red tide: Effects on health and economics. Health & Environment. A publication of the Freshwater Foundation (ed.). Board, 5(6): 4-8.

- 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.
- VASCONCELOS, V.M. (1994). Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese fresh waters. Arch. Hydrobiol. **113**: 1-13.
- VASCONCELOS, V.M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. and NAMIKOSHI, M. (1995). Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* kutz, emend Elekin. Arch. Hydrobiol. **223**: 1-11.
- WATANABE, M.F. (1996). Production of microcystins. In: Toxic Microcystis. Watanabe, M.F.; Harada, K.; Carmichael, W.W. & Fujiki, H. (eds.). CRC Press. Boca Raton, New York, London & Tokyo. 13-34.
- WATANABE, M.F. and OSHI, S. (1985). Effects of environment factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. **49** (5): 1342-1344.
- WATANABE, M.F.; OSHI, 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.
- 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.
- YU, S-Z. (1994). Blue-green algae and liver cancer. In: Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management. Steffensen, D.A. & Nicholson, B.C. (eds.) Proceeding of an International Workshop, Adelaide, Australia. March 22-26.

8 - ANEXOS:

Tabelas com valores dos números de células.mL⁻¹, concentrações de carboidratos intracelulares e extracelulares, proteínas intracelulares e extracelulares dos experimentos realizados em triplicata, o cálculo de suas médias e o desvio padrão.

NÚMERO DE CÉLULAS.mL⁻¹:

CULTIVOS UNIALGAIS:

Tabela 1 - Número de células.mL⁻¹ dos cultivos da *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio ASM-1, média e desvio padrão:

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	3.205.000	3.620.000	3.170.000	3.331.666	250.316
1	5.475.000	4.425.000	5235.000	5.045.000	550.181
2	6.435.000	6.465.000	6.480.000	6.460.000	22.912
3	10.125.000	9.240.000	10.305.000	9.890.000	570.065
4	12.900.000	9.810.000	11.100.000	11.270.000	1.551.998
6	21.807.500	17.105.000	18.535.000	19.149.166	2.410.659
7	25.575.000	20.075.000	19.415.000	21.688.333	3.382.090
8	24.200.000	17.765.000	26.180.000	22.715.000	4.399.656
9	26.345.000	21.615.000	27.390.000	25.116.666	3.077.216
10	31.240.000	24.695.000	26.950.000	27.628.333	3.324.809
11	31.515.000	32.220.000	30.855.000	31.863.333	1.220.372
13	33.220.000	35.250.000	29.975.000	32.815.000	2.660.718
14	30.085.000	28.050.000	27.610.000	28.581.666	1.320.381
15	32.945.000	37.015.000	37.015.000	35.658.333	2.349.815
16	38.666.500	37.730.000	30.140.000	35.512.166	4.675.937
17	33.055.000	31.735.000	24.585.000	29.791.666	4.557.151
18	29.810.000	33.935.000	27.940.000	30.561.666	3.067.369
20	29.370.000	32.670.000	27.060.000	29.700.000	2.819.521
21	36.300.000	35.970.000	29.920.000	34.063.333	3.592.023
22	30.635.000	31.020.000	29.205.000	30.286.666	956.325
23	35.520.000	30.085.000	29.680.000	31.761.666	3.261.105
24	33.920.000	31.040.000	33.040.000	32.667.666	1.476.230
27	58.880.000	31.040.000	42.640.000	44.186.666	13.984.296
28	42.960.000	48.720.000	39.980.000	43.886.666	4.443.077
29	39.760.000	48.240.000	42.320.000	43.440.000	4.349.528
30	44.960.000	47.920.000	39.840.000	44.240.000	4.087.835

Tabela 2 - Número de células.mL⁻¹ dos cultivos de *M. convolutum* em condição unialgal no meio ASM-1, média e desvio padrão:

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1.345.000	1.185.000	1.405.000	1.311.666	113.724
1	1.075.000	2.460.000	2.125.000	1.886.666	722.605
2	3.820.000	3.590.000	3.970.000	3.793.333	191.398
3	5.300.000	6.200.000	5.420.000	5.641.666	487.553
4	7.350.000	6.700.000	6.387.500	6.812.500	491.012
6	10.890.000	13.887.500	9.460.000	11.412.500	2.259.522
7	11.165.000	12.870.000	14.410.000	12.815.000	1.623.199
8	13.255.000	13.695.000	12.870.000	13.273.333	412.805
9	11.165.000	13.915.000	11.605.000	12.228.333	1.477.170
10	12.650.000	12.210.000	12.430.000	12.430.000	220.000
11	16.610.000	12.650.000	14.410.000	14.556.666	1.984.069
13	13.420.000	13.475.000	13.915.000	13.603.333	271.308
14	13.750.000	16.995.000	15.785.000	15.510.000	1.639.885
15	16.885.000	19.140.000	15.180.000	17.158.333	2.128.205
16	24.035.000	20.900.000	19.305.000	21.413.333	2.406.420
17	26.070.000	22.990.000	26.015.000	25.025.000	1.762.576
18	24.915.000	24.560.000	26.960.000	25.478.333	1.295.379
20	27.600.000	23.920.000	23.920.000	25.146.666	2.124.648
21	24.880.000	23.360.000	26.640.000	24.960.000	1.641.462
22	21.835.000	21.670.000	27.520.000	23.675.000	3.330.889
23	25.440.000	21.280.000	21.040.000	22.586.666	2.473.971
24	26.240.000	22.720.000	28.720.000	25.893.333	3.014.984
27	37.600.000	26.560.000	34.240.000	32.800.000	5.659.116
28	29.520.000	31.200.000	32.880.000	31.200.000	1.680.000
29	35.760.000	29.040.000	37.200.000	34.000.000	4.355.410

Tabela 3 - Número de células.mL⁻¹ dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio Z-8, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	227.500	157.500	187.500	207.500	50.990
2	645.000	870.000	1.145.000	886.666	204.464
5	3.575.000	3.740.000	5.205.000	4.173.333	732.601
7	7.840.000	7.900.000	9.540.000	8.426.666	787.626
9	12.090.000	6.360.000	8.280.000	8.919.000	2.381.302
12	14.600.000	12.180.000	17.480.000	14.753.333	2.166.430
14	17.235.000	14.850.000	18.990.000	17.025.000	1.696.658
16	18.000.000	18.360.000	19.665.000	18.675.000	715.297
20	19.485.000	17.280.000	22.230.000	19.665.000	2.024.833
21	18.810.000	18.540.000	20.250.000	19.200.000	750.599

Tabela 4 - Número de células.mL⁻¹ dos cultivos de *M. convolutum* em condição unialgal no meio Z-8, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	530.000	617.500	765.000	637.500	96.975
2	1.610.000	2.075.000	1.845.000	1.843.333	189.839
5	4.585.000	5.865.000	5.130.000	5.193.333	524.473
7	8.240.000	9.700.000	11.550.000	9.830.000	1.354.424
9	9.270.000	10.290.000	11.490.000	10.350.000	907.303
12	15.200.000	16.000.000	14.600.000	15.266.666	573.488
14	15.795.000	19.150.000	18.585.000	17.843.333	1.466.642
16	15.120.000	22.140.000	20.880.000	19.380.000	3.055.879
20	27.180.000	26.010.000	24.480.000	25.890.000	1.105.531
23	24.840.000	26.550.000	28.530.000	26.640.000	1.507.779
26	-	25.380.000	27.810.000	26.595.000	1.215.000

Tabela 5 - Número de células.mL⁻¹ de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio Z-8 Especial, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1.375.000	795.000	805.000	991.666	296.962
2	1.635.000	1.780.000	1.565.000	1.660.000	98.081
5	7.230.000	6.100.000	-	6.665.000	652.405
7	11.027.500	13.500.000	12.390.000	12.305.833	1.107.656
9	15.190.000	15.295.000	15.925.000	15.470.000	355.555
12	13.410.000	22.275.000	-	17.842.500	-
14	16.655.000	20.475.000	24.840.000	20.656.667	3.663.147
15	28.935.000	22.095.000	28.170.000	26.400.000	3.352.143
20	25.110.000	30.150.000	29.700.000	28.320.000	2.494.586

Tabela 6 - Número de células.mL⁻¹ de *M. convolutum* em condição unialgal no meio Z-8 Especial, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1.100.000	1.250.000	1.255.000	1.201.667	78.782
2	2.135.000	3.080.000	2.895.000	2.703.333	447.936
5	4.450.000	6.030.000	5.730.000	5.403.333	750.537
7	8.470.000	9.830.000	10.840.000	9.713.333	1.063.742
9	17.215.000	13.455.000	15.975.000	15.548.333	1.713.694
14	17.167.500	21.870.000	-	19.518.750	2.714.990

Tabela 7 - Número de células.mL⁻¹ de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio "ASM-1 Reconstituído" com 7 dias, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1.790.000	1.575.000	1.740.000	1.701.667	91.863
1	2.535.000	2.725.000	2.855.000	2.705.000	131.402
2	5.600.000	4.580.000	4.900.000	5.026.667	425.936
3	10.740.000	7.250.000	8.400.000	8.796.667	1.452.133
4	14.760.000	10.740.000	13.170.000	12.890.000	1.653.058
5	17.600.000	19.580.000	15.400.000	17.526.667	1.707.266
6	21.890.000	21.780.000	21.120.000	21.596.667	340.032
8	22.050.000	25.960.000	25.630.000	24.546.667	1.770.542
9	26.730.000	29.150.000	29.040.000	28.306.667	1.115.776
10	44.000.000	29.600.000	28.960.000	34.186.667	6.943.992
12	42.400.000	39.520.000	26.400.000	36.106.667	6.963.626
13	41.415.000	36.410.000	47.680.000	41.835.000	4.610.533
15	43.360.000	43.680.000	40.320.000	42.453.333	1.514.141
19	43.290.000	47.255.000	48.620.000	46.388.333	2.260.613
20	46.240.000	50.400.000	39.840.000	45.493.333	4.343.312
21	37.440.000	41.440.000	50.560.000	43.146.667	5.490.485

Tabela 8 - Número de células.mL⁻¹ de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio "ASM-1 Reconstituído" com 14 dias, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1.550.000	1.830.000	1.615.000	1.665.000	119.652
1	2.805.000	2.695.000	2.575.000	2.691.000	93.626
2	4.480.000	5.060.000	4.790.000	4.776.667	236.971
3	7.550.000	8.580.000	8.675.000	8.268.333	509.416
4	9.750.000	12.360.000	10.830.000	10.980.000	1.070.794
5	14.575.000	14.740.000	15.400.000	14.905.000	356.440
6	18.480.000	20.020.000	19.690.000	19.396.667	662.033
8	23.320.000	20.680.000	25.410.000	23.136.667	1.935.361
9	26.290.000	27.610.000	29.920.000	27.940.000	1.500.200
10	28.960.000	31.040.000	37.440.000	32.480.000	3.608.582
12	34.880.000	39.040.000	33.120.000	35.680.000	2.482.150
13	45.120.000	37.760.000	40.160.000	41.013.333	3.064.695
15	45.760.000	48.000.000	43.360.000	45.706.667	1.894.647
19	46.540.000	44.200.000	41.480.000	44.073.333	2.067.677
20	50.240.000	43.200.000	45.600.000	46.346.667	2.922.161
21	49.120.000	44.160.000	50.560.000	47.946.667	2.741.354

Tabela 9 - Número de células.mL⁻¹ dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio "ASM-1 Reconstituído" com 21 dias, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1.770.000	1.635.000	1.875.000	1.760.000	98.234
1	2.260.000	2.560.000	2.560.000	2.460.000	141.421
2	5.220.000	3.350.000	4.750.000	4.440.000	794.271
3	9.450.000	8.970.000	7.020.000	8.480.000	1.050.809
4	12.420.000	11.100.000	11.370.000	11.630.000	569.385
5	16.390.000	17.270.000	14.355.000	16.005.000	1.220.785
6	24.530.000	19.470.000	18.260.000	20.753.333	2.715.810
8	27.280.000	31.900.000	20.570.000	26.583.333	4.651.611
9	33.880.000	28.490.000	30.360.000	30.910.000	2.234.562
10	38.400.000	41.120.000	28.960.000	36.160.000	5.210.860
12	41.600.000	45.120.000	37.120.000	41.280.000	3.273.815
13	61.600.000	42.240.000	38.720.000	47.520.000	10.059.238
15	47.360.000	47.040.000	37.120.000	43.840.000	4.753.553
19	45.760.000	58.990.000	56.270.000	53.673.333	5.704.690
20	56.320.000	52.160.000	42.560.000	50.346.667	5.761.975
21	64.320.000	60.800.000	57.600.000	60.906.667	2.744.465

CULTIVOS MISTOS:

Tabela 10 - Número de células.mL⁻¹ dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo misto no meio ASM-1, média e desvio Padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	472.500	475.000	465.000	470.833	4.249
1	380.000	450.000	470.000	433.333	38.586
2	1.100.000	1.055.000	730.000	961.666	164.840
3	975.000	1.060.000	900.000	978.333	65.362
5	2.700.000	2.700.000	2.760.000	2.720.000	28.284
6	4.050.000	5.250.000	3.690.000	4.330.000	666.933
7	4.860.000	5.400.000	4.770.000	5.010.000	278.208
8	7.020.000	6.960.000	5.700.000	6.560.000	608.605
9	6.300.000	7.740.000	6.300.000	6.780.000	678.822
11	11.440.000	12.430.000	12.210.000	12.026.667	424.447
12	13.640.000	14.190.000	14.190.000	14.006.667	259.272
13	13.310.000	14.300.000	12.210.000	13.273.333	853.632
15	16.905.000	15.960.000	14.490.000	15.785.000	993.654
18	16.170.000	24.150.000	21.420.000	20.580.000	3.311.525
19	21.420.000	22.890.000	24.780.000	23.030.000	1.375.282
22	32.655.000	21.945.000	23.205.000	25.935.000	5.610.211
25	26.730.000	20.900.000	28.490.000	25.373.333	3.243.705
26	27.500.000	28.820.000	29.150.000	28.490.000	712.881
27	21.890.000	26.620.000	26.840.000	25.116.667	2.283.365
28	24.675.000	30.450.000	30.660.000	28.595.000	2.773.184
29	29.190.000	31.395.000	41.160.000	33.915.000	5.201.476
32	32.340.000	31.290.000	34.860.000	32.830.000	1.498.065
33	33.180.000	37.380.000	45.150.000	38.570.000	4.958.649

Tabela 11 - Número de células.mL⁻¹ de *M. convolutum* em cultivo misto no meio ASM-1, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	540.000	505.000	465.000	503.333	30.641
1	460.000	550.000	660.000	556.666	81.785
2	760.000	760.000	970.000	830.000	98.994
3	1.145.000	950.000	1.020.000	1.038.333	80.657
5	2.200.000	1.650.000	1.780.000	1.883.333	243.903
6	1.890.000	2.550.000	2.130.000	2.190.000	272.763
7	2.520.000	2.910.000	3.420.000	2.950.000	368.510
8	4.200.000	2.940.000	3.580.000	3.580.000	514.587
9	2.640.000	3.840.000	3.960.000	3.480.000	595.986
11	5.170.000	5.090.000	5.500.000	5.353.333	137.194
12	5.170.000	4.620.000	5.610.000	5.133.333	404.996
13	6.050.000	5.170.000	4.180.000	5.133.333	763.864
15	6.510.000	6.195.000	4.830.000	5.845.000	729.143
18	4.935.000	6.930.000	7.140.000	6.335.000	993.654
19	6.615.000	8.400.000	9.975.000	8.330.000	1.372.607
22	8.085.000	5.880.000	8.085.000	7.350.000	1.039.447
25	6.820.000	7.260.000	9.680.000	7.920.000	1.257.405
26	7.810.000	10.780.000	10.780.000	9.790.000	1.400.071
27	8.250.000	8.800.000	9.020.000	8.690.000	323.831
28	8.925.000	9.135.000	12.810.000	10.290.000	1.783.970
29	9.030.000	10.250.000	12.705.000	10.675.000	1.524.811
32	7.980.000	8.820.000	11.340.000	9.380.000	1.427.725
33	7.140.000	8.820.000	9.030.000	8.330.000	845.813

Tabela 12 - Número de células.mL⁻¹ de *S. aquatilis* f. *aquatilis* crescida em cultivo misto no meio Z-8, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	590.000	955.000	675.000	740.000	155.938
2	965.000	697.500	665.000	775.833	134.417
5	1.590.000	1.680.000	-	1.635.000	45.000
7	2.595.000	1.740.000	4.440.000	2.925.000	1.126.699
9	4.680.000	3.200.000	3.360.000	3.746.667	663.190
12	5.960.000	4.040.000	6.200.000	5.400.000	966.643
14	5.800.000	6.570.000	5.840.000	6.070.000	353.930
16	7.380.000	8.955.000	8.145.000	8.160.000	643.078
20	13.905.000	11.070.000	14.355.000	13.110.000	1.454.149
23	10.890.000	11.610.000	10.890.000	11.130.000	339.411
26	13.320.000	10.170.000	11.880.000	11.790.000	1.287.556
28	14.580.000	10.050.000	14.940.000	13.190.000	2.225.174

Tabela 13- Número de células.mL⁻¹ de *M. convolutum* em cultivo misto no meio Z-8, média e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	635.00	767.500	680.000	694.166	55.012
2	1.485.000	1.270.000	975.000	1.243.333	209.058
5	28.650.000	32.400.000	-	3.052.500	-
7	3.060.000	1.785.000	2.940.000	2.595.000	574.847
9	7.200.000	4.960.000	4.880.000	5.680.000	1.075.298
12	6.240.000	6.040.000	5.960.000	6.080.000	117.758
14	7.880.000	10.080.000	7.680.000	8.546.667	1.087.300
16	9.135.000	8.505.000	8.145.000	8.595.000	409.145
20	12.960.000	10.170.000	10.350.000	1.116.000	1.274.912
23	9.720.000	10.224.500	10.060.000	10.001.500	210.074
26	13.140.000	14.400.000	9.540.000	12.360.000	2.059.320
28	13.320.000	10.800.000	15.210.000	13.110.000	1.806.488

CARBOIDRATOS INTRACELULARES E EXTRACELULARES:

CULTIVOS UNIALGAIS:

Tabela 14 - Concentrações de carboidratos intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1,57	1,39	1,36	1,44	0,11
3	0,64	0,87	0,89	0,80	0,13
6	0,92	0,82	1,00	0,91	0,09
10	1,20	1,61	1,73	1,51	0,27
13	1,18	0,90	1,23	1,10	0,17
16	0,96	1,18	1,25	1,13	0,15
20	1,70	1,25	1,51	1,48	0,22
24	2,13	1,66	1,89	1,89	0,23
27	2,23	2,33	-	2,28	0,07
30	3,46	2,64	-	3,05	0,57

Tabela 15 - Concentrações de carboidratos extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1,2	1,00	-	1,1	0,14
3	0,24	0,27	0,26	0,25	0,01
6	0,14	0,3	-	0,22	0,11
10	0,11	0,15	0,17	0,14	0,03
13	0,13	0,18	0,10	0,13	0,04
16	0,17	0,15	0,14	0,15	0,01
20	0,21	0,27	-	0,24	0,04
24	0,51	0,44	0,60	0,51	0,08
27	0,54	0,80	-	0,67	0,18
30	0,34	0,4	0,66	0,46	0,17

Tabela 16 - Concentrações de carboidratos intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *M.convolutum* em condição unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	1,48	1,79	1,74	1,67	0,16
3	-	1,10	1,03	1,06	0,04
6	1,14	1,15	-	1,32	0,25
10	1,05	1,88	-	1,46	0,58
13	1,87	1,72	1,79	1,79	0,07
16	1,27	1,41	-	1,34	0,09
20	0,96	1,03	-	0,99	0,04
24	1,23	1,35	1,18	1,25	0,08
27	1,06	1,25	1,19	1,16	0,09
30	1,14	1,42	1,11	1,22	0,17

Tabela 17 - Concentrações de carboidratos extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *M.convolutum* em condição unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	2,71	3,12	-	2,91	0,21
3	1,13	-	-	1,13	-
6	0,48	0,32	0,23	0,34	0,12
10	0,22	0,15	0,21	0,19	0,03
13	0,17	0,19	0,23	0,19	0,03
16	0,45	0,27	0,23	0,31	0,11
20	0,30	0,20	-	0,25	0,06
24	0,20	0,23	0,18	0,20	0,02
27	0,17	0,22	0,18	0,19	0,02
30	0,23	0,32	0,15	0,23	0,08

Tabela 18 - Concentrações de carboidratos intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal, no meio "ASM-1 Reconstituído" com 7-14 e 21 dias, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
7 dias					
0	1,19	1,57	1,48	1,41	0,19
3	1,36	1,43	-	1,39	0,05
6	1,01	0,94	0,81	0,92	0,10
9	3,33	2,11	1,49	2,31	0,93
12	2,02	1,99	2,95	2,32	0,54
15	2,41	2,36	2,85	2,54	0,26
19	4,12	3,41	3,94	3,82	0,36
21	4,35	4,01	3,52	3,96	0,41
14 dias					
0	1,50	1,85	-	1,68	0,24
3	1,05	1,15	1,09	1,10	0,05
6	0,70	0,90	0,83	0,81	0,10
9	1,31	1,66	1,63	1,53	0,19
12	1,28	1,80	1,84	1,64	0,31
15	1,56	1,96	2,16	1,89	0,30
19	1,92	2,71	3,48	2,70	0,78
21	1,86	2,46	2,31	2,21	0,31
21 dias					
0	1,85	1,60	1,29	1,58	0,28
3	1,05	1,26	1,27	1,19	0,12
6	0,56	0,43	0,49	0,49	0,06
9	1,65	1,35	1,30	1,43	0,19
12	1,94	1,61	1,61	1,72	0,18
15	2,82	2,66	2,23	2,62	0,21
19	3,20	3,25	2,26	2,90	0,55
21	2,53	2,73	3,09	2,78	0,28

Tabela 19 - Concentrações de carboidratos extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em condição unialgal, no meio "ASM-1 Reconstituído" com 7-14 e 21 dias, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
7 dias					
0	3,50	3,83	2,67	3,33	0,18
3	0,48	0,73	0,61	0,61	0,06
6	0,31	0,33	0,27	0,30	0,02
9	0,33	0,22	0,35	0,30	0,06
12	0,22	0,21	0,40	0,28	0,09
15	0,14	0,21	0,29	0,21	0,06
19	0,26	0,28	0,18	0,24	0,04
21	0,42	0,43	0,32	0,39	0,05
14 dias					
0	2,87	2,60	-	2,73	0,15
3	0,96	1,19	1,54	1,23	0,13
6	0,33	0,33	0,40	0,35	0,03
9	0,26	0,27	0,19	0,24	0,03
12	0,24	0,19	0,28	0,24	0,04
15	0,20	0,19	0,24	0,21	0,02
19	0,24	0,33	0,38	0,32	0,06
21	0,27	0,46	0,33	0,35	0,08
21 dias					
0	2,11	2,91	-	2,51	0,56
3	0,82	0,99	0,82	0,88	0,08
6	0,22	0,27	0,30	0,26	0,03
9	0,25	0,22	-	0,23	0,01
12	0,20	0,24	-	0,22	0,02
15	0,21	0,25	-	0,23	0,02
19	0,29	0,21	-	0,25	0,04
21	0,13	0,15	-	0,14	0,01

CULTIVOS MISTO:

Tabela 20 - Concentrações de carboidratos intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos mistos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	2,93	3,23	-	3,08	0,21
3					
6	1,83	2,08	1,90	1,93	0,12
9	4,42	3,11	3,10	3,54	0,75
12	2,51	2,18	2,81	2,50	0,31
15	1,77	1,95	3,87	2,53	1,16
18	3,70	2,90	2,10	2,90	0,80
22	5,10	4,88	-	4,99	0,15
25	7,42	9,29	7,00	7,90	1,21
29	7,54	8,90	-	8,22	0,96
32	15,10	16,70	15,30	15,70	0,87
33	12,75	14,10	12,80	13,21	0,76

Tabela 21 - Concentrações de carboidratos extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos mistos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
15	0	0,23	0,47	0,23	0,22
18	0,64	0,44	0,37	0,48	0,12
22	0,41	0,46	0,63	0,50	0,08
25	0,87	1,26	0,74	0,96	0,24
29	1,25	1,13	1,04	1,14	0,08
32	1,61	1,50	1,43	1,51	0,08
33	1,33	1,47	1,20	1,33	0,11

PROTEÍNAS INTRACELULARES E EXTRACELULARES:

CULTIVOS UNIALGAIS:

Tabela 22 - Concentrações de proteínas intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,13	0,51	0,72	0,45	0,30
3	0,84	1,12	1,06	1,01	0,15
6	0,85	1,09	1,21	1,05	0,21
10	1,20	1,24	1,00	1,15	0,12
13	1,20	1,01	1,27	1,16	0,13
16	1,13	0,82	1,76	1,24	0,48
20	2,10	1,72	2,36	2,06	0,31
24	1,71	2,09	2,00	1,93	0,19
27	0,72	1,43	1,03	1,06	0,35
30	0,96	0,86	0,87	0,90	0,05

Tabela 23 - Concentrações de proteínas extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
13	0,01	0,04	-	0,03	0,01
16	0,02	0,04	0,04	0,03	0,01
20	0,01	-	0,04	0,02	0,02
24	0,11	0,12	0,13	0,12	0,01
27	0,07	0,14	0,11	0,10	0,03
30	0,11	0,10	0,14	0,12	0,02

Tabela 24 - Concentrações de proteínas intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) de *M. convolutum* em cultivo unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0	0	0	0	0
3	0,44	0,29	0,27	0,34	0,09
6	0,46	0,47	0,86	0,60	0,22
10	0,27	0,17	0,35	0,26	0,09
13	0,28	0,34	0,33	0,32	0,03
16	0,30	0,44	-	0,37	0,09
20	1,21	1,35	1,25	1,27	0,07
24	1,29	1,35	1,14	1,26	0,11
27	0,80	0,83	0,75	0,79	0,04
30	0,49	0,83	1,00	0,77	0,31

Tabela 25 - Concentrações de proteínas extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) de *M. convolutum* em cultivo unialgal no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
16	0	0	0,05	0,01	0,03
20	0,01	0	0	0,004	0,00
24	0,02	0	0	0,009	0,01
27	0,05	0,04	0,07	0,05	0,01
30	0,20	0,15	0,09	0,15	0,05

Tabela 26 - Concentrações de proteínas intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo unialgal no meio "ASM-1 Reconstituído" com 7-14 e 21 dias, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
7 dias					
0	0,75	0,61	0,34	0,68	0,07
3	0,77	0,86	1,21	0,81	0,05
6	1,10	1,10	1,00	1,06	0,05
9	0,96	0,94	0,84	0,95	0,01
12	0,40	0,60	1,00	0,66	0,27
15	0,55	0,60	0,65	0,60	0,04
19	0,91	0,92	0,86	0,91	0,00
21	1,29	1,17	1,60	1,23	0,06
14 dias					
0	0,46	0,66	0,25	0,56	0,11
3	1,00	0,90	0,90	0,93	0,05
6	0,40	0,50	0,50	0,46	0,05
9	0,90	0,90	0,70	0,90	0,09
12	0,80	0,80	0,50	0,80	0,09
15	0,59	0,59	0,61	0,59	0,01
19	1,05	1,04	0,90	1,04	0,00
21	1,17	1,32	1,07	1,32	0,08
21 dias					
0	0,17	0,08	0,70	0,70	0,00
3	1,11	0,90	1,00	1,00	0,09
6	0,40	0,50	0,50	0,46	0,05
9	0,60	0,70	0,80	0,65	0,05
12	0,50	0,50	0,60	0,50	0,00
15	0,50	0,60	0,70	0,60	0,08
19	0,60	0,70	0,90	0,65	0,05
21	0,90	0,90	1,00	0,93	0,00

Tabela 27 - Concentrações de proteínas extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo unialgal no meio "ASM-1 Reconstituído" com 7-14 e 21 dias, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
7 dias					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
9	0,01	0,02	0,03	0,02	0,00
12	0,04	0,05	0,07	0,05	0,01
15	0,13	0,14	0,11	0,12	0,01
19	0,18	0,16	0,16	0,17	0,01
21	0,28	0,20	0,18	0,24	0,04
14 dias					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0,03	0,01	0,01
9	0	0	0,03	0,01	0,01
12	0,01	0,06	0,08	0,05	0,03
15	0,06	0,10	0,09	0,08	0,01
19	0,12	0,17	0,19	0,14	0,02
21	0,10	0,20	0,20	0,16	0,05
21 dias					
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0,01	0,00	0,00
9	0,05	0,07	0,04	0,06	0,00
12	0,10	0,08	0,03	0,09	0,01
15	0,12	0,10	0,13	0,11	0,01
19	0,13	0,15	0,11	0,14	0,01
21	0,13	0,15	0,12	0,14	0,01

CULTIVOS MISTOS:

Tabela 28 - Concentrações de proteínas intracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos mistos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,98	0,86	1,23	1,02	0,16
3	1,46	1,76	1,22	1,48	0,24
6	1,05	0,85	1,25	1,05	0,17
9	1,51	1,29	1,25	1,35	0,12
12	0,96	0,86	0,85	0,89	0,05
15	1,89	2,06	-	1,98	0,09
18	1,22	1,18	0,97	1,12	0,12
22	0,92	1,42	1,29	1,35	0,07
25	1,36	1,20	1,13	1,23	0,10
29	0,80	1,19	0,81	0,93	0,19
32	1,20	1,23	1,00	1,14	0,11
33	1,03	0,83	0,63	0,83	0,17

Tabela 29 - Concentrações de proteínas extracelulares ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos mistos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* no meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0,49	0,22	0,35	0,15
9	0,37	0,60	0,54	0,57	0,03
12	0,59	0,74	0,85	0,79	0,06
15	0,57	0,65	-	0,61	0,04
18	0,58	0,72	0,50	0,60	0,09
22	0,58	0,76	0,67	0,67	0,08
25	0,58	0,43	0,62	0,54	0,09
29	0,53	0,58	0,48	0,53	0,04
32	0,64	0,59	0,54	0,59	0,04
33	0,46	0,65	0,36	0,49	0,13

CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA *a*:

CULTIVOS UNIALGAIS:

Tabela 30 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos unialgais de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,09	0,08	0,10	0,09	0,01
3	0,11	0,11	0,12	0,11	0,00
6	0,13	0,13	0,14	0,13	0,00
10	0,14	0,15	0,18	0,15	0,02
13	0,15	0,13	0,16	0,14	0,01
16	0,15	0,14	0,17	0,15	0,01
20	0,26	0,20	0,30	0,25	0,05
24	0,18	0,20	0,19	0,19	0,01
27	0,12	0,21	0,15	0,16	0,04
30	0,14	0,13	0,15	0,14	0,01

Tabela 31 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos unialgais de *M.convolutum* em meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,39	0,45	0,38	0,40	0,03
3	0,30	0,28	-	0,29	0,01
6	0,47	0,49	0,45	0,47	0,02
10	0,46	0,46	-	0,46	0,00
13	0,48	0,48	-	0,48	0,00
16	0,38	0,41	-	0,39	0,02
20	0,47	0,7	0,53	0,56	0,11
24	0,43	0,47	0,39	0,43	0,04
27	0,33	0,44	0,33	0,37	0,06
30	0,27	0,26	-	0,26	0,00

Tabela 32 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos unialgais de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em meio Z-8, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,14	-	-	0,14	-
2	0,22	-	-	0,22	-
5	0,09	-	-	0,09	-
7	0,08	0,10	0,09	0,09	0,01
9	0,18	0,17	-	0,17	0,00
12	0,10	-	-	0,10	-
14	0,09	0,11	0,10	0,10	0,01
16	0,10	0,13	0,10	0,11	0,01
20	0,10	0,11	0,10	0,10	0
21	0,10	0,12	0,11	0,11	0,01

Tabela 33 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos unialgais de *M. convolutum* em meio Z-8, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	-	-	-	-	-
2	0,13	-	-	0,13	-
5	0,26	0,25	0,27	0,26	0,01
7	0,24	0,25	-	0,24	0,00
9	0,23	0,18	0,16	0,19	0,03
12	0,22	0,23	0,27	0,24	0,02
14	0,26	0,25	0,19	0,23	0,03
16	0,29	0,26	-	0,27	0,02
20	0,20	0,21	-	0,20	0,00
21	-	-	-	-	-

Figura 34 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos unialgais de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em meio ASM-1 Reconstituído com 7,14 e 21 dias, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
7 dias					
0	0,19	0,22	0,20	0,20	0,01
3	0,11	0,13	0,13	0,12	0,01
6	0,10	0,11	0,11	0,10	0,00
9	0,11	0,11	0,11	0,11	0
12	0,08	0,09	-	0,08	0,00
15	0,09	0,09	0,10	0,09	0,00
19	0,09	0,09	0,09	0,09	0
21	0,11	0,11	0,10	0,10	0,00
14 dias					
0	0,22	0,19	0,21	0,20	0,01
3	0,16	0,14	0,12	0,14	0,02
6	0,11	0,12	0,12	0,11	0,00
9	0,14	0,12	-	0,13	0,01
12	0,12	0,10	0,11	0,11	0,01
15	0,10	0,09	0,09	0,09	0,00
19	-	0,10	0,11	0,10	0,00
21	0,11	0,10	0,10	0,10	0,00
21 dias					
0	0,20	0,16	0,18	0,18	0,02
3	0,13	0,11	0,16	0,13	0,02
6	0,10	0,09	0,12	0,10	0,01
9	0,11	0,11	0,10	0,10	0,00
12	0,10	0,09	0,10	0,09	0,00
15	0,09	0,10	0,11	0,10	0,01
19	0,10	0,09	0,09	0,09	0,00
21	0,08	0,09	0,09	0,08	0,00

CULTIVOS MISTO:

Tabela 35 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos mistos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em meio ASM-1, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,15	0,19	0,19	0,17	0,02
3	0,24	0,24	0,22	0,23	0,01
6	0,24	0,21	0,25	0,23	0,02
9	0,30	0,28	0,31	0,29	0,01
12	0,24	0,24	0,24	0,24	0,00
15	0,21	0,27	0,31	0,26	0,05
18	0,36	0,27	0,29	0,30	0,04
22	0,22	0,37	0,33	0,30	0,07
25	0,31	0,37	0,28	0,32	0,04
29	0,24	0,24	0,18	0,22	0,03
32	0,23	0,26	0,22	0,23	0,02
33	0,22	0,21	0,18	0,20	0,02

Tabela 36 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) dos cultivos mistos de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em meio Z-8, médias e desvio padrão.

Dias	R-1	R-2	R-3	Média	D.Padrão
0	0,10	-	-	0,10	-
2	0,16	-	-	0,16	-
5	0,14	0,18	-	0,16	0,02
7	0,24	-	-	0,24	-
9	0,15	0,15	-	0,15	-
12	0,19	0,22	-	0,20	0,02
14	0,18	0,17	0,19	0,18	0,01
16	0,19	0,19	-	0,19	0
20	0,14	0,17	0,16	0,15	0,01
23	0,14	-	-	0,14	-
26	0,11	0,10	0,13	0,11	0,15

**ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS CULTIVOS UNIALGAIS E MISTOS, NOS
MEIOS ASM-1, "ASM-1 Reconstituído", Z-8 e "Z-8 Especial".**

Tabela 37 - Valores e comparação de média pelo Teste de Tukey, após análise de variância, para o parâmetro taxa de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis* cultivada em condições **unialgais** nos meios ASM-1, "ASM-1 Reconstituído", Z-8 e "Z-8 Especial".

Variável	Média
ASM-1	0,28 A
"Z-8 Especial"	0,36 A
"ASM-1 07 dias Reconstituído" 14 dias	0,43 B
21 dias	0,44 B
Z-8	0,46 B C
	0,54 C

Existem três grupos nos quais as médias são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Tabela 38 - Valores e comparação de média pelo Teste de Tukey, após análise de variância, para o parâmetro taxa de crescimento de *M. convolutum* cultivada em condições **unialgais** nos meios ASM-1, Z-8 e "Z-8 Especial".

Variável	Média
"Z-8 Especial"	0,29 A
Z-8	0,38 B
ASM-1	0,40 B

Existem dois grupos nos quais as médias são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Tabela 39 - Valores e comparação de média pelo Teste de Tukey, após análise de variância, para o parâmetro taxa de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis* e *M. convolutum* em cultivos mistos nos meios ASM-1 e Z-8.

Variável	Média	
	<i>S. aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>	<i>M. convolutum</i>
ASM-1	0,38 A	0,26 B
Z-8	0,22 B	0,29 B

Existem dois grupos nos quais as médias são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Tabela 40 - Valores e comparação de média pelo Teste T para amostras independentes, das taxas de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis* em cultivo misto e unialgal no meio ASM-1.

Variável	Média
Unialgal	0,28 A
Mista	0,38 B

As taxas de crescimento obtidas nas duas condições de cultivo são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Tabela 41 - Valores e comparação de média pelo Teste T para amostras independentes, das taxas de crescimento de *S. aquatilis* f. *aquatilis* crescidas em cultivo **misto** e **unialgal** no meio **Z-8**.

Variável	Média
Unialgal	0,54 A
Mista	0,22 B

As taxas de crescimento obtidas nas duas condições de cultivo são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Tabela 42 - Valores e comparação de média pelo Teste T para amostras independentes, das taxas de crescimento de *M. convolutum* em cultivo **misto** e **unialgal** no meio **ASM-1**.

Variável	Média
Unialgal	0,40 A
Mista	0,26 B

As taxas de crescimento obtidas nas duas condições de cultivo são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Tabela 43 - Valores e comparação de média pelo Teste T para amostras independentes, das taxas de crescimento das células de *M. convolutum* crescidas em cultivo misto e unialgal no meio Z-8.

Variável	Média
Unialgal	0,38 A
Mista	0,29 B

As taxas de crescimento obtidas nas duas condições de cultivo são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.