UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRAULICA E SANEAMENTO

LAÍS ALBUQUERQUE GIRALDI

**Efeitos da concentração de micronutrientes no crescimento e na
produção de saxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii***

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRAULICA E SANEAMENTO

LAÍS ALBUQUERQUE GIRALDI

**Efeitos da concentração de micronutrientes no crescimento e na
produção de saxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii***

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Titular Maria do Carmo Calijuri

São Carlos

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

G516e Giralddi, Laís Albuquerque
 Efeitos da concentração de micronutrientes no
 crescimento e na produção de saxitoxina em
 Cylindrospermopsis raciborskii / Laís Albuquerque
 Giralddi; orientadora Maria do Carmo Calijuri. São
 Carlos, 2014.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
 e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
 Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
 São Paulo, 2014.

 1. Cianobactéria. 2. Cianotoxinas. 3. Metal -
 traço. 4. Saxitoxina. 5. Ecofisiologia. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **LAÍS ALBUQUERQUE GIRALDI**.

Título da dissertação: "Efeitos da concentração de micronutrientes no crescimento e na produção de saxitoxina em *Cylindrospermopsis Raciborskii*".

Data da defesa: 30/09/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Titular **Maria do Carmo Calijuri (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Ana Teresa Lombardi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **André Cordelro Alves dos Santos**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Aos meus pais Carlos e Cíntia, ao meu irmão Enzo e ao meu noivo
Carlos, por partilharem com carinho, amor e dedicação todos os
momentos mais marcantes de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo à Prof.^a Maria do Carmo Calijuri, pela orientação e confiança depositada nesta pesquisa. Obrigada pela paciência, conselhos e ensinamentos que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa e para meu crescimento profissional.

Às agências de fomento CNPq, pela concessão de bolsa, e FAPESP pelos recursos para compra de materiais.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, pela infraestrutura concedida e aos funcionários Sá, Priscila, Rose, Flávia, Fernanda e André, pela atenção, auxílio técnico e administrativo.

Ao Prof. Dr. André Cordeiro Alves Dos Santos e Prof.^a Ana Teresa Lombardi, muito obrigada pelas críticas e recomendações na qualificação e em outros momentos durante o mestrado.

Aos pesquisadores do Laboratório BIOTACE: técnicas Luci e Adriana, colegas Sarah, Paulo, Simone, Tácyo, Davi, Raquel, Patrícia e Vitória, obrigada pelo suporte técnico, pelas confraternizações de aniversário, pela convivência, pelas conversas, momentos de descontração e por me acolherem tão bem a este grupo de pesquisa.

Agradecimento especial à Ms. Sarah Regina Vargas e ao Dr. Paulo Vagner dos Santos. Obrigada pela amizade e companheirismo durante todo o mestrado, por me ensinarem com tanta dedicação, paciência e carinho, pelas valiosas orientações e sugestões para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos pesquisadores do LATAR: técnica Teresa, Andressa, Karen, Paulo, Araceli, Gabriel, Gabriela e Eloá pelas sugestões, conversas e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Penalva Reali por conceder gentilmente o espectrofotômetro quando foi necessário.

Ao Prof. Luiz Antonio Daniel por permitir a utilização da água miliQ para realização das soluções desta pesquisa.

À Prof.^a Maria Bernadete A. Varesche por me proporcionar a experiência da monitoria (PAE) na sua disciplina.

Aos amigos do mestrado Juliana, Karen, Carla, Carol, Camila, Araceli, Paulo, Tácyo, Bruno, Cebola, Matheus e Seu Jorge pela amizade e pelos momentos de descontração em todo o percurso do mestrado.

Aos amigos de Capivari, pela compreensão da minha ausência, pelo carinho, atenção e descontração nos momentos difíceis.

A amiga Amanda, obrigada pela amizade e apoio, mesmo que à distância, e pela compreensão de minha ausência devido às dificuldades do mestrado.

A amiga Andressa, pela amizade, companheirismo e paciência. Obrigada pelas palavras de motivação e apoio durante todos esses anos de convivência e amizade.

Aos meus pais Carlos e Cíntia por sempre me incentivarem a estudar e realizar minhas vontades profissionais, não mediram esforços para conclusão de mais uma etapa de minha vida.

Ao meu irmão Enzo, sempre presente em todas as fases de minha vida, compartilhando todos os momentos. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo.

Ao meu noivo Carlos pelo constante incentivo, otimismo e paciência durante todos esses anos. Por me ajudar a superar os desafios durante o mestrado, pelos conselhos e compreensão.

À todos os amigos e familiares que de alguma forma colaboraram com esta pesquisa e com o meu crescimento como pessoa e profissional.

À Deus por colocar em meu caminho estas pessoas tão queridas às quais agradeço.

“A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe. Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida.”

Chico Xavier

RESUMO

GIRALDI, L. A. **Efeitos da concentração de micronutrientes no crescimento e na produção de saxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii***. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

A espécie de cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* vem se destacando na literatura atual devido à sua presença e dominância em lagos e reservatórios em diversas regiões do planeta e a principal preocupação deste cenário é por ela ser potencialmente tóxica. Estudos revelaram que o crescimento e a síntese de toxinas em espécies de microrganismos fitoplanctônicos estão atrelados à limitação ou excesso de micronutrientes, porém, ainda são desconhecidos os efeitos desta variação na produção de saxitoxina (STX) por *C. raciborskii*. Para contribuir com o esclarecimento desta questão, investigou-se o efeito de diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B no crescimento e na produção de STX de uma linhagem de *C. raciborskii*. Em salas climatizadas, culturas desta linhagem foram expostas durante 20 dias a 5 concentrações de cada micronutriente, com alteração do meio de cultura ASM-1. As respostas fisiológicas de *C. raciborskii* a estas modificações foram verificadas através da velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), rendimento do biovolume, tempo de duplicação (T_d), concentração de clorofila *a*, assimilação de nitrato e ortofosfato e síntese de STX total (intra e extracelular). As maiores concentrações de STX por biovolume (STX/biovolume) foram obtidas nos tratamentos com baixa concentração de Fe (0,4 μM) e elevada concentração de Cu (0,8 μM). Nos micronutrientes Zn, Co e B, houve uma tendência de redução da síntese de STX nas maiores concentrações destes metais. Enquanto as concentrações extremas de Fe e Mn inibiram o crescimento (Fe: 0,4 e 400 μM e Mn: 0,7 e 600 μM), as concentrações centrais favoreceram (Fe: 4 a 60 μM e Mn: 7 a 200 μM). Elevada concentração de Cu (0,8 μM) causou aumento de 2,6 vezes (160%) do volume celular e redução na síntese de clorofila *a*, sem alterações significativas em $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento. O aumento da concentração dos micronutrientes Fe, Zn, Mn e B no meio de cultura causaram maior assimilação de ortofosfato por biovolume (P/biovolume). Estes principais resultados demonstraram que os micronutrientes afetam a síntese de STX e o crescimento de *C. raciborskii*, podendo ser associados aos diversos mecanismos de captura e detoxificação de metais que as cianobactérias possuem. Embora as extrapolações dos resultados laboratoriais para o ambiente devam ser realizadas com prudência, estudos relacionados à ecofisiologia de cianobactérias como este, são fundamentais para análise criteriosa de cada variável podendo ser utilizado como ferramenta de diagnóstico e prevenção de florações tóxicas.

Palavras-chave: Cianobactéria. Cianotoxinas. Metal-traço. Saxitoxina. Ecofisiologia.

ABSTRACT

GIRALDI, L. A. **Micronutrient concentration effects in *Cylindrospermopsis raciborskii* growth and saxitoxin production.** 2014. 119 f. Master's Degree Dissertation - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Cylindrospermopsis raciborskii has been highlighted in several researches due to the dominance in many lakes and reservoirs around the world, the main concern about it due to the ability to produce toxins. Studies have revealed that growth and toxins production in phytoplankton species are linked to micronutrients limitation or excess. Nevertheless, micronutrient variation effects on saxitoxin (STX) production by *C. raciborskii* are still unknown. To contribute to clarify this issue, we investigated the effect of different micronutrients concentration, such as Fe, Zn, Cu, Mn, Co and B, on the growth and saxitoxin production of *C. raciborskii* strain. In climatized growth room, the cultures of *C. raciborskii* strain were exposed to 5 different concentration of each micronutrient, present in ASM-1 medium, during 20 days. The *C. raciborskii* physiological responses was detected through maximum growth rate ($\mu_{\text{máx}}$), biovolume yield, doubling time (T_d), chlorophyll-*a*, nitrate and orthophosphate assimilation and the total STX production (intra and extracellular). The higher concentrations of STX per biovolume (STX/biovolume) were observed in treatments with low Fe concentration (0.4 μM) and high Cu concentrations (0.8 μM). Higher concentrations of Zn, Co and B lead to low STX production. While the Fe and Mn extreme concentrations inhibited the growth (Fe: 0.4 and 400 μM and Mn: 0.7 to 600 μM), the central concentrations favored (Fe: 4 to 60 μM , and Mn: 7-200 μM). A high Cu concentration (0.8 μM) leads to 2,6 fold increase (160%) in cellular volume and decrease the chlorophyll-*a* content, however $\mu_{\text{máx}}$ and biovolume yield did not change. Increasing the Fe, Zn, Mn and B concentration in the culture caused higher assimilation of orthophosphate per biovolume (P/biovolume). These results indicated that micronutrients affected *C. raciborskii* growth and STX production, and may be associated with the diverse cyanobacterial mechanisms of metals capture and detoxification. Cyanobacteria ecophysiology studies, as this research, are fundamental to careful analysis of each variable, which could be used as diagnostic and a tool to prevention of toxic blooms.

Keywords: Cyanobacteria. Cyanotoxins. Trace metal. Saxitoxin. Ecophysiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral da saxitoxina (SIVONEN; JONES, 1999)	34
Figura 2 - Banco de microalgas e cianobactérias do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE), Escola de Engenharia de São Carlos/USP.....	39
Figura 3 – Diferença na coloração das culturas de <i>C. raciborskii</i> em resposta a modificação na concentração de nitrato, com a relação N:P 25:1, 10:1 e 5:1, da esquerda para a direita....	41
Figura 4 - Tubos de policarbonato (NALGENE) com cultivo de <i>C. raciborskii</i>	42
Figura 5 - Varredura de cultura de <i>C. raciborskii</i> indicando os picos de absorbância na faixa da clorofila (436 e 680 nm).	44
Figura 6 - Regressão linear entre peso seco (SST) e absorbância (DO) em comprimento de onda de 750nm.	44
Figura 7 - Fluxograma das principais etapas do planejamento experimental.	48
Figura 8 - Fluxograma da 1ª etapa do planejamento experimental.	51
Figura 9 - Fluxograma da 2ª etapa do planejamento experimental.	53
Figura 10 - Fluxograma da 3ª etapa do planejamento experimental.	56
Figura 11 - Exposição das culturas às etapas do planejamento experimental.....	57
Figura 12 - Fluxograma da 4ª etapa do planejamento experimental.	58
Figura 13 - Comparação das velocidades de crescimento nos tratamentos com alteração isolada de bicarbonato (A), pH (B) e intensidade de luz (C). Efeito de interação do pH e da luz na velocidade de crescimento (D) (Fonte: software STATISTICA).	61
Figura 14 - Gráfico com as médias das concentrações totais de STX nos dias 0, 5 e 20 do tratamento Controle. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	62
Figura 15 - Curva de crescimento normalizada de <i>C. raciborskii</i> em tratamento Controle, com meio de cultura ASM-1 durante 20 dias. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	63
Figura 16 - Gráfico com as médias das concentrações de STX por biovolume (10^{-5} pg.µm ⁻³) nos dias 0, 5 e 20 do tratamento ASM-1. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	63
Figura 17 - Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a 5 concentrações de Ferro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	66
Figura 18 - Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a 5 diferentes concentrações de Zinco durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	67

Figura 19 - Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a 5 diferentes concentrações de Cobre durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	69
Figura 20 - Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a 5 diferentes concentrações de Manganês durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	70
Figura 21 - Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a 5 diferentes concentrações de cobalto durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	72
Figura 22 - Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Boro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	73
Figura 23 - Gráfico comparativo dos valores de rendimento em biovolume de <i>C. raciborskii</i> exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	74
Figura 24 - Gráfico comparativo dos valores de velocidade máxima de crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	75
Figura 25 - Evolução das concentrações de clorofila <i>a</i> durante cultivo de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de ferro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	76
Figura 26 - Evolução das concentrações de clorofila <i>a</i> durante cultivo de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de zinco. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	77
Figura 27 - Evolução das concentrações de clorofila <i>a</i> durante cultivo de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de cobre. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	78
Figura 28 - Evolução das concentrações de clorofila <i>a</i> durante cultivo de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de manganês. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	79
Figura 29 - Evolução das concentrações de clorofila <i>a</i> durante cultivo de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de cobalto. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	79
Figura 30 - Evolução das concentrações de clorofila <i>a</i> durante cultivo de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de boro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	80

Figura 31 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de ferro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	82
Figura 32 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de zinco. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	83
Figura 33 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de cobre. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	84
Figura 34 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de manganês. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	86
Figura 35 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de cobalto. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	87
Figura 36 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de boro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	88
Figura 37 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Ferro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)	90
Figura 38 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Zinco durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)	91
Figura 39 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Cobre durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)	92
Figura 40 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Manganês durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)	93
Figura 41 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Cobalto durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)	94

Figura 42 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por <i>C. raciborskii</i> exposta a cinco diferentes concentrações de Boro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	94
Figura 43 - Gráfico comparativo da concentração de STX produzida por <i>C. raciborskii</i> no dia 5, exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	95
Figura 44 - Gráfico comparativo da concentração de STX produzida por <i>C. raciborskii</i> no dia 20, exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de saxitoxina relatadas de diversas linhagens de cianobactérias de amostras de florações, com suas respectivas toxicidade.....	33
Tabela 2 – Estudos laboratoriais centrados na variação da concentração de saxitoxina produzida por <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> em diferentes condições de cultivo.	36
Tabela 3 - Composição do meio de cultura ASM-1 segundo GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964, com modificação na concentração de N (2,5 vezes maior). Concentrações finais em mg.L ⁻¹ e em µM.	40
Tabela 4 - Planejamento fatorial para determinação das melhores condições de crescimento.	50
Tabela 5 - Fatores e níveis dos tratamentos da 1ª etapa.	50
Tabela 6 - Concentrações modificadas dos micronutrientes isoladamente, a partir das concentrações do meio de cultura ASM-1.....	55
Tabela 7 - Efeito dos fatores na velocidade de crescimento. Linhas vermelhas indicam fatores com efeito significativo na velocidade de crescimento de <i>C. raciborskii</i>	60
Tabela 8 - Velocidade máxima de crescimento e tempo de duplicação de cultivo de <i>C. raciborskii</i> em oito condições experimentais com variação de luz, pH e concentração de bicarbonato durante 30 dias. Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão (n=3).	61
Tabela 9 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de <i>C. raciborskii</i> , exposta a 5 concentrações de ferro durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).	66
Tabela 10 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de <i>C. raciborskii</i> , exposta a 5 concentrações de zinco durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).	68
Tabela 11 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de <i>C. raciborskii</i> , exposta a 5 concentrações de cobre durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).	69
Tabela 12 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de <i>C. raciborskii</i> , exposta a 5 concentrações de manganês durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).	71

Tabela 13 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de <i>C. raciborskii</i> , exposta a 5 concentrações de cobalto durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).....	72
Tabela 14 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de <i>C. raciborskii</i> , exposta a 5 concentrações de boro durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).....	73
Tabela 15 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de ferro.	82
Tabela 16 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de zinco.	84
Tabela 17 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de cobre.	85
Tabela 18 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de manganês.	86
Tabela 19 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de cobalto.	87
Tabela 20 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de boro.....	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
ANOVA	Análise de variância
B	Boro
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu	Cobre
DA	<i>Domoic acid</i> (Ácido domóico)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fe	Ferro
GTX5	Goniautoxina 5
LD ₅₀	Dose capaz de matar 50% dos indivíduos
Mn	Manganês
NID	Nitrogênio inorgânico dissolvido
DO	Densidade óptica
PSP	<i>Paralytic Shellfish Poison</i> (Veneno paralisante de moluscos)
STX	Saxitoxina
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1. A Cianobactéria <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	30
3.2. Efeitos dos micronutrientes no crescimento de <i>C. raciborskii</i>	31
3.3. A Saxitoxina (STX)	32
3.4. Efeitos dos micronutrientes na síntese de toxinas	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Cepa de Cianobactéria e Condições de Cultivo	39
4.1.1. Origem da Cepa	39
4.1.2. Manutenção do inóculo	39
4.1.3. Modificações no meio ASM-1	40
4.1.4. Preparo do meio de cultura	42
4.2. Monitoramento do crescimento	43
4.3. Análise de Nutrientes dissolvidos e Clorofila <i>a</i>	46
4.4. Determinação de saxitoxina	46
4.5. Axenização da cepa	47
4.6. Planejamento Experimental	48
4.7. Análises estatísticas dos dados	59
5. RESULTADOS	60
5.1. 1ª Etapa: Melhor condição de cultivo	60
5.2. 2ª Etapa: Caracterização da concentração de saxitoxinas ao longo do crescimento ..	62
5.3. 3ª e 4ª Etapas: Caracterização das fases de crescimento e resposta fisiológica de <i>C. raciborskii</i> à variação dos micronutrientes	64
5.3.1. Caracterização do crescimento de <i>C. raciborskii</i> exposta a diferentes concentrações de micronutrientes.	64
5.3.2. Clorofila <i>a</i>	75
5.3.3. Nutrientes	80
5.3.4. Síntese de saxitoxina por <i>C. raciborskii</i> exposta a diferentes concentrações de micronutrientes	88
6. DISCUSSÃO	97
7. CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

1. INTRODUÇÃO

Compreender os fatores que estimulam florações de cianobactérias é de grande interesse para instituições responsáveis pelo fornecimento de água para a população, pois este evento pode alterar odor e gosto da água, além de ocasionar desequilíbrios ecológicos no ambiente aquático.

No entanto, o principal problema das florações de cianobactérias está associado à saúde pública já que esses microrganismos, em sua maioria, são produtores de toxinas. Estes metabólitos secundários afetam organismos aquáticos e terrestres através do consumo de alimentos - devido à bioacumulação da cianotoxina na cadeia trófica - e/ou ingestão da água contaminada com toxina. Estas podem afetar o tecido hepático (hepatotoxina), o sistema nervoso (neurotoxina) e a epiderme (dermatotoxinas)

A variação de fatores ambientais, como por exemplo, intensidade de luz, temperatura, concentração de macronutrientes e micronutrientes e interação com outros organismos aquáticos, podem alterar os níveis de toxina das florações. Estes fatores estão sendo reproduzidos por pesquisadores, em ensaios laboratoriais, para investigar seus efeitos na síntese de toxina pelas cianobactérias.

É fato que a variação na concentração de micronutrientes, interfere no crescimento dos grupos fitoplânctônicos. No entanto, são escassos os estudos relacionando esta variável com a produção de toxina, sendo em sua maioria relativas à síntese de STX por dinoflagelados marinhos e de microcistina por *Microcystis sp.*

Também são escassas as investigações sobre a produção de saxitoxinas (STX) pela espécie de cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. Estudos realizados com *C. raciborskii* associaram a produção de STX a variações de temperaturas, a diferentes valores de pH e concentração de sódio, a alterações na intensidade de luz, a altas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e variações na relação N: P em interação com clorofíceas. Em todas estas, houve modificação na produção de STX. Porém, ainda são desconhecidos os efeitos da variação de concentração dos micronutrientes na produção de STX por esta espécie.

Para esclarecer esta questão, foram investigadas as respostas ecofisiológicas de *C. raciborskii* (produtora de saxitoxina) exposta a diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B.

As evidências encontradas neste estudo podem contribuir com as atuais investigações sobre os fatores que permitem a dominância de *C. raciborskii* em lagos e reservatórios em

diversas regiões do planeta. Embora se deva ter prudência nas extrapolações dos resultados laboratoriais para o ambiente, a hipótese é que as concentrações de micronutrientes (ou metais) presente na água podem estar associadas às florações tóxicas de *C. raciborskii*.

2. OBJETIVOS

Em escala laboratorial (microcosmo), avaliou-se o efeito de diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B no crescimento e na produção de saxitoxina de uma linhagem da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Os objetivos específicos foram:

- identificar as fases de crescimento com maior síntese de STX;
- verificar o efeito da variação isolada de cada micronutriente nas culturas de *C. raciborskii* e caracterizar a produção de saxitoxina e os parâmetros de crescimento deste microrganismo;
- identificar os micronutrientes e concentrações de maior influência na produção de saxitoxina nas fases iniciais (dia 5) e tardia (dia 20) de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii é uma espécie de cianobactéria filamentosa, com tricomas retos ou espiralados, células cilíndricas e com vacúolos de gás e, quando presente, heterocito é terminal e solitário. Sua reprodução acontece pela fragmentação do tricoma ou pela germinação do acineto (BICUDO, 2005).

Esta espécie é considerada atualmente invasora devido à sua dominância em lagos e reservatórios tropicais e à sua expansão geográfica para regiões temperadas (BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2002; BRIAND et al., 2004). Essa dominância foi registrada em diversas regiões do planeta como: Austrália, América do Norte, América do Sul, Europa, África e Ásia (BURFORD; DAVIS, 2011).

Segundo Padisák (1997), o sucesso ecológico de *C. raciborskii* está associado à diversas vantagens adaptativas como: capacidade de migração na coluna da água, presença de vacúolos de gás, tolerância à baixa luminosidade, alta capacidade de dispersão (acinetos), resistência à herbivoria pelo zooplâncton, capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (heterocito), entre outras características.

Bittencourt-Oliveira (2003) descreveu esta cianobactéria detentora de múltiplas estratégias adaptativas para sobrevivência em diversos ambientes, como tolerância à altas concentrações iônicas, afinidade ao NH_4^+ (que é a forma energeticamente mais acessível de nitrogênio) e flexibilidade às grandes variações de condutividade elétrica.

Quanto à produção de toxina, *C. raciborskii* é capaz de produzir cilindrospermopsina (CYN) e saxitoxina (STX), no entanto, segundo Burford e Davis (2011), a capacidade de produzi-las não é universal. Linhagens da Austrália e Nova Zelândia produzem CYN (MCGREGOR; FABBRO, 2000; PADISÁK, 1997), cepas brasileiras são potencialmente produtoras de STX (CARNEIRO et al., 2009; LAGOS et al., 1999; MOLICA et al., 2002; VARGAS, 2012) e na Europa e América do Norte as cepas produzem toxinas desconhecidas (NEILAN et al., 2003; SAKER et al., 2003). A cepa utilizada nesta pesquisa é produtora de saxitoxina.

3.2. Efeitos dos micronutrientes no crescimento de *C. raciborskii*

A maior parte das investigações centradas nos efeitos dos nutrientes no crescimento de *C. raciborskii*, pesquisam diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, pois são considerados os principais elementos reguladores do crescimento do fitoplâncton e são a base para ocorrência de florações (REYNOLDS, 2006).

No entanto, as concentrações dos micronutrientes, principalmente do ferro, também têm sido identificadas como importantes fatores no controle do crescimento do fitoplâncton, incluindo da espécie de cianobactéria *C. raciborskii* (DE SOUZA; DE WEVER et al., 2008; DUFOUR et al., 2006; STERNER et al., 2004; TWISS et al., 2005;).

Os metais traço têm papel importante na estruturação e atividade de várias enzimas que estão envolvidas em diversas vias metabólicas, como na fotossíntese (transporte de elétrons), assimilação de nitrogênio inorgânico dissolvido (NO_3 e NH_4), fixação do nitrogênio molecular, assimilação do carbono, biossíntese de pigmentos, entre outras funções metabólicas (REYNOLDS, 2006).

No entanto, eles podem ser tóxicos em elevadas concentrações. Deve-se levar em conta que a disponibilidade destes nutrientes, em termos de limitação e toxicidade, está relacionada à característica química dos íons metálicos, e não à concentração total destes ou às formas complexadas, posto que é na forma iônica que estão biodisponíveis ao fitoplâncton (OLIVEIRA, 2007).

Sterner et al. (2004) verificaram o efeito da limitação de metais traço (Fe, Zn e Mn) no crescimento do fitoplâncton e do bacterioplâncton no Lago Superior, Estados Unidos. Eles observaram que, em condição de limitação destes micronutrientes, a adição de apenas metais traço não influenciou o crescimento destes microrganismos. Mas, quando foi adicionado fósforo as taxas de crescimento do fitoplâncton aumentaram e ocorreu limitação do ferro, indicando que este micronutriente pode limitar o crescimento fitoplanctônico.

A mesma limitação por Fe foi verificada por Twiss et al. (2005), no Lago Erie, quando adicionado $1\mu\text{M}$ de fósforo. Além disso, eles sugerem que os metais traço agem em conjunto com o fósforo e, mudanças em suas concentrações, podem interferir na estrutura da comunidade fitoplanctônica.

De Souza et al. (1998) identificaram altas concentrações de ferro quando a biomassa de *C. raciborskii* atingiu picos de crescimento no Rio Pequeno (braço da Represa Billings, SP). Tal associação entre crescimento da cianobactéria e disponibilidade de ferro também foi constatada em experimentos laboratoriais por Dufour et al. (2006) e Leal (2006).

Dufour et al. (2006) observaram, no Lago Sahelian (Senegal), que nos períodos de predomínio de *C. raciborskii* a concentração de nitrogênio inorgânico dissolvido (NID) estava baixa ($< 1 \mu\text{M}$ de NH_4^+ e $5,3 \mu\text{M}$ de NO_3^-) e a de ferro alta (313 nM). Pela realização de ensaios laboratoriais, foi sugerido que essa depleção de NID era contrabalanceada pela fixação de nitrogênio atmosférico realizada por *C. raciborskii*, que é uma cianobactéria diazotrófica. O aumento da concentração de ferro possibilitou que esse processo ocorresse, pois é requerido na biossíntese da coenzima nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico.

Murphy, Lean e Nalewajko (1976) identificaram um metabólito (sideróforo) secretado por cianobactérias que age como forte quelante de Fe quando ele é limitante no ambiente aquático, favorecendo o crescimento desses micro-organismos. Por isso, os autores sugerem que esta pode ser uma vantagem adaptativa de cianobactérias sobre demais grupos fitoplanctônicos.

Em testes laboratoriais, realizados por Lukac e Aegerter (1992) com a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, constatou-se que apenas Zn e Fe afetaram significativamente o crescimento desta espécie. As taxas de crescimento aumentaram em concentrações menores de Zn. Para o Fe, em sua ausência, as células cresceram muito mais lentamente do que nas condições padrões.

Desta forma, nota-se que os micronutrientes podem limitar ou estimular o crescimento do fitoplâncton. No entanto, segundo Reynolds (2006) e Wetzel (1993), no ambiente aquático, os micronutrientes têm maior importância na regulação da estrutura da comunidade fitoplanctônica devido às diferentes necessidades de metais por diversos grupos fitoplanctônicos.

Estas diferentes necessidades foram verificadas em pesquisa realizada por Barkács et al. (1999), comparando o teor de metais nas células das espécies *C. raciborskii*, *Synechococcus sp.* e *Chlorella kesslerii*. *C. kesslerii* acumulou mais Mn, Fe, Cu e Zn enquanto *C. raciborskii* acumulou mais Cu.

3.3. A Saxitoxina (STX)

A saxitoxina (STX) e seus análogos são alcaloides carbamatos, também conhecidos como PSP - *Paralytic Shellfish Poison* (Veneno paralisante de moluscos). Este nome foi dado inicialmente para esta toxina devido à associação desta com intoxicações através da ingestão

de mariscos, mexilhões e ostras contaminados com a toxina de dinoflagelados marinhos responsáveis pela maré vermelha (ANDERSON, 1994).

Conforme Tabela 1 e Figura 1, as modificações na estrutura básica desta toxina geram diversas estruturas análogas cujas toxicidades se diferenciam. A STX é a mais tóxica dentre os análogos devido à maior afinidade pelos canais de sódio, posto que as PSPs atuam bloqueando esses canais, interrompendo a entrada de fluxo de sódio, o que leva à paralisia dos músculos e morte de mamíferos por parada respiratória (WANG; SALATA; BENNETT, 2003).

Tabela 1 – Tipos de saxitoxina relatadas de diversas linhagens de cianobactérias de amostras de florações, com suas respectivas toxicidade.

Nome toxina	Grupos químicos variáveis nas toxinas					Toxicidade relativa *
	R1	R2	R3	R4	R5	
STX	H	H	H	CONH ₂	OH	1
GTX 2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH	0,359
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH	0,638
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH	0,064
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH	0,006
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH	0,096
neoSTX	OH	H	H	CONH ₂	OH	0,924
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH	0,924
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH	0,726
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH	-
dcSTX	H	H	H	H	OH	0,513
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH	0,651
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH	0,754
LWTX1	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	H	-
LWTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	OH	-
LWTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	COCH ₃	OH	-
LWTX4	H	H	H	H	H	-
LWTX5	H	H	H	COCH ₃	OH	-
LWTX6	H	H	H	COCH ₃	H	-

Fonte: Sivonen e Jones (1999), adaptado por Viana (2006)

Sendo: STX – saxitoxina, dcSTX – decarbamoilsaxitoxinas, GTX – goniatoxinas. C – C-toxinas, LWTX – toxinas de *Lyngbya wollet*, neo STX – neo saxitoxina

Figura 1 - Estrutura geral da saxitoxina (SIVONEN; JONES, 1999)

Em testes realizados com ratos, a LD_{50} (Dose capaz de matar 50% dos indivíduos testados) é de $10\mu\text{g Kg}^{-1}$, sendo 1000 vezes mais potente que o cianeto (MARIN, 2010). Concentrações máximas desta toxina na água potável ainda não foram totalmente estabelecidas (MEREL; CLÉMENT; THOMAS, 2010). Porém, no Brasil, a Portaria nº518 de 2004 do Ministério da Saúde estabelece um limite de $3\mu\text{g L}^{-1}$ para águas de abastecimento.

Além de *C. raciborskii*, outras cianobactérias e dinoflagelados marinhos dos gêneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium* têm capacidade de produzir saxitoxina. As cianobactérias são dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Planktothrix*, e *Raphidiopsis*. As PSPs são as únicas toxinas produzidas por ambos os grupos de fitoplâncton (MARIN, 2010).

O significado ecológico ou ecofisiológico da produção de cianotoxinas ainda não foi totalmente esclarecido. Foi sugerido que cianotoxinas não são essenciais para a sobrevivência dos microrganismos que a produzem ou que sua presença é acidental. No entanto, levando em conta a complexidade destas toxinas e o custo energético envolvido em sua síntese, estas suposições tornam-se improváveis (LEFLAIVE; TEN-HANGE, 2007).

Muitas hipóteses foram e estão sendo sugeridas sobre a função das cianotoxinas, como por exemplo, proteção do fitoplâncton contra predadores, captação de luz, no transporte de ferro para a célula e inibição do crescimento de outros organismos competidores (alelopatia) (LEFLAIVE; TEN-HANGE, 2007).

3.4. Efeitos dos micronutrientes na síntese de toxinas

Evidências sugerem que as condições ambientais às quais uma floração está exposta podem alterar os níveis de toxinas produzidos pelas cianobactérias. Por isso, os estudos têm focado nos fatores ambientais que poderiam mudar a produção destes metabólitos secundários.

Nestes estudos as cianobactérias tóxicas são cultivadas em diferentes regimes ecológicos, envolvendo variação de luz, temperatura, macronutrientes, micronutrientes, predadores (*grazing*), e outros microrganismos (SANTOS, 2009). Esses tratamentos têm revelado mudanças essencialmente no perfil e concentração de toxina. No entanto, poucas pesquisas centradas na regulação de saxitoxina pela *C. raciborskii* foram realizadas.

As pesquisas com *C. raciborskii* associam a produção de STX à variadas temperaturas (CASTRO et al., 2004), diferentes valores de pH e concentração de sódio (Na^+) (POMATI et al., 2004), alterações na intensidade de luz (CARNEIRO et al., 2009), altas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) (CARNEIRO et al., 2011) e, mais recentemente, variações na relação entre N e P em interação com a clorofíceia *Monoraphidium contortum* (VARGAS, 2012). O resumo dos resultados encontrados nestas pesquisas encontra-se na Tabela 2.

Além dos fatores físicos e químicos, a produção de cianotoxina também pode ser associada à fase de crescimento das cianobactérias, e por isso, fatores que alteram a duração destas fases podem ser responsáveis pela variação da concentração destas substâncias.

Como já descrito anteriormente, sabe-se da importância dos micronutrientes no crescimento dos grupos fitoplanctônicos. No entanto, são escassas as referências sobre influência dos micronutrientes na produção de cianotoxina, sendo em sua maioria relativas à síntese de microcistina.

Dentre os micronutrientes que serão avaliados nesta pesquisa, o ferro é o que mais modifica a concentração de cianotoxina, sendo que a maioria dos autores identificaram maior produção de cianotoxina em menores concentrações de Fe. Esta constatação está atrelada a diversas evidências que serão discutidas a seguir.

Lukac e Aegerter (1993) investigaram várias concentrações de metais traço (Al, Cd, Cr, Ni, Sn, Cu, Mn, Zn e Fe) e seus efeitos na produção de microcistina por *Microcystis aeruginosa*. Foi constatado que somente Zn e Fe afetaram significativamente a produção da cianotoxina, sendo que a diminuição da concentração destes metais desencadeou maiores produções. Este aumento foi mais pronunciado na diminuição do Fe. Em concentrações menores de 2,5 μM deste metal houve aumento de 20 a 40% de toxina.

Tabela 2 – Estudos laboratoriais centrados na variação da concentração de saxitoxina produzida por *Cylindrospermopsis raciborskii* em diferentes condições de cultivo.

Parâmetro	Variação	Maiores ou menores produções	Mudanças nas concentrações de PSP	Referência
Temperatura	19 e 25°C	Maior produção à 19°C (1250-160 nM de GTX2/GTX3)	1,6 vezes para STX e 5 vezes para GTX2/GTX3	Castro et al., 2004
pH	7,5 a 10	Maior produção pH 10 (1000 ug/L per DO ₇₅₀ unit)	69 vezes para STX	Pomati et al., 2004
Na ⁺ (NaCl)	5mM e 10 mM	Maior produção com 10 mM (400 µg/L per DO ₇₅₀ unit)	0,29 vezes	Pomati et al., 2004
Luz	50, 100 e 150 µmol photons m ⁻² s ⁻¹	Maior com 100 µmol m ⁻² s ⁻¹ (0,4 ng/10 ⁶) e menor com 150 µmol m ⁻² s ⁻¹ (0,1 ng/10 ⁶)	4 vezes	Carneiro et al., 2009
Ca ²⁺	10 mM	Menor produção com 10 mM	2,7 vezes	Carneiro et al., 2011
Interação com <i>M. contortum</i>	Com e sem interação	Maior produção na interação (4,73 ± 1,26.10 ⁻¹⁰ µg.µm ⁻³)	10,5 vezes	Vargas, 2012

Resultado semelhante foi encontrado por He et al. (2010), os quais verificaram que a limitação de Fe (1nmol.L^{-1}) estimulou a produção de PSP em 2,6 vezes a mais do que nas condições padrões de cultivo do dinoflagelado *Alexandrium tamarense*. Da mesma forma, em pesquisa de Stewart (2011) com *Alexandrium excavatum*, averiguou-se que a adição de PSP gonautoxina 5 (GTX5) na cultura fez reduzir o íon Fe^{3+} , facilitando assim a absorção deste metal traço pelo microrganismo.

Nesse sentido, Maldonado et al.(2002) relataram que, a limitação de Fe ($0,0017\text{ }\mu\text{M}$) induziu a produção da neurotoxina ácido domóico (DA) na diatomácea *Pseudo-nitzschia*, que foi 8 vezes maior do que nas condições padrões de cultivo.

A possível explicação para esses resultados similares nas diversas espécies de fitoplâncton produtores de toxina, é que a toxina pode funcionar como quelante de Fe quando ele está limitante no meio, agindo de forma semelhante às moléculas de sideróforos. Isso pode ser uma evidência de adaptação desses microrganismos para sobreviver em condição de Fe-limitante (HE et al., 2010; KAEBERNICK; NEILAN, 2001; MALDONADO et al., 2002; STEWART, 2011).

Outro efeito foi reportado por Utkilen e Gjølme (1995), que notaram que a diminuição da concentração do ferro gerou menor produção de microcistina. Estes autores justificaram essa diferença nos resultados das pesquisas pelas diferentes linhagens utilizadas de *Microcystis aeruginosa*. Também foi proposto, nessa pesquisa, que a microcistina intracelular tem função de quelante do Fe, tornando as cianobactérias produtoras de toxinas com sistema de absorção do Fe mais eficientes do que as não tóxicas.

Maldonado et al. (2002), também verificaram que, além do Fe-limitante, a produção de DA foi induzida por altas concentrações de Cu ($1,8\text{ }\mu\text{M}$), aumentando 21 vezes a quantidade de DA.

Outro trabalho que relaciona o metal traço Cu com cianotoxina foi realizado por Cusick et al. (2012). Eles constataram que a STX inibiu a absorção de Cu pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Através da adição de $16\mu\text{M}$ de STX e $20\text{ }\mu\text{M}$ de cobre (CuSO_4) em cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* verificou-se que a toxina se ligou aos transportadores de cobre presentes na membrana da levedura, impedindo a assimilação dos íons de cobre.

No ambiente aquático, esta atividade poderia conferir vantagem competitiva aos produtores de toxina sobre outros microrganismos coexistentes. Estes autores também propuseram que a saxitoxina intracelular diminui o estresse gerado por altas concentrações de

metais dentro da célula, sendo assim, uma forma de proteção das cianobactérias produtoras de toxinas.

Nogueira, Lombardi e Nogueira (2012) também identificaram que os exsudatos de uma linhagem tóxica de *C. raciborskii* formaram fortes ligações com o íon Cu^{2+} , tornando-o indisponível para a bactéria heterotrófica presente no cultivo. Não foi quantificada a concentração de cianotoxina.

Diante destas recentes descobertas sobre a regulação e papel das cianotoxinas, Stewart (2011) reflete: “*é possível que as funções das toxinas possam ser tanto metabólicas quanto defensivas*”.

Outra linha de pesquisa, que também envolve a regulação da produção de cianotoxina, é a investigação dos mecanismos genéticos relacionados às vias de biossíntese dessas toxinas. Devido ao avanço nas técnicas de biologia molecular é possível pesquisar a regulação da síntese de cianotoxinas, inclusive saxitoxina, em nível molecular (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; KELLMAN; NEILAN, 2007; MARIN, 2010; SILVA, 2010).

As vias bioquímicas incomuns e os genes da biossíntese da STX foram recentemente elucidados. A bioquímica da saxitoxina é única e complexa, envolvendo muitos tipos de reações bioquímicas, sendo que cada uma delas é catalisada por diferentes enzimas ou domínios catalíticos (KELLMANN; NEILAN, 2007).

Alguns fatores ambientais podem regular a atividade de genes produtores de toxina. Foi constatado que o agrupamento de genes *sxt* de *C. raciborskii* codifica dois fatores de transcrição, sugerindo, até o momento, que a biossíntese de SXT neste organismo pode ser regulada pela transcrição em resposta à disponibilidade de fosfato (PEARSON et al., 2010).

Quanto à microcistina, evidências sugerem que sua transcrição pode ser controlada pela disponibilidade de ferro devido aos reguladores deste processo (ALEXOVA et al., 2011; SEVILLA et al., 2008).

Segundo Kerbernick e Neilan (2001), a combinação de pesquisas que envolvem fatores ecológicos e genéticos, dentro da perspectiva da síntese e regulação de cianotoxinas, faz parte de uma nova era de pesquisas em que “*as interações dos ecossistemas são compreendidas em termos de seus determinantes moleculares*”.

Diante do exposto até aqui, é possível notar que pouco foi descoberto sobre os efeitos dos metais traço na produção de saxitoxina, mas para outros grupos fitoplanctônicos produtores de toxinas já foram reportados. Portanto, pode-se inferir que os efeitos constatados nas pesquisas referenciadas também podem ocorrer na produção de STX por *C. raciborskii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cepa de Cianobactéria e Condições de Cultivo

4.1.1. Origem da Cepa

A cultura não axênica e produtora de saxitoxina de *Cylindrospermopsis raciborskii* (ITUC01) que foi utilizada nos experimentos foi isolada da Represa de Itupararanga por Vargas (2012) e está depositada no banco de microalgas e cianobactérias do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE) da Escola de Engenharia de São Carlos/USP (Figura 2).

Figura 2 - Banco de microalgas e cianobactérias do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE), Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

4.1.2. Manutenção do inóculo

A cepa foi mantida em tubos de ensaio de vidro, com tampa rosqueável, em condições controladas de crescimento, em sala de cultivo climatizada com temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas tubulares fluorescentes de 20W (OSRAM).

Os inóculos de manutenção foram repicados mensalmente em condições de assepsia em capela de fluxo laminar na proporção de 1:10 de meio ASM-1 modificado (GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964, com concentração de N 2,5 vezes maior) (Tabela 3) previamente autoclavado à 121°C, por 20 minutos, tamponado com TRIS (0,5 g.L⁻¹) e estabilizado às condições do ambiente por 24 horas.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura ASM-1 segundo GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964, com modificação na concentração de N (2,5 vezes maior). Concentrações finais em mg.L⁻¹ e em µM.

Solução	Reagente	Reagente (g)/ 100 mL solução	Solução (mL.L ⁻¹ de ASM)	Concentração Final (mg.L ⁻¹)	Concentração Molar (µM)
A	NaNO ₃	2,12	20	69,87	5000
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,205		4,93	200
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,245		4,84	200
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,145		7,91	200
B	K ₂ HPO ₄	0,87	2	3,00	100
	Na ₂ HPO ₄	0,706		3,00	100
C	H ₃ BO ₃	2,48	0,1	0,43	40
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39		0,39	7
	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08		0,22	4
	ZnCl ₂	0,44		0,21	3,2
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019		0,0049	0,08
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,00014		0,000052	0,0008
D	EDTA.Na ₂	1,86	0,4	6,47	20

4.1.3. Modificações no meio ASM-1

O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o ASM-1 (GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964) (Tabela 3). Porém, foram alteradas as concentrações de alguns componentes do meio de cultura e o modo de prepara-lo, visando alcançar os objetivos desta pesquisa e para melhor crescimento da cianobactéria estudada.

Identificou-se que o crescimento da cepa nas condições nutricionais do ASM-1 estava com uma velocidade baixa e sensível aos repiques, era comum após o repique alguns cultivos não se desenvolverem. Para otimizar o crescimento da cepa foi realizado um experimento fatorial, descrito no Item 4.6 (1ª Etapa) alterando pH, luz e adicionando bicarbonato no meio.

Além deste teste foi realizado outro, alterando a concentração de nitrato (NaNO_3), que resultou no melhor crescimento da cepa. Foram testadas duas concentrações de nitrato, sendo uma 2,5 vezes maior ($5000 \mu\text{M}$) e a outra 2 vezes menor ($1000 \mu\text{M}$) do que a concentração no ASM-1 que é de $2000 \mu\text{M}$. A relação N:P das concentrações testadas foram 25:1 e 5:1, da maior e menor concentração respectivamente.

Comparando com a concentração controle do ASM-1, verificou-se que com o aumento de 2,5 vezes na concentração de nitrato houve aumento na velocidade de crescimento, maior intensidade na coloração verde da cultura e os repiques raramente não se desenvolviam. A diminuição da concentração de nitrato afetou drasticamente o cultivo, diminuindo a velocidade de crescimento, alteração na coloração do cultivo para amarelado e os repiques não se desenvolveram (Figura 3).

Diante destes resultados identificou-se melhor crescimento de *C. raciborskii* no tratamento com maior concentração de nitrato. Por isso, foi adotada em todos os experimentos, a concentração de $5000 \mu\text{M}$ de nitrato, substituindo a concentração original do meio ASM-1 de $2000 \mu\text{M}$, tornando a relação N:P 25:1.

Figura 3 – Diferença na coloração das culturas de *C. raciborskii* em resposta a modificação na concentração de nitrato, com a relação N:P 25:1, 10:1 e 5:1, da esquerda para a direita.

Como o objetivo desta pesquisa é verificar o efeito da variação dos micronutrientes no crescimento e na produção de saxitoxina na espécie da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, foram realizadas modificações nas concentrações dos micronutrientes presentes no meio de cultura ASM-1. No Item 4.6 (4ª Etapa) está descrito todas as concentrações testadas dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, B, Co em cada tratamento.

4.1.4. Preparo do meio de cultura

A metodologia de preparo do meio de cultura ASM-1 sugere a realização de uma única solução estoque para todos os micronutrientes, no entanto, segundo Sunda, Price e Morel (2005), a mistura dos metais-traço facilita a modificação destes no meio de cultura. Por isso, foram realizadas soluções estoques para cada micronutriente presente no meio (Fe, Zn, Cu, Mn, B e Co) e para o EDTA. Além disso, a separação dos micronutrientes em diferentes soluções estoque facilitou o preparo do meio de cultura com concentrações variadas de cada micronutriente.

Estas soluções estoques foram preparadas com água miliQ em uma solução de HCl 0,01 M em frascos de polipropileno, previamente lavados com HCl 1,0 M (SUNDA; PRICE; MORELI, 2005). A utilização de água miliQ no preparo das soluções e a utilização do HCl 1,0M para lavagem de toda a vidraria são cuidados essenciais para amenizar a contaminação por metais traço no meio de cultura. Já a acidez das soluções estoque impede a precipitação de compostos insolúveis, como por exemplo, o óxido de ferro hidratado (SUNDA; PRICE; MORELI, 2005).

Além disso, tomou-se o cuidado de utilizar somente frascos de plástico, tanto nas soluções estoque, quanto nos frascos e tubos de cultivo, já que em superfícies de vidro os metais adsorvem em até 20% de sua concentração (LOMBARDI, comunicação verbal; CUCULIC; BRANICA, 1996). Foram utilizados frascos de polipropileno para armazenar as soluções estoques, e para cultivo foram utilizados erlenmeyers e tubos de policarbonato com elevada transparência (Figura 4).

Figura 4 - Tubos de policarbonato (NALGENE) com cultivo de *C. raciborskii*.

Foram calculados os metais contaminantes presentes nos sais utilizados na preparação no meio de cultura ASM-1, com isso mensurou-se a real concentração desses metais no meio. Verificou-se que seria possível diminuir somente 10 vezes a concentração dos micronutrientes no meio de cultura ASM-1, pois concentrações menores apresentariam altos erros devido aos contaminantes.

4.2. Monitoramento do crescimento

Para quantificar a biomassa ao longo do experimento, o método utilizado nesta pesquisa foi o da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 750 nm (DO_{750}). As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro DR-4000 (HACH Company, Loveland, Colorado).

Este método indireto é largamente utilizado nos trabalhos científicos para mesurar a biomassa de cianobactérias (BRIAND et.al., 2004; CAVALIERE, 2008; CIRÈS et al., 2011; HU; WESTERHOFF; VERMAAS, 2000; LUKAC; AEGERTER, 1993; POMATI et.al., 2004; SAKER; NEILAN, 2001). No entanto, é preciso ter cautela em sua utilização, pois mudanças na morfologia e composição das células mudam suas propriedades ópticas e por isso a relação entre absorbância e peso seco podem se alterar, gerando prováveis imprecisões na estimativa da concentração da biomassa (GRIFFITHS et al., 2011).

A escolha do comprimento de onda é bastante diversificada entre os autores, pois alguns defendem a ideia de que o comprimento com maior absorbância é o que oferece maior sensibilidade (geralmente na faixa da clorofila *a*: 400-460nm e 650-680nm), enquanto outros acreditam que as absorbâncias que estão fora das faixas dos pigmentos (550 e 750 nm) apresentam menores erros.

Na pesquisa de Griffiths et al. (2011) foi verificado que para microrganismos nos quais a clorofila é o pigmento de maior importância, os erros são minimizados quando se utiliza comprimentos de onda fora dos intervalos de absorbância deste pigmento (750 e 550 nm). Segundo Valer e Glock (1998) esta faixa de luz vermelha não penetra profundamente no líquido da amostra e a absorção de luz por outras partículas suspensas é menor.

Trabalhos que empregaram esta metodologia para quantificar *Cylindrospermopsis raciborskii* utilizaram, em sua maioria, o comprimento 750 nm (BRIAND et.al., 2004; CAVALIERE, 2008; POMATI et al., 2004; SAKER; NEILAN, 2001).

Para a escolha do comprimento de onda que foi utilizado nesta pesquisa, verificou-se os picos de absorbância da cultura de *C. raciborskii* através da varredura espectrofotométrica

(Figura 5). Identificou-se que os maiores picos de absorbância da cultura de *C. raciborskii* são de clorofila (439 e 680 nm). Por esses motivos, foi escolhido, o comprimento de onda de 750 nm, seguindo as orientações de Griffiths et al. (2011) e os exemplos dos trabalhos de Briand et al. (2004), Cavaliere (2008), Pomati et al. (2004) e Saker e Neilan (2001).

Figura 5 - Varredura de cultura de *C. raciborskii* indicando os picos de absorbância na faixa da clorofila (436 e 680 nm).

Para confirmar a linearidade do aumento da DO com o aumento da biomassa, foi realizada regressão linear entre estes dois valores. A relação entre DO e peso seco foi monitorada durante 30 dias e 15 amostragens. A biomassa foi determinada através do peso seco (Sólidos Suspensos Totais- APHA, 2005) e a DO foi mensurada em espectrofotômetro DR-4000 (HACH Company, Loveland, Colorado) no comprimento 750 nm sem cubeta, utilizando diretamente o tubo de policarbonato no equipamento. A regressão indicou um bom ajuste da reta (valor de R^2 acima de 0,9) (Figura 6).

Figura 6 - Regressão linear entre peso seco (SST) e absorbância (DO) em comprimento de onda de 750nm.

Os dados de crescimento mensurados em DO_{750} foram utilizados para elaboração das curvas de crescimento, cálculos das velocidades máximas de crescimento (μ) e tempo de duplicação (T_d) de cada tratamento. Estes cálculos foram realizados através do modelo matemático Gompertz do Software Origin Pro 8.

Além destes dados, o biovolume foi verificado nos dias 0, 5 e 20 de cada tratamento. Com estes dados calculou-se o rendimento de biomassa nos 20 dias de cultivo, através da seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \text{Biovolume final (dia 20)} - \text{Biovolume inicial (dia 0)}$$

Os dados de biovolume também foram úteis para determinar a concentração de STX por tricoma de *C. raciborskii* através da razão de STX pelo biovolume nestes dias estabelecidos.

Para mensurar o biovolume, nos dias estabelecidos foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada frasco de cultivo, armazenadas em frasco âmbar e fixados com lugol. Primeiramente a densidade foi calculada, através da câmara de Fuchs Rosenthal, em microscópio Olympus BX51 segundo Stein (1973):

$$D = \frac{N \times A_c}{A_f \times F \times V}$$

Sendo:

D = densidade (ind.mL⁻¹)

N = número de organismos

A_c = área da câmara (mm²)

A_f = área do campo de contagem (mm²)

F = número de campos contados

V = volume da câmara (mm³)

Em seguida, o volume celular foi calculado a partir de 30 indivíduos aleatórios de cada tratamento, através do software Image – Pro Plus versão 4.5.1.20, e metodologia descrita por Hillebrand et al., 1999. Segundo esses autores o tricoma de *C. raciborskii* tem morfologia semelhante a um cilindro, por isso calcula-se o volume a partir da seguinte equação:

$$V = \frac{\pi}{4} \times d^2 \times C$$

Sendo:

V = volume

d = diâmetro

C = comprimento

Por fim, com os resultados de densidade e volume celular foi calculado o biovolume ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$):

$$B = D \times V$$

Sendo:

B = biovolume ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)

D = densidade ($\text{ind} \cdot \text{mL}^{-1}$)

V = volume celular médio (μm^3)

4.3. Análise de Nutrientes dissolvidos e Clorofila *a*

Para as análises de nutrientes e clorofila *a* foram filtradas amostras, nos dias 0, 5 e 20 do experimento, através de membranas de fibra de vidro Macherey – Nagel (GF-3) de 0,6 μm de porosidade e congeladas em tubos Falcon para posterior análise de nitrato (Método espectrofotométrico – 4500 NO_3 B – medições em luz ultravioleta) e ortofosfato (Método espectrofotométrico – 4500 P – B – ácido ascórbico), conforme metodologia descrita em APHA (2005).

As membranas utilizadas na filtração foram utilizadas para análise de clorofila *a* pelo método espectrofotométrico – extração com etanol 80% descrito em Nush (1980) e modificado por Nederlandse Norm 6520 (1981).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro DR-4000 (HACH Company, Loveland, Colorado).

4.4. Determinação de saxitoxina

A determinação quantitativa de saxitoxina total (extra e intracelular) produzida pela *C. raciborskii* foi realizada pelo Ensaio de Imunoabsorvente Ligado à Enzima (Enzyme linked immunosorbent assays - ELISA), o qual se baseia numa reação bioquímica resultante da presença de anticorpos policlonais contra a saxitoxina (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; NICHOLSON; BURCH, 2001;).

A extração da saxitoxina foi realizada conforme metodologia descrita por Berry e Lind (2010), Torokne et al. (2004) e Yilmaz et al. (2008), pelo congelamento e descongelamento das amostras por quatro vezes antes da realização dos testes, permitindo assim, a lise celular e liberação da toxina.

Foram utilizados os kits de saxitoxina em placa (Beacon Analytical Systems Inc., ME, USA) e os procedimentos foram executados em leitora modelo Expert Plus e lavadora de microplacas modelo Atlantis (ASYS Hitech, Eugendorf, Áustria).

O limite de detecção mínima do método é $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ de saxitoxina com reatividade cruzada para Saxitoxina dicloridrato (100%), Neosaxitoxina (0,8%), Decarbamoil STX (18%), Goniatoxina 2 e 3 (GTX 2 e 3) (12%), GTX 1 e 4 ($<0,1\%$), Decarbamoil GTX 2 e 3 (0,4%) e Decarbamoil NeoSTX (0,7%).

Obtidas as concentrações de saxitoxinas, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, foi calculada a concentração de saxitoxina em relação ao biovolume das células ($10^{-5} \text{ pg.}\mu\text{m}^{-3}$).

4.5. Axenização da cepa

Para minimizar a interferência de bactérias associadas à cianobactéria nos resultados, foram adaptadas e utilizadas diversas metodologias de eliminação de bactérias em culturas clonais para tentar torná-las axênicas. No entanto nenhuma técnica foi eficaz para a axenização.

As técnicas utilizadas foram:

- Solução de Dakin (Vieira, 1983)
- Solução de antibióticos e fungicida (GUILLARD, 2005);
- Plaqueamento, diluição e pescagem (ANDERSEN, 2005);
- Centrifugação e filtração (VÁZQUEZ–MARTÍNEZ et al., 2004; GUILLARD, 2005).
- Lavagem com Extran 0,1%, para retirada da mucilagem (HONDA; CRESPI, sem data);
- Azida sódica à 5 mM (MELO; NEVES; BAPTISTA, 2011).

4.6. Planejamento Experimental

Os experimentos foram divididos em 4 etapas, sendo as posteriores dependentes das anteriores. A 1ª etapa teve como objetivo encontrar a melhor condição de cultivo relativo ao pH, intensidade de luz e presença de bicarbonato. Determinada as condições padrões para crescimento de *C. raciborskii* a 2ª etapa teve como objetivo comparar a concentração de saxitoxinas em diferentes fases de crescimento nesta condição controle estabelecida na 1ª etapa. Com as respostas de crescimento e produção de STX da 2ª etapa, iniciou-se a 3ª para caracterizar o crescimento de *C. raciborskii* (determinação da fase lag, exponencial e estacionária) em concentrações de micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B) e aclimatar os cultivos por cinco vezes. Com a informação da fase de crescimento de maior produção de STX em condição controle (2ª etapa), com as culturas aclimatadas e determinadas as fases de crescimento de cada tratamento (3ª etapa), iniciou-se a 4ª etapa com o objetivo de comparar a produção de STX nas fases de crescimento em cada tratamento com modificação na concentração de micronutrientes (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma das principais etapas do planejamento experimental.

As quatro etapas estão descritas de forma detalhada nos itens a seguir.

- **1ª Etapa – Melhor condição de cultivo**

Os experimentos propostos nesta investigação foram realizados em batelada, que é caracterizado pelo crescimento microbiano em um sistema fechado sem renovação de nutrientes. Somente houve renovação do ar através da tampa parcialmente desrosqueada dos tubos de ensaio. Neste tipo de cultura, o meio sofre alterações em sua composição química e física, podendo limitar o crescimento do microrganismo em algum momento do experimento (ANDERSEN, 2005; MADIGAN et al., 2010).

Por essa razão, foram realizados testes preliminares com o objetivo de impedir ou minimizar as limitações de crescimento de *C. raciborskii* devido a outras variáveis que não sejam as propostas por este trabalho (alteração na concentração de micronutrientes). Além disso, através deste teste foi possível determinar a melhor condição de cultivo de *C. raciborskii*.

Sabe-se que ao longo do crescimento microbiano fotoautotrófico de culturas em batelada, mesmo com a utilização do tampão, o pH tende a aumentar devido à assimilação de bicarbonato do meio através da fotossíntese. Por isso, através do teste preliminar foi verificado se pHs mais elevados influenciam o crescimento de *C. raciborskii*.

Outro fator que foi verificado é a influência do sombreamento que a cultura pode sofrer durante o experimento devido ao posicionamento dos recipientes e ao autossombreamento das células quando em alta densidade. Este cenário pode diminuir a intensidade luminosa que alcança as células (BRIAND et al., 2004).

A terceira e última variável que foi testada é o carbono inorgânico. É possível que haja escassez de carbono inorgânico nestas culturas já que a única fonte deste composto é o dióxido de carbono proveniente do ar atmosférico presente no *headspace* do tubo de ensaio (HOLLAND et al., 2012). No meio ASM-1 não há fonte de carbono inorgânico, geralmente presente em outros meios de cultura pelo bicarbonato de sódio.

Este teste foi executado por um planejamento fatorial completo com 3 fatores e 2 níveis (Tabela 4). Com isso, contabilizou-se oito tratamentos, os quais estão expostos na Tabela 5, como também as siglas de cada tratamento. As combinações foram feitas em triplicata em tubos de ensaio de vidro de 50 mL (20 mL de cultura) com tampa rosqueável.

Tabela 4 - Planejamento fatorial para determinação das melhores condições de crescimento.

Fatores	Níveis	
	1	2
pH	7,8	9
Luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	60	30
NaHCO ₃ (μM)	0	150

Tabela 5 - Fatores e níveis dos tratamentos da 1ª etapa.

Tratamentos	Luz ($\mu\text{mol.n}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	pH	NaHCO ₃ (μM)
1	60	7,8	0
2	60	7,8	150
3	60	9	0
4	60	9	150
5	30	7,8	0
6	30	7,8	150
7	30	9	0
8	30	9	150

A utilização dos tubos como modelo experimental é justificada pela facilidade em realizar experimentos com maior quantidade de variáveis. Com isso, mesmo com grandes números de unidades experimentais, ocupa-se menos espaço e facilita o monitoramento do crescimento, pois este é realizado diretamente com o tubo no espectrofotômetro, sem necessidade de cubeta.

O monitoramento do crescimento foi realizado a cada 48 horas (Item 4.2.) durante 30 dias em sala de cultivo, sendo que a intensidade luminosa foi controlada realocando os tubos a distâncias variáveis da fonte luz para alcançar a intensidade determinada.

A Figura 8 demonstra o fluxograma experimental da 1ª etapa.

Figura 8 - Fluxograma da 1ª etapa do planejamento experimental.

- **2ª Etapa – Determinação da concentração de saxitoxinas ao longo do crescimento.**

Este experimento foi realizado em meio de cultura ASM-1, sem alteração nas concentrações de micronutrientes, com concentração 2,5 vezes maior de nitrato (descrito no item 4.1.3.) e nas condições físicas estabelecidas pelo experimento realizado na 1ª etapa. Este tratamento é chamado, ao longo desta pesquisa, de tratamento Controle já que os outros tratamentos (descritos na próxima etapa) apresentam as mesmas condições físicas e concentração de macronutrientes deste tratamento.

O principal objetivo deste experimento foi determinar a concentração de STX ao longo do crescimento da *C. raciborskii*, pois muitos autores afirmam que sua produção está vinculada à fase de crescimento da cianobactéria.

Os ensaios laboratoriais foram realizados em 9 tubos de polycarbonato (NALGENE) de 50 mL, com volume total de cultura de 20 mL em cada. Estes tubos foram divididos em 3 grupos para que fosse possível coletar amostras para análise de toxina, biovolume, nutrientes e clorofila *a*, no início do experimento (dia 0), na fase exponencial (dia 5) e no final do experimento (fase estacionária - dia 20).

Em cada dia de coleta de amostra, 3 tubos eram eliminados, já que era necessário todo o volume da cultura (20 mL) para a realização destas análises. Alíquotas de 2mL foram congeladas (-20°C) para posterior análise de STX (Item 4.4.), 1 mL foi fixado com lugol para mensurar o biovolume (Item 4.2.) e o restante da cultura (17 mL) foi filtrado para realizar as análises de nutrientes dissolvidos e clorofila *a* (Item 4.3.).

O monitoramento do crescimento foi realizado pela medição da DO₇₅₀ diariamente durante os 20 dias de experimento.

Dessa forma, foi possível delimitar a duração do experimento e determinar em qual desses pontos do crescimento há produção mais expressiva de STX. Estes pontos foram adotados como referência de coletas para a 4ª etapa do planejamento experimental. Esta decisão foi tomada para que as análises de saxitoxinas sejam realizadas de forma objetiva, evitando análises desnecessárias, devido ao elevado custo da análise e o número de kits limitado.

A figura 9 demonstra o fluxograma experimental da 2ª etapa

Figura 9 - Fluxograma da 2ª etapa do planejamento experimental.

- **3ª Etapa – Aclimação e caracterização do crescimento nos tratamentos com alteração dos micronutrientes.**

Nesta etapa foram realizados monitoramentos prévios de crescimento da cultura nas condições delimitadas nos testes anteriores e alterando as concentrações dos micronutrientes do ASM-1 que são: Ferro, Zinco, Cobre, Manganês, Cobalto e Boro, os quais estão presentes nos sais: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e H_3BO_3 respectivamente (Tabela 6).

As concentrações foram determinadas a partir da concentração de referência que é a do meio de cultura ASM-1 (Tabela 3). As menores concentrações dos micronutrientes foram definidas após cálculo dos metais contaminantes nos reagentes utilizados no preparo do meio, para que assim fosse possível mensurar a real concentração desses metais. Já nas maiores concentrações dos metais foram realizados testes de cultivo para identificar a tolerância de *C. raciborskii* aos metais e verificar se esta sobreviveria os 20 dias de experimento.

A Tabela 6 indica as variações isoladas da concentração de metais para cada tratamento. Para cada micronutriente foram definidas quatro concentrações, além do controle que é a de referência do ASM-1, sendo uma concentração menor (dez vezes menor) e as outras três maiores do que o valor de referência, alcançando concentrações mil vezes maiores, em alguns tratamentos. Somente o metal cobre que não apresentou as quatro concentrações, pois na concentração máxima testada a cultura não cresceu. Além disso, no experimento com o cobre, não houve um tratamento com concentração dez vezes menor do que o ASM-1, pois uma concentração menor do que $0,0008 \mu\text{M}$ de Cu apresentaria muitos erros devido aos contaminantes. Com isso, contabilizou-se 24 tratamentos.

Esta etapa visou aclimatar as culturas nas concentrações de micronutrientes por aproximadamente cinco repiques. A aclimação tem como objetivo a pré-adaptação das células sob as diferentes condições nutricionais.

Além disso, esta etapa objetivou identificar os efeitos da alteração da concentração de micronutrientes no perfil da curva de crescimento de *C. raciborski*, possibilitando determinar a duração das fases de crescimento em cada tratamento.

Quando o crescimento apresentou pouca variação em cada tratamento, foi realizado o repique das culturas aclimatadas e iniciou-se o experimento. Os resultados desta etapa foram utilizados para cálculo das velocidades máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (T_d) através do modelo matemático Gompertz.

O experimento foi realizado em tubos de policarbonato (NALGENE) de 50 mL (20 mL de cultura) com tampa rosqueável, em triplicata. As curvas foram geradas pela medição da DO₇₅₀ diariamente durante os 20 dias de experimento.

Houve a intensão de manter semelhante a DO₇₅₀ inicial em aproximadamente 0,05 em todos os tratamentos. Este valor em biovolume corresponde aproximadamente em 6×10^7 a $7 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$. No entanto, em alguns tratamentos com alta concentração do micronutriente (Cu 3, Mn 4 e Zn 3) e outros com baixas concentração (Fe 1 e Co1) não foi possível alcançar este biovolume para repique no início do experimento, pois houve limitação no crescimento. Por isso estes ficaram com biovolume inicial em torno de 4×10^7 a $5 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$.

Tabela 6 - Concentrações modificadas dos micronutrientes isoladamente, a partir das concentrações do meio de cultura ASM-1.

Metal Modificado	Siglas Tratamentos	Micronutrientes (μM)					
		FeCl ₃ .6H ₂ O	ZnCl ₂	CuCl ₂ .2H ₂ O	MnCl ₂ .4H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	H ₃ BO ₃
Controle (ASM-1)	C	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,08	40
Fe	Fe 1	0,4	3,2	0,0008	7,0	0,08	40
	Fe 2	10	3,2	0,0008	7,0	0,08	40
	Fe 3	60	3,2	0,0008	7,0	0,08	40
	Fe 4	400	3,2	0,0008	7,0	0,08	40
Zn	Zn 1	4,0	0,3	0,0008	7,0	0,08	40
	Zn 2	4,0	6,5	0,0008	7,0	0,08	40
	Zn 3	4,0	12,9	0,0008	7,0	0,08	40
	Zn 4	4,0	19,4	0,0008	7,0	0,08	40
Cu	Cu 1	4,0	3,2	0,008	7,0	0,08	40
	Cu 2	4,0	3,2	0,08	7,0	0,08	40
	Cu 3	4,0	3,2	0,8	7,0	0,08	40
Mn	Mn 1	4,0	3,2	0,0008	0,7	0,08	40
	Mn 2	4,0	3,2	0,0008	70	0,08	40
	Mn 3	4,0	3,2	0,0008	200	0,08	40
	Mn 4	4,0	3,2	0,0008	600	0,08	40
Co	Co 1	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,008	40
	Co 2	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,8	40
	Co 3	4,0	3,2	0,0008	7,0	2,5	40
	Co 4	4,0	3,2	0,0008	7,0	8	40
B	B 1	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,08	4
	B 2	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,08	400
	B 3	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,08	1200
	B 4	4,0	3,2	0,0008	7,0	0,08	4000

A figura 10 demonstra o fluxograma experimental da 3ª etapa

Figura 10 - Fluxograma da 3ª etapa do planejamento experimental.

- **4ª Etapa – Experimento da resposta fisiológica de *C. raciborskii* à variação dos micronutrientes.**

Nesta etapa foram verificados os efeitos da modificação das concentrações dos micronutrientes (Tabela 6) na produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*. A concentração de STX mensurada foi normalizada pelo biovolume celular, dessa forma foi possível comparar os valores de STX por biovolume.

Assim como a 2ª etapa, os ensaios laboratoriais foram realizados em 9 tubos de policarbonato com volume total de cultura de 20 mL em cada. Estes tubos foram divididos em 3 grupos para que fosse possível coletar amostras para análise de toxina, biovolume, nutrientes e clorofila *a*, no início do experimento (dia 0), na fase exponencial (dia 5) e no final do experimento (fase estacionária - dia 20). Em cada dia de coleta 3 tubos eram eliminados, já que era necessário todo o volume da cultura (20 mL) para a realização destas análises. Aliquotas de 2mL foram congeladas (-20°C) para posterior análise de STX (Item 4.4.), 1 mL foi fixado com lugol para mensurar o biovolume (Item 4.2.) e o restante da cultura (17 mL) foi filtrado para realizar as análises de nutrientes dissolvidos e clorofila *a* (Item 4.3.)

O monitoramento do crescimento foi realizado pela medição da DO₇₅₀ diariamente durante os 20 dias de experimento.

Figura 11 - Exposição das culturas às etapas do planejamento experimental.

Na figura 12 pode-se observar o fluxograma experimental da 4ª etapa.

Figura 12 - Fluxograma da 4ª etapa do planejamento experimental.

4.7. Análises estatísticas dos dados

Para averiguar a normalidade de distribuição dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Dessa forma, foi possível saber se os dados são paramétricos ou não paramétricos e assim, selecionar os testes estatísticos adequados.

Como o principal objetivo desta pesquisa é caracterizar o crescimento e a produção de STX entre os tratamentos a partir da comparação das médias de cada variável, os testes estatísticos mais adequados foram a análise de variância (ANOVA) ou o teste H de Kruskal-Wallis. Sendo que o primeiro foi utilizado quando os dados apresentarem distribuição normal (dados paramétricos) e o segundo para dados não-paramétricos. Em seguida, confirmado a diferença entre os dados, foi utilizado o teste *post hoc* Tukey para identificar quais dos tratamentos se diferem.

As concentrações totais de STX verificadas em cada tratamento foram convertidas em função do biovolume das células. Posteriormente, foram calculadas as médias destes valores e, por fim, comparadas pelo teste estatístico escolhido anteriormente.

As curvas de crescimento foram construídas em triplicata a partir da DO_{750} nos diferentes tratamentos ao longo do tempo, a partir destes valores (através do modelo matemático Gompertz) foram estimadas as velocidades máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e o tempo de duplicação (T_d) cada condição em triplicata. O rendimento foi calculado pela subtração do biovolume do dia 20 pelo dia 0. Em seguida foram calculadas as médias das $\mu_{\text{máx}}$, T_d e rendimento para que pudessem ser comparadas através do teste estatístico selecionado.

As mesmas ferramentas estatísticas foram utilizadas para comparar a assimilação dos nutrientes (nitrato e ortofosfato) e o aumento da clorofila *a* em cada condição.

Em todos os testes estatísticos foram utilizado o software Origin Pro 8.0 e, para indicar diferença significativa dos resultados foi adotado $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Conforme explanado no plano experimental, a pesquisa se dividiu em 4 etapas, sendo dependentes sequencialmente. Por isso os resultados também estão apresentados nesta ordem.

Os resultados das 3ª e 4ª etapas estão descritos no item (5.3.), pois estas fases da pesquisa quantificaram crescimento e produção de STX que são os principais resultados da resposta fisiológica de *C. raciborskii* à variação dos micronutrientes. Juntamente com os dados de crescimento estão os resultados de assimilação de nutrientes e concentração de clorofila *a*.

5.1. 1ª Etapa: Melhor condição de cultivo

Como descrito no planejamento experimental, o objetivo desta etapa foi impedir ou minimizar possíveis limitações no crescimento de *C. raciborskii* devido a outras variáveis que não sejam as propostas por esta pesquisa focada na investigação da concentração de micronutrientes. Neste planejamento experimental, determinou-se a melhor condição de cultivo de *C. raciborskii* em diferentes condições de luz, pH e bicarbonato de sódio.

Verificou-se, através de experimento fatorial (STATISTICA, 2011), que luz foi o único fator isolado que afetou significativamente a velocidade de crescimento de *C. raciborskii* nos níveis testados (ANOVA, $p < 0,05$; Tabela 7). Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram maiores nos tratamentos 1, 2, 3 e 4, que são as condições que estavam expostas à maior intensidade de luz ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Tabela 8 e Figura 13 A).

Tabela 7 - Efeito dos fatores na velocidade de crescimento. Linhas vermelhas indicam fatores com efeito significativo na velocidade de crescimento de *C. raciborskii*.

Efeito	p
Luz	0,0000
pH	0,4165
Bicarbonato	0,2288
Luz*pH	0,0100
Luz*Bicarbonato	0,1147
pH*Bicarbonato	0,6822
Luz*pH*Bicarbonato	1,0000

Tabela 8 - Velocidade máxima de crescimento e tempo de duplicação de cultivo de *C. raciborskii* em oito condições experimentais com variação de luz, pH e concentração de bicarbonato durante 30 dias. Os valores são apresentados como médias $\pm$ desvio padrão (n=3).

Tratamento	Luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$)	pH	NaHCO_3 (μM)	Velocidade de crescimento (dia^{-1})	Tempo de duplicação (dia)
1	60	7,8	0	$0,17 \pm 0,005$	$4,09 \pm 0,12$
2	60	7,8	150	$0,19 \pm 0,024$	$3,63 \pm 0,43$
3	60	9	0	$0,20 \pm 0,017$	$3,48 \pm 0,31$
4	60	9	150	$0,22 \pm 0,042$	$3,23 \pm 0,56$
5	30	7,8	0	$0,12 \pm 0,012$	$5,6 \pm 0,53$
6	30	7,8	150	$0,12 \pm 0,009$	$5,55 \pm 0,39$
7	30	9	0	$0,11 \pm 0,005$	$6,33 \pm 0,26$
8	30	9	150	$0,10 \pm 0,004$	$6,77 \pm 0,24$

Figura 13 - Comparação das velocidades de crescimento nos tratamentos com alteração isolada de bicarbonato (A), pH (B) e intensidade de luz (C). Efeito de interação do pH e da luz na velocidade de crescimento (D) (Fonte: software STATISTICA).

Isoladamente, bicarbonato e pH não tiveram efeito significativo na velocidade de crescimento (ANOVA, $p < 0,05$; Tabela 7 e Figura 13 A e B). No entanto, houve efeito de interação positiva entre luz e pH, que intensificou o crescimento de *C. raciborskii* (Figura 13 D).

O experimento fatorial não indicou diferença entre as velocidades de crescimento sob luz $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e diferentes pH (7,8 e 9,0). Como as culturas de *C. raciborskii* já estavam aclimatadas ao cultivo em pH 7,8, este foi o pH escolhido para manutenção da cepa.

Baseando-se nestas análises, a condição de cultivo definida para as próximas etapas desta pesquisa foi: a) intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$; b) pH 7,8; c) meio ASM-1 sem adição de bicarbonato de sódio. Além disso, com os testes descritos no item 4.1.3., definiu-se a concentração de $5000 \mu\text{M}$ de nitrato.

5.2. 2ª Etapa: Caracterização da concentração de saxitoxinas ao longo do crescimento.

Fixadas as condições de luz, pH, bicarbonato e nitrato (Item 4.1.3. e 5.1.) a concentração de STX foi quantificada em 3 fases da cultura na condição Controle.

A concentração total de STX aumentou ao longo do desenvolvimento da cultura. No entanto, ao comparar o aumento de biomassa com o de STX, não há uma proporcionalidade, verificou-se que a síntese de STX ao longo do crescimento foi maior nos primeiros 5 dias de experimento (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico com as médias das concentrações totais de STX nos dias 0, 5 e 20 do tratamento Controle. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Analisando a curva de crescimento (Figura 15) verificou-se que o intervalo dos dias 0-5 a cultura encontrava-se na fase exponencial e dos dias 5-20 em fase intermediária entre a exponencial e a estacionária. Por isso, houve maior síntese de STX na fase exponencial de crescimento. Este fato pode ser evidenciado quando os valores de STX foram normalizados pelo biovolume (Figura 16), verificando pico de síntese no dia 5.

Figura 15 - Curva de crescimento normalizada de *C. raciborskii* em tratamento Controle, com meio de cultura ASM-1 durante 20 dias. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Figura 16 - Gráfico com as médias das concentrações de STX por biovolume (10^{-5} pg.µm⁻³) nos dias 0, 5 e 20 do tratamento ASM-1. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

A escolha de utilizar valores STX normalizados pelo biovolume visou diminuir os erros que outros parâmetros carregam, como biomassa seca, DO e densidade de células. A normalização pela biomassa seca e pela DO pode ter influencia da biomassa de bactérias em cultivos não axênicos. Além disso, a concentração de carboidrato ao longo do crescimento da cultura varia, afetando o peso da biomassa, sem necessariamente afetar a concentração de cianotoxina. A normalização pela densidade não leva em conta o volume da célula, também gerando erros (NEGRI et al., 1997; UTIKLEN; GJOLME, 1994; HARLAND et al., 2013).

Dessa forma foi possível mensurar a quantidade de STX produzida por biovolume de cultura e assim identificar a fase de crescimento com maior produção de toxina. Verificou-se que máxima produção média de STX por biovolume ocorreu no dia 5 ($1,68 \times 10^{-5}$ pg. μm^{-3}), sendo estatisticamente maior do que nos dias 0 ($0,860 \times 10^{-5}$ pg. μm^{-3}) e 20 ($0,863 \times 10^{-5}$ pg. μm^{-3}) (ANOVA, $p > 0,05$) (Figura 16).

Através destes resultados delimitou-se a duração do experimento para 20 dias, já que neste intervalo foi possível verificar um pico de produção de STX por biovolume (no dia 5). Além disso, foi possível determinar os pontos de coleta para a realização da 4ª etapa do planejamento experimental, que foram o dia 5 (maior produção de STX por biovolume) e o dia 20.

5.3. 3ª e 4ª Etapas: Caracterização das fases de crescimento e resposta fisiológica de *C. raciborskii* à variação dos micronutrientes

Como descrito no item 4.6., a 3ª etapa teve como objetivo, além de aclimatar os tratamentos por 5 repiques, caracterizar o crescimento da cepa de *C. raciborskii* exposta a 24 tratamentos com variação na concentração de micronutrientes (Tabela 6) durante 20 dias

A 4ª etapa, como descrito no item 4.6., teve como principal objetivo quantificar a concentração de saxitoxina nos dias 5 e 20, mensurar biovolume, clorofila *a*, nutrientes e relacionar estes resultados com os dados de crescimento de *C. raciborskii*.

5.3.1. Caracterização do crescimento de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de micronutrientes.

A caracterização do crescimento de *C. raciborskii*, em cada tratamento, foi realizada baseando-se na análise conjunta: a) do perfil de crescimento, identificando as fases lag,

exponencial, de transição e estacionária; b) do acúmulo de biomassa através do rendimento ($\text{Biovolume}_{\text{final}} - \text{Biovolume}_{\text{inicial}}$); c) da velocidade máxima de crescimento (μ_{max}); d) e do tempo de duplicação (T_d).

• FERRO

Comparando as curvas e os parâmetros de crescimento das culturas de *C. raciborskii* em cinco concentrações de ferro, com faixa de variação de mil vezes (0,4; 4,0; 10; 60 e 400 μM), identificou-se mudanças na duração da fase exponencial, rendimento e parâmetros $\mu_{\text{máx}}$ e T_d em algumas das condições estudadas.

A duração da fase exponencial foi maior nos tratamentos Fe 1 (0,4 μM) e Fe 4 (400 μM) sendo Fe 1 com duração de 8 dias e Fe 4, a mais longa, com 14 dias (Figura 17 e Tabela 9).

É provável que o tratamento Fe 1, com menor concentração de ferro, inibiu o crescimento de *C. raciborskii* por limitação, enquanto o tratamento Fe 4, com maior concentração, inibiu o crescimento de *C. raciborskii* por toxicidade. O rendimento de ambos os tratamentos corroborou tais observações, pois diminuíram em relação às condições Controle, Fe 2 e Fe 3. A redução do biovolume foi significativa (ANOVA, $p < 0,05$) e chegou, 2,6 vezes (Fe 1) e 2,4 vezes (Fe 4) quando comparados ao maior rendimento, que foi Fe 3. (Tabela 9).

Além disso, Fe 4 apresentou a menor μ_{max} e maior T_d dentre todos os tratamentos, sendo significativamente diferente de Fe 3, que foi o tratamento com melhores parâmetros de crescimento (ANOVA, $p < 0,05$) (Tabela 9). Estes resultados, associados à redução do rendimento e à extensão da fase exponencial reforçam a hipótese de inibição do crescimento da cianobactéria devido à toxicidade, em alta concentração de ferro (400 μM).

Por outro lado, no tratamento Fe 1 a inibição do crescimento não acompanha de mudanças nos parâmetros μ_{max} e T_d . Eles foram iguais (ANOVA, $p > 0,05$) aos tratamentos Controle, Fe 2 e Fe 3, cujos crescimentos foram os melhores observados e correspondem à faixa de concentração de 4 a 60 μM . Esta característica associada à redução do rendimento, reforça a hipótese de limitação em baixas concentrações de ferro (0,4 μM).

De todos os tratamentos, somente Fe 3 apresentou fase lag de 1 dia, indicando que os inóculos estavam adequadamente aclimatados nas condições iniciais do experimento.

Figura 17 - Curvas de crescimento de *C. raciborskii* exposta a 5 concentrações de Ferro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 9 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de *C. raciborskii*, exposta a 5 concentrações de ferro durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).

Tratamentos (µM)	Duração da fase Lag (Dia)	Duração da fase Exponencial (Dia)	Rendimento em biovolume ($10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Velocidade Máxima de Crescimento - μ_{max} (dia^{-1})	Tempo de duplicação - T_d (dias)
Fe 1 (0,4)	0	8	$3,93 \pm 1,14$	$0,23 \pm 0,02$	$3,00 \pm 0,20$
Controle (4)	0	4	$7,99 \pm 1,89$	$0,18 \pm 0,05$	$3,97 \pm 1,02$
Fe 2 (10)	0	7	$7,40 \pm 0,74$	$0,20 \pm 0,02$	$3,55 \pm 0,26$
Fe 3 (60)	1	5	$10,30 \pm 1,68$	$0,25 \pm 0,01$	$2,78 \pm 0,15$
Fe 4 (400)	0	14	$4,21 \pm 1,03$	$0,16 \pm 0,02$	$4,27 \pm 0,52$

• ZINCO

Em testes preliminares de cultivo determinou-se as concentrações de zinco que seriam adotadas nos experimentos. *C. raciborskii* exibiu grande sensibilidade a elevadas concentrações de zinco e identificou-se tolerância da cepa a até 19,4 µM de Zn, cuja concentração é 6 vezes maior que a do ASM-1. Apesar de provocar redução no crescimento da cepa, esta foi a concentração máxima adotada nos experimentos.

As curvas de crescimento de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco concentrações de zinco (0,3; 3,2; 6,5; 12,9 e 19,4 μM), tiveram perfil similar aos tratamentos com variação de ferro. Os tratamentos com maiores concentrações de zinco permaneceram por mais tempo na fase exponencial de crescimento (Figura 18 e Tabela 10).

Zn 2 (6,5 μM) e Zn 4 (19,4 μM) apresentaram fase lag com duração de 1 e 3 dias, respectivamente. Na maior concentração de zinco *C. raciborskii* não se adaptou como nos outros tratamentos, mesmo estando aclimatado, por pelo menos cinco repiques.

Esta característica, associada a outros parâmetros, evidenciaram que o tratamento Zn 4 inibiu o crescimento da cianobactéria. Nele, ocorreram o menor rendimento e a menor $\mu_{\text{máx}}$ entre os tratamentos estudados (Tabela 10) (ANOVA, $p < 0,05$). Sua $\mu_{\text{máx}}$ foi 1,9 vezes menor, quando comparada a $\mu_{\text{máx}}$ do Zn 2, que teve a maior taxa de crescimento (ANOVA, $p < 0,05$) (Tabela 10). Devido à redução na velocidade de crescimento, além do rendimento, é provável que a inibição do crescimento seja pelo efeito de toxicidade ao zinco em sua maior concentração (19,4 μM).

Figura 18 - Curvas de crescimento de *C. raciborskii* exposta a 5 diferentes concentrações de Zinco durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

Tabela 10 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de *C. raciborskii*, exposta a 5 concentrações de zinco durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).

Tratamentos (μM)	Duração da fase Lag (Dia)	Duração da fase Exponencial (Dia)	Rendimento em biovolume (10 ⁸ μm ³ .mL ⁻¹)	Velocidade Máxima de Crescimento - μ _{máx} (dia ⁻¹)	Tempo de duplicação - T _d (dias)
Zn 1 (0,3)	0	3	6,53 ± 0,64	0,19 ± 0,03	3,62 ± 0,62
Controle (3,2)	0	4	7,99 ± 1,89	0,18 ± 0,05	3,97 ± 1,02
Zn 2 (6,5)	1	7	5,92 ± 1,35	0,21 ± 0,01	3,27 ± 0,17
Zn 3 (12,9)	0	7	4,61 ± 1,04	0,20 ± 0,01	3,55 ± 0,14
Zn 4 (19,4)	3	8	2,65 ± 0,57	0,11 ± 0,04	6,77 ± 2,79

• COBRE

Os experimentos com o micronutriente cobre foram organizados diferentemente dos outros, pois a concentração de referência presente no ASM-1 é muito baixa (0,0008 μM). Em consequência disso, determinar uma concentração menor do esta iria criar erros na concentração devido aos contaminantes dos reagentes.

Além da concentração de referência do ASM-1 (tratamento Controle), este experimento apresentou somente três variações na concentração de cobre, pois a concentração máxima estipulada no planejamento inicial (1,8 μM) não permitiu o desenvolvimento da cianobactéria. Por essa razão, a concentração máxima não tóxica para *C. raciborskii* encontrada nos experimentos preliminares foi de 0,8 μM, sendo mil vezes maior do que a concentração do ASM-1.

No entanto, ao longo dos experimentos notou-se que a cianobactéria se adaptou às novas concentrações apresentando resultados de crescimentos iguais ou até melhores do que a concentração do ASM-1. Por isso, é provável que esta cepa que se tornou adaptada tolere concentrações maiores do que a que foi delimitada neste trabalho.

Este fato pode ser evidenciado analisando os valores de rendimento dos tratamentos, os quais não apresentaram diferença significativa (ANOVA, p>0,05). Além disso, a duração da fase exponencial praticamente não se alterou com a adição de cobre (Figura 19 e Tabela 11).

Quanto ao valor de μ_{máx} mostrou-se maior em Cu 1(0,008 μM) , quando comparado ao tratamento Controle (0,0008 μM) (ANOVA, p<0,05). Da mesma forma o valor de T_d apresentou-se estatisticamente menor em Cu 1 do que na condição Controle (ANOVA,

$p < 0,05$). Este resultado apontou que o aumento em 10 vezes da concentração de cobre presente no meio de cultura ASM-1, aumentou a velocidade de crescimento em 1,67 vezes.

Figura 19 - Curvas de crescimento de *C. raciborskii* exposta a 5 diferentes concentrações de Cobre durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

Tabela 11 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de *C. raciborskii*, exposta a 5 concentrações de cobre durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão ($n=3$).

Tratamentos (μM)	Duração da fase Lag (Dia)	Duração da fase Exponencial (Dia)	Rendimento em biovolume ($10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Velocidade Máxima de Crescimento - $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Tempo de duplicação - T_d (dias)
Controle (0,0008)	0	4	$7,99 \pm 1,89$	$0,18 \pm 0,05$	$3,97 \pm 1,02$
Cu 1 (0,008)	1	5	$8,70 \pm 1,77$	$0,30 \pm 0,04$	$2,32 \pm 0,30$
Cu 2 (0,08)	1	4	$7,56 \pm 1,99$	$0,23 \pm 0,01$	$3,05 \pm 0,11$
Cu 3 (0,8)	1	5	$7,17 \pm 0,29$	$0,26 \pm 0,02$	$2,63 \pm 0,20$

• MANGANÊS

Numa escala de variação de aproximadamente mil vezes na concentração de manganês (0,7; 7,0; 70; 200; 600 μM), os resultados de crescimento mostraram-se semelhantes aos do Fe: enquanto concentrações extremas inibiram o crescimento de *C. raciborskii*, as concentrações centrais a favoreceram.

A duração da fase exponencial foi maior nos extremos das concentrações de manganês, com maiores valores no tratamento Mn 1 (0,7 μM), Mn 3 (200 μM) e Mn 4 (600 μM) com 7 dias de duração. (Figura 20 e Tabela 12).

Pelo perfil de crescimento (Figura 20), valores de rendimento, $\mu_{\text{máx}}$ e T_d verificou-se inibição do crescimento de *C. raciborskii* nos tratamentos Mn 1 e Mn 4. Estes tratamentos tiveram o menor rendimento em relação aos outros (ANOVA, $p < 0,05$), apontando para inibição provavelmente devido à limitação (em Mn 1) e à toxicidade (em Mn 4). O valor de $\mu_{\text{máx}}$ no tratamento Mn 4 evidencia a inibição do crescimento por toxicidade, apresentando menor valor em relação aos outros tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

Estes resultados indicam que a diminuição em dez vezes e o aumento em oitenta e cinco vezes da concentração de Mn presente no ASM-1, inibiu o crescimento de *C. raciborskii*. Em relação à faixa de concentração de 7,0 a 200 μM (tratamentos Controle, Mn 2 e Mn 3) favoreceu o crescimento da cianobactéria, com melhores valores de rendimento e $\mu_{\text{máx}}$ em relação às demais concentrações (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 20 - Curvas de crescimento de *C. raciborskii* exposta a 5 diferentes concentrações de Manganês durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

Tabela 12 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de *C. raciborskii*, exposta a 5 concentrações de manganês durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).

Tratamentos (μM)	Duração da fase Lag (Dia)	Duração da fase Exponencial (Dia)	Rendimento em biovolume (10 ⁸ μm ³ .mL ⁻¹)	Velocidade Máxima de Crescimento - μ _{máx} (dia ⁻¹)	Tempo de duplicação - T _d (dias)
Mn 1 (0,7)	0	7	3,27 ± 1,65	0,19 ± 0,02	3,59 ± 0,41
Controle (7)	0	4	7,99 ± 1,89	0,18 ± 0,05	3,97 ± 1,02
Mn 2 (70)	0	4	7,56 ± 0,97	0,21 ± 0,02	3,36 ± 0,26
Mn 3 (200)	0	7	8,85 ± 2,00	0,23 ± 0,02	3,00 ± 0,31
Mn 4 (600)	1	7	2,06 ± 0,37	0,11 ± 0,00	6,47 ± 0,27

• COBALTO

A faixa de variação do micronutriente cobalto de mil vezes (0,008; 0,08; 0,8; 2,5; 8 μM), indicou grande tolerância por *C. raciborskii* nas maiores concentrações. No entanto, a menor concentração de cobalto (0,008 μM) inibiu o crescimento, provavelmente por limitação deste micronutriente.

Houve ligeira variação na duração da fase exponencial, entre 2 e 4 dias e não apresentou nenhuma tendência à variação de cobalto (Figura 21).

Os valores de μ_{máx} e T_d não diferiram significativamente. No entanto houve tendência de aumento de μ_{máx} com o acréscimo de cobalto no meio de cultura, sendo Co 1 com o menor valor e Co 4 o maior (Tabela 13).

Com relação ao rendimento, na condição Co 1 o biovolume foi menor em comparação ao tratamento Co 3 (ANOVA, p<0,05), o qual teve maior rendimento dentre os tratamentos. Por isso, levando em conta os resultados de rendimento, a concentração de 0,008 μM limitou o crescimento de *C. raciborskii*.

Figura 21 - Curvas de crescimento de *C. raciborskii* exposta a 5 diferentes concentrações de cobalto durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 13 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de *C. raciborskii*, exposta a 5 concentrações de cobalto durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).

Tratamentos (µM)	Duração da fase Lag (Dia)	Duração da fase Exponencial (Dia)	Rendimento em biovolume ($10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Velocidade Máxima de Crescimento - $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Tempo de duplicação - T_d (dias)
Co 1 (0,008)	0	2	$4,15 \pm 0,38$	$0,18 \pm 0,03$	$4,02 \pm 0,73$
Controle (0,08)	0	4	$7,99 \pm 1,89$	$0,18 \pm 0,05$	$3,97 \pm 1,02$
Co 2 (0,8)	0	2	$6,36 \pm 1,76$	$0,22 \pm 0,02$	$3,18 \pm 0,34$
Co 3 (2,5)	0	4	$9,76 \pm 0,77$	$0,21 \pm 0,05$	$3,34 \pm 0,72$
Co 4 (8)	0	4	$7,11 \pm 2,26$	$0,23 \pm 0,02$	$3,03 \pm 0,21$

• BORO

A variação da ordem de mil vezes do micronutriente boro, não inibiu nem estimulou o crescimento de *C. raciborskii*. No entanto, verificou-se tendência de diminuição no rendimento e na $\mu_{\text{máx}}$ com o acréscimo de boro no meio de cultura (Figura 22 e Tabela 14).

Verificou-se que os perfis das curvas de crescimento estão similares, sendo que a duração da fase exponencial variou de 4 a 5 dias entre os tratamentos. Com relação à fase lag somente

no tratamento Controle (40 μM) está ausente, enquanto que as outras condições apresentaram 1 dia desta fase de adaptação.

É evidente a diferença de rendimento entre os extremos de concentração de boro (B 1 e Controle: 7,01 e 7,99 respectivamente; B 3 e B 4: 3,79 e 4,47 respectivamente) (Tabela 14), no entanto os valores de desvio-padrão foram altos, impedindo a afirmação de diferença estatística. Pode-se apontar esta diferença como uma tendência de diminuição do rendimento com o acréscimo de B.

Figura 22 - Curvas de crescimento de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Boro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 14 - Parâmetros gerais de crescimento de culturas de *C. raciborskii*, exposta a 5 concentrações de boro durante 20 dias. Valores apresentados como médias e desvio padrão (n=3).

Tratamentos (μM)	Duração da fase Lag (Dia)	Duração da fase Exponencial (Dia)	Rendimento em biovolume ($10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Velocidade Máxima de Crescimento - $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Tempo de duplicação - T_d (dias)
B 1 (4)	1	5	$7,01 \pm 2,84$	$0,23 \pm 0,02$	$3,06 \pm 0,31$
Controle (40)	0	4	$7,99 \pm 1,89$	$0,18 \pm 0,05$	$3,97 \pm 1,02$
B 2 (400)	1	5	$5,44 \pm 3,69$	$0,23 \pm 0,04$	$2,77 \pm 0,29$
B 3 (1200)	1	5	$3,76 \pm 0,68$	$0,22 \pm 0,01$	$3,09 \pm 0,15$
B 4 (4000)	1	5	$4,47 \pm 0,77$	$0,18 \pm 0,01$	$3,84 \pm 0,17$

• Comparação entre os 24 tratamentos

No geral, observa-se nas Figuras 23 e 24 que os menores valores de rendimento e $\mu_{\text{máx}}$, foram encontrados nos tratamentos com concentrações mínimas (tratamentos com o número 1) e máximas (tratamentos com o número 4) de micronutrientes, indicando limitação ou toxicidades nestas condições. Já os maiores valores de rendimento e $\mu_{\text{máx}}$, foram encontrados nos tratamentos com concentrações entre os extremos mínimo e máximo de micronutrientes.

Comparando os valores de rendimento com o tratamento controle (ASM-1) ($7,99 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$), verificou-se que Fe 1, Zn 4 e Mn 4 ($3,93 \times 10^8$; $2,65 \times 10^8$; $2,06 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente) apresentaram menor valor de biovolume (ANOVA; $p < 0,05$) (Figura 23) indicando que esta modificação no ASM-1 gerou inibição no crescimento.

Com relação à $\mu_{\text{máx}}$, somente Cu 1 ($0,30 \text{ dia}^{-1}$) apresentou valor maior que da condição controle ($0,18 \text{ dia}^{-1}$) (ANOVA; $p < 0,05$) (Figura 24), indicando que esta modificação estimulou o crescimento.

Além disso, mesmo não havendo diferença significativa, foi possível observar que a adição de ferro, 15 vezes a mais do que na condição controle (ASM-1), estimulou o crescimento de *C. raciborskii*, tanto a velocidade ($0,25 \text{ dia}^{-1}$) como no acúmulo de biomassa (rendimento) ($10,3 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) (Figuras 23e 24).

Figura 23 - Gráfico comparativo dos valores de rendimento em biovolume de *C. raciborskii* exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Figura 24 - Gráfico comparativo dos valores de velocidade máxima de crescimento de *C. raciborskii* exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

5.3.2. Clorofila *a*

A concentração de clorofila *a* é mais uma informação sobre o crescimento de *C. raciborskii*, sendo possível identificar inibições no crescimento devido às diferentes concentrações dos micronutrientes. Além disso, pode-se identificar como a variação dos micronutrientes afetaram a síntese clorofila *a*.

• FERRO

A concentração de clorofila *a* permaneceu semelhante até o quinto dia de cultivo, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos, no entanto, no dia 20 o tratamento Fe3 apresentou média maior comparando aos outros tratamentos ($1591,6\mu\text{g.L}^{-1}$) (ANOVA; $p<0,05$) (Figura 25). Este resultado corrobora aos dados de crescimento (Item 5.3.1.) e de assimilação de nutrientes (descritos no próximo item 5.3.3.), indicando que $60\mu\text{M}$ de Fe estimula o crescimento de *C. raciborskii*.

Por outro lado, nas concentrações Fe 1 e Fe 4, caracterizadas como inibidoras do crescimento devido, principalmente, à redução de biovolume, a clorofila *a* não diminuiu. Este

resultado aponta para maiores relações de clorofila *a*/biovolume nas concentrações de estresse de Fe, indicando que o aumento da síntese de clorofila *a* pode ter papel relevante.

Figura 25 - Evolução das concentrações de clorofila *a* durante cultivo de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de ferro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

• ZINCO

Verificou-se, que a alteração na concentração de zinco afetou a quantidade de clorofila *a*, sendo que até o dia 5 de cultivo a concentração permaneceu semelhante. No dia 20 o tratamento Zn 2 obteve maior concentração ($1367,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) em relação aos tratamentos Zn 3 e Zn 4 (ANOVA; $p < 0,05$). Além disso, o tratamento Zn 4 apresentou concentração de clorofila *a* menor do que todos os outros tratamentos ($201,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) (ANOVA; $p < 0,05$) (Figura 26).

Os resultados de clorofila *a* reforçam o bom crescimento de *C. raciborskii* no tratamento Zn 2, o qual apresentou maior $\mu_{\text{máx}}$ e alto consumo de nitrato e ortofosfato (descrito no próximo item 5.3.3.). Além disso, os resultados de clorofila *a* confirmam a inibição do crescimento com altas concentrações de Zn no tratamento Zn 4 ($19,4 \mu\text{M}$ de Zn) que apresentou os menores valores de rendimento, de $\mu_{\text{máx}}$ e assimilação de nitrato e ortofosfato (descrito no próximo item 5.3.3.).

Figura 26 - Evolução das concentrações de clorofila *a* durante cultivo de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de zinco. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

• COBRE

O valor de clorofila *a* no quinto dia de cultivo, com modificação de Cu, foi maior no tratamento Cu 1 (480,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$) indicando rápido crescimento no início do experimento (ANOVA; $p < 0,05$). No entanto esta concentração manteve-se até o 20º dia com ligeiro aumento (Figura 27). De maneira oposta ocorreu com o tratamento Cu 2 no qual a concentração de clorofila *a*, nos 5 primeiros dias de cultivo, não se alteraram, e tiveram um expressivo aumento até o último dia, com concentração de clorofila *a* maior do que os outros tratamentos (2790,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (ANOVA; $p < 0,05$).

A maior produção de clorofila *a* no início do experimento Cu 1 pode ser comparada com os resultados da caracterização do crescimento, sendo o tratamento com maior $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento. Além disso, este tratamento obteve valores de assimilação de nitrato e ortofosfato ligeiramente maiores que os outros tratamentos (descrito no próximo item 5.3.3.). O aumento da clorofila *a* no tratamento Cu 2, no dia 20, não foi reforçado com resultados de crescimento nem de assimilação.

O tratamento Cu 3 apresentou concentração de clorofila *a* menor do que os outros tratamentos (ANOVA; $p < 0,05$), sendo contrário aos bons resultados de crescimento, com alto rendimento e $\mu_{\text{máx}}$. A hipótese é que outros pigmentos, como ficocianina e ficoeritrina tenham compensado a baixa concentração de clorofila *a* neste tratamento.

Figura 27 - Evolução das concentrações de clorofila *a* durante cultivo de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de cobre. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

• MANGANÊS

No início do experimento notou-se que a concentração permaneceu semelhante, não apresentando diferença significativa, no entanto, no dia 20 os tratamentos Mn 2 e Mn 3 obtiveram maiores concentrações de clorofila *a* (1381,3 e 1412,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Mn 2 e Mn 3, respectivamente) (ANOVA; $p < 0,05$), reforçando os resultados de crescimento os quais apresentaram maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento (Figura 28).

O oposto ocorreu com o tratamento Mn 4, o qual obteve menor concentração de clorofila *a* (289,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (ANOVA; $p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos, reforçando o resultado de limitação de crescimento com menores valores de $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento.

• COBALTO

Os valores de clorofila *a* foram semelhantes nos tratamentos ao longo do crescimento de *C. raciborskii*, não apresentando diferença estatística. No entanto pode-se identificar que no dia 20 o tratamento Co 1 obteve menor concentração de clorofila *a* (986,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Figura 29). Comparando com os dados de crescimento reforça-se a limitação no crescimento da condição Co 1, já que apresentou o menor valor de rendimento (significativo) e $\mu_{\text{máx}}$.

Figura 28 - Evolução das concentrações de clorofila *a* durante cultivo de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de manganês. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Figura 29 - Evolução das concentrações de clorofila *a* durante cultivo de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de cobalto. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

• BORO

A variação da concentração de boro não afetou significativamente o acúmulo de clorofila *a* nas células de *C. raciborski* no dia 20. Porém, no dia 5 foi identificada ligeira diferença entre os tratamentos B 4 e Controle e B 1, B 2 e B3 (Figura 30). B 4 e Controle, foram considerados estatisticamente menores que B1, B2 e B3, os quais apresentaram os maiores valores de clorofila *a* ANOVA; $p < 0,05$). Fazendo um paralelo com os resultados de crescimento, mesmo não havendo diferença estatística, os resultados de clorofila-*a* coincidiram com os valores de $\mu_{\text{máx}}$, onde Controle e B 4 apresentaram os menores valores. Comparando com o rendimento, B 4 também obteve o menor valor. Além disso, este tratamento apresentou menor assimilação de nitrato (descrito no próximo item 5.3.3.).

Os maiores resultados de clorofila *a* nos tratamentos B 1 e B 2 podem ser relacionados com os valores de $\mu_{\text{máx}}$, que, mesmo não sendo significativos, também são maiores nestes tratamentos.

Figura 30 - Evolução das concentrações de clorofila *a* durante cultivo de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de boro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

5.3.3. Nutrientes

O objetivo das análises dos macronutrientes nitrogênio e fósforo, na forma de nitrato e ortofosfato, foi de verificar se o cultivo apresentou limitação destes durante seu

desenvolvimento, já que esta pesquisa visa identificar o efeito da variação dos micronutrientes no crescimento e produção de STX por *C. raciborskii* e não da variação dos macronutrientes.

Além disso, foi calculada a razão entre assimilação de ortofosfato por rendimento (em biovolume) para que seja possível comparar a assimilação de ortofosfato por biovolume de cada tratamento.

As concentrações iniciais de nitrato e ortofosfato estabelecidas foram de 70 mg.L^{-1} e 6 mg.L^{-1} , em todos os tratamentos (concentrações molares de 5000 e 200 μM de nitrogênio e fósforo na forma de nitrato e ortofosfato, respectivamente). No entanto, analisando os resultados pode-se notar que nem sempre as concentrações iniciais deste macronutrientes foram idênticas em todos os tratamentos. Tais diferenças iniciais podem ser explicadas pela interferência das concentrações pré-existentes nos inóculos, repiques que antecederam os experimentos, pela rápida absorção pela cianobactéria ou, precipitação devido à interação com metais e na fração particulada ficou retida na membrana de filtração.

• FERRO

Analisando os resultados de concentração de nitrato e ortofosfato presente no meio de cultura com variação de ferro, pode-se notar que houve oscilações na concentração inicial dos dois macronutrientes, sendo significativamente menor a concentração de ortofosfato no tratamento Fe 4 (ANOVA; $p < 0,05$). Esta diferença se repete nos dias 5 e 20 da cultura, conforme Figura 31. A hipótese para esta acentuada diferença é a precipitação do fosfato que pode ter ocorrido devido ao aumento da concentração do micronutriente Fe. Este precipitado foi observado neste tratamento durante o preparo do meio de cultura.

É provável que esta fração de fósforo precipitada tenha ficado retida no filtro no processo de filtração que foi realizado antes da análise de ortofosfato. Esta hipótese pode ser confirmada com a quantificação do fósforo total, o qual também se apresentou abaixo da concentração esperada, indicando que o precipitado não estava presente na amostra.

Esta precipitação do fosfato no tratamento Fe 4 modificou a concentração de fósforo na forma de ortofosfato, o qual é biodisponível para *C. raciborskii*, no entanto não mostrou-se limitante. Verificou-se que a relação N:P inicial neste tratamento (Fe 4) foi de 67,1:1 e a final foi de 89,8:1.

O tratamento Fe 4 apresentou maior assimilação de ortofosfato (36,2%), já com relação ao consumo de nitrato teve o menor valor (14,5%). Esta baixa assimilação de nitrato e os menores valores de $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento, indicando limitação no crescimento. O oposto ocorreu com o tratamento Fe 1 que obteve a menor assimilação de ortofosfato, com valor

médio de 4,0%, que corrobora com as evidências de limitação de crescimento devido ao menor valor de rendimento.

Já o tratamento com maior assimilação de nitrato foi o Fe 3 (com valores médios de 22,26%), o qual também apresentou maior $\mu_{\text{máx}}$, rendimento e concentração final de clorofila *a*, indicando bons resultados de crescimento. Além disso, o tratamento Fe 3 foi o que apresentou menor variação na relação N:P ao longo do experimento, mantendo-se entre 26,6:1 e 25,9:1.

Através da análise da assimilação de ortofosfato pelo rendimento (P/biovolume) da cultura de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de Fe, verificou-se que o consumo de ortofosfato por biovolume durante os 20 dias de cultivo, aumentou nas maiores concentrações de Fe 3,36 vezes (Tabela 15).

Figura 31 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de ferro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 15 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de ferro.

Tratamento	μM	Ortofosfato/Biovolume ($\text{mg}/10^{-4} \mu\text{m}^3$)
Fe 1	0,4	0,59
Controle	4	0,91
Fe 2	10	1,04
Fe 3	60	1,20
Fe 4	400	1,98

• ZINCO

Verificou-se menores assimilações de nitrato e ortofosfato no tratamento com alta concentração de zinco (Zn 4), com valores médios de 3,14% para nitrato e de 6,1% para ortofosfato. Estes resultados reforçam a inibição no crescimento de *C. raciborskii* às altas concentrações de Zn.

Os maiores consumos de ortofosfato ocorreram nos tratamentos Zn 2 e Zn 3 (15,0 e 13,0%), já a maior assimilação de nitrato foi no tratamento Zn 3 (25,9%) (Figura 32).

Esta maior assimilação de nitrato do que de ortofosfato em Zn 3 diminuiu a relação N:P de 27,6:1 para 23,5:1. Já os outros tratamentos não apresentaram grandes variações nesta relação.

Através da análise da assimilação de ortofosfato pelo rendimento (P/biovolume) da cultura de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de Zn, verificou-se que o consumo de ortofosfato por biovolume durante os 20 dias de cultivo, apresentou uma tendência de aumento nas maiores concentrações de Zn (Tabela 16).

Figura 32 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de zinco. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 16 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de zinco.

Tratamento	μM	Ortofosfato/Biovolume ($\text{mg}/10^{-4} \mu\text{m}^3$)
Zn 1	0,3	0,82
Controle	3,2	0,91
Zn 2	6,5	1,52
Zn 3	12,9	1,74
Zn 4	19,4	1,38

• COBRE

A concentração dos nutrientes decaiu (com maior consumo de nitrato), no entanto, sem ocorrer uma diferença marcante entre os tratamentos (Figura 33). A assimilação de nitrato variou de 13% (Controle) a 18,6% (Cu 1) entre os tratamentos e, o consumo de ortofosfato variou de 11,2% (Cu 3) a 13,2% (Cu 1). A relação entre nitrogênio e fósforo (N:P), equivalente à relação entre nitrato:ortofosfato, manteve-se relativamente constantes nos tratamentos variando entre 25,0:1 a 22,5:1.

Através da análise da assimilação de ortofosfato pelo rendimento (P/biovolume) da cultura de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de Cu, verificou-se que o consumo de ortofosfato por biovolume durante os 20 dias de cultivo, permaneceu semelhante em todos os tratamentos.(Tabela 17).

Figura 33 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de cobre. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 17 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de cobre.

Tratamento	μM	Ortofosfato/Biovolume ($\text{mg}/10^{-4} \mu\text{m}^3$)
Controle	0,0008	0,91
Cu 1	0,008	0,96
Cu 2	0,08	0,93
Cu 3	0,8	0,98

• MANGANÊS

Da mesma forma que ocorreu com o ferro, verificou-se grandes oscilações na concentração de ortofosfato no tratamento com maior quantidade de Mn (Mn 4), desde o início do experimento. Esta diferença se repete nos dias 5 e 20 da cultura, conforme Figura 34. A hipótese para esta acentuada diferença é a ocorrência da complexação do fosfato com o manganês devido ao aumento da concentração deste micronutriente no meio de cultura. Foi observado um precipitado no tratamento Mn 4 durante o preparo do meio de cultura.

Com isso, é provável que esta fração de fósforo precipitada tenha ficado retida no filtro no processo de filtração que foi realizado antes da análise de ortofosfato. Esta hipótese pode ser confirmada com a quantificação do fósforo total, o qual também se apresentou abaixo da concentração esperada, indicando que o precipitado não estava presente na amostra.

Devido à precipitação do fosfato no tratamento Mn 4 houve modificação da concentração de fósforo na forma de ortofosfato.. Verificou-se que a relação N:P inicial e final neste tratamento foram bem altas: 147,3:1 e 652,7:1 indicando, além de grande limitação de fósforo, alto consumo deste (85%). Este tratamento também apresentou alta assimilação de nitrato, juntamente com Mn 3 (26,9% e 23,49% em Mn 3 e Mn 4, respectivamente). Isto mostra que mesmo com a aparente limitação de ortofosfato no tratamento Mn 4, houve grande consumo de nitrato, diferentemente do que foi observado no tratamento Fe 4.

O tratamento Mn 1 apresentou a menor assimilação de ortofosfato (8,0%) e consumo de nitrato semelhante com Mn 2 (19,1% e 20,0%, Mn 1 e Mn 2, respectivamente). A relação N:P sofreu pouca variação nos tratamentos Mn 1, Controle e Mn 2 entre 26:1 a 20,3:1 indicando consumo ligeiramente maior de nitrato do que de ortofosfato.

Através da análise da assimilação de ortofosfato pelo rendimento (P/biovolume) da cultura de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de Mn, verificou-se que o

consumo de ortofosfato por biovolume durante os 20 dias de cultivo, aumentou nas maiores concentrações de Mn 3,59 vezes (Tabela 18).

Figura 34 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de manganês. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 18 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de manganês.

Tratamento	μM	Ortofosfato/Biovolume (mg/10 ⁻⁴ μm ³)
Mn 1	0,7	1,53
Controle	7	0,91
Mn 2	70	1,01
Mn 3	200	4,11
Mn 4	600	5,50

• COBALTO

Verificou-se que nos tratamentos com variação de cobalto a concentração dos nutrientes diminuiu nos 20 dias de cultivo, com consumo ligeiramente maior de nitrato em todos os tratamentos (Figura 35). Por isso, a relação N:P de todos os tratamentos decaíram, variando entre 25,9:1 a 21,2:1. O tratamento Co 2 foi o que apresentou maior assimilação tanto de nitrato como de ortofosfato, com 24,8% e 13,5%, respectivamente.

Através da análise da assimilação de ortofosfato pelo rendimento (P/biovolume) da cultura de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de Co, verificou-se que o

consumo de ortofosfato por biovolume durante os 20 dias de cultivo, apresentou tendência de diminuição. (Tabela 19).

Figura 35 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de cobalto. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 19 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de cobalto.

Tratamento	μM	Ortofosfato/Biovolume ($\text{mg}/10^{-4} \mu\text{m}^3$)
Co 1	0,008	1,20
Controle	0,08	0,91
Co 2	0,8	1,36
Co 3	2,5	0,38
Co 4	8	0,66

• BORO

Pode-se notar, nos tratamentos com variação de boro, que a concentração dos nutrientes decaiu, porém sem uma diferença marcante entre os tratamentos (Figura 36). A assimilação de nitrato foi ligeiramente maior que do ortofosfato variando de 9,11% (B 4) a 14,10% (B 3) entre os tratamentos. Já o consumo de ortofosfato variou de 8,3 % (B 2) a 11,5% (Controle).

A relação entre nitrogênio e fósforo (N:P), equivalente à relação entre nitrato:ortofosfato, manteve-se relativamente constante nos tratamentos variando entre 27,9:1 a 22,5:1. Por isso, pode-se afirmar que não houve limitação dos nutrientes analisados durante o período de

estudo e que a assimilação dos nutrientes ocorrem de maneira semelhante nos diferentes tratamentos.

Através da análise da assimilação de ortofosfato pelo rendimento (P/biovolume) da cultura de *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de B, verificou-se que o consumo de ortofosfato por biovolume durante os 20 dias de cultivo, apresentou tendência de aumento nas maiores concentrações de B. (Tabela 20).

Figura 36 - Concentrações médias de nitrato e ortofosfato no meio de cultura de *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de boro. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 20 - Razão da concentração do ortofosfato assimilado pelo rendimento em biovolume em meio de cultura com alteração na concentração de boro.

Tratamento	µM	Ortofosfato/Biovolume (mg/10 ⁻⁴ µm ³)
B 1	4	1,00
Controle	40	0,91
B 2	400	0,98
B 3	1200	1,68
B 4	4000	1,34

5.3.4. Síntese de saxitoxina por *C. raciborskii* exposta a diferentes concentrações de micronutrientes.

Neste item estão expostos os resultados de concentração de STX por biovolume produzida por *C. raciborskii* exposta a 24 diferentes concentrações de micronutrientes, conforme Tabela 6. Para cada tratamento mensurou-se a STX em dois pontos do crescimento,

na fase exponencial (Dia 5) e na fase estacionária (Dia 20), com isso foi possível relacionar a etapa de crescimento com a síntese de toxina.

Verificou-se que as médias de STX por biovolume diminuíram aproximadamente 2 vezes na fase estacionária, comparando com a fase exponencial, na maioria dos tratamentos. No entanto, mesmo sendo evidente a diferença, não foi em todos os tratamentos que essa diferença foi significativa. O tratamento Controle, que é a condição sem alterações nas concentrações de micronutrientes (concentrações do ASM-1), apresentou diferença significativa entre as fases de crescimento 1,94 vezes (Descrito no item 5.2.).

Os resultados estão dispostos comparando os diferentes tratamentos de cada micronutriente separadamente, e utilizando as siglas dos tratamentos conforme Tabela 6.

• FERRO

Comparando as concentrações de STX produzida por *C. raciborskii* no dia 5, observou-se diferença estatística entre os tratamentos. O tratamento Fe 1 (0,4 μM), com menor concentração de Fe, obteve alta concentração de STX, sendo maior que os outros tratamentos ($4,72 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 37). A redução de 10 vezes da concentração de Fe do meio de cultura ASM-1, estimulou a produção de STX em 2,82 vezes.

Com relação às concentrações de STX do dia 20 não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, mas pode-se observar que Fe 1 e Fe 4 apresentaram as maiores médias, $1,76 \times 10^{-5}$ e $1,59 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$, comparando com os outros tratamentos ($0,86 \times 10^{-5}$; $1,12 \times 10^{-5}$ e $0,78 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$, Controle, Fe 2 e Fe 3 respectivamente). O aumento expressivo de STX na fase exponencial (dia 5), indicou que pode haver relação entre síntese de STX, limitação de Fe e processos de divisão celular, visto que na fase estacionária (dia 20) a toxina não aumentou.

Verificou-se que em todos os tratamentos a maior produção de STX ocorreu no dia 5, no entanto, somente o tratamento Fe 4 não apresentou diferença significativa entre os dias 5 e 20. Nos tratamentos Fe 1, Controle, Fe 2 e Fe 3 (com 0,4; 4,0 ; 10 e 60 μM de Fe, respectivamente) esta diferença foi significativa com aumento de 2,69, 1,94 , 1,98 e 1,74 vezes.

Figura 37 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg. μm^{-3}) produzida por *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Ferro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)

• ZINCO

Observando a Figura 38, nota-se uma tendência de redução da concentração de STX com o aumento da concentração de Zn, tanto no dia 5, quanto no dia 20.

No dia 5, comparando os tratamentos Zn 1 e Zn 4 (0,32 e 19,4 μM de Zn, respectivamente), verificou-se que o aumento de 60 vezes na concentração de Zn afetou significativamente a produção de STX com uma redução de 2,82 vezes (Concentração de STX de Zn 1 e Zn 4: $2,06 \times 10^{-3}$ e $0,73 \times 10^{-3}$ pg. μm^{-3} , respectivamente) (ANOVA, $p < 0,05$).

Quanto ao dia 20, não houve diferença significativa, no entanto, da mesma forma que o dia 5, é evidente a existência de uma tendência de redução da produção de STX com a adição de Zn no meio de cultura.

Comparando as fases de crescimento, verifica-se maior concentração de STX no dia 5 em todos os tratamentos, com confirmação estatística desse aumento nos tratamentos Zn 1, Controle e Zn 2, que tiveram 2,34 , 1,94 e 1,82 vezes mais STX do que no dia 20, respectivamente.

Figura 38 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg.µm⁻³) produzida por *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Zinco durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)

• COBRE

Comparando os valores de STX nos tratamentos com variação na concentração de cobre no dia 5, verificou-se que o aumento de mil vezes da concentração deste micronutriente (de 0,0008 a 0,8 µM de Cu), desencadeou maior produção de STX em 2,68 vezes (concentração de STX nos tratamentos Controle e Cu 3: $1,68 \times 10^{-5}$ e $4,45 \times 10^{-5}$ pg.µm⁻³, respectivamente). A maior concentração de STX no tratamento Cu 3 foi considerada significativa quando comparada aos outros tratamentos (Figura 39 (ANOVA, $p < 0,05$)).

Da mesma forma, no dia 20 também é evidente a maior média da concentração de STX no tratamento Cu 3 comparando com os outros tratamentos, no entanto esta diferença não foi confirmada estatisticamente.

Em todos os tratamentos houve diferença na concentração de STX entre os dias 5 e 20, sendo que no dia 5 as médias foram estatisticamente maiores. O tratamento Cu 3 foi o que apresentou maior diferença entre os dias amostrados com concentração 3,11 vezes maior no dia 5 do que no dia 20 (Figura 39).

Figura 39 - Concentração de STX por biovolume (10^{-5} pg.µm⁻³) produzida por *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Cobre durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)

• MANGANÊS

Verificou-se que a condição Controle (ASM-1) apresentou a maior concentração de STX por biovolume no dia 5 ($1,68 \times 10^{-5}$ pg.µm⁻³) quando comparada com Mn 2 (70 µM) e Mn 3 (200 µM) ($0,71 \times 10^{-5}$ e $0,75 \times 10^{-5}$ pg.µm⁻³) (ANOVA, $p < 0,05$). Já no dia 20 as médias da concentração de STX foram consideradas estatisticamente iguais (Figura 40).

Comparando a produção de STX ao longo do crescimento de *C. raciborskii* é possível observar que no dia 5 a produção foi maior, mas a diferença com o dia 20 somente foi significava no tratamento Mn 4.

• COBALTO

A variação na produção de STX por *C. raciborskii* em decorrência da modificação da concentração de cobalto foi evidente. Assim como ocorreu com os micronutrientes Fe e Zn, o aumento da concentração de Co desencadeou menor produção de STX, como pode ser observando na Figura 41, tanto na fase exponencial (dia 5), quanto na fase estacionária (dia 20).

No dia 5, o tratamento Co 1 (0,008 μM) apresentou concentração de STX por biovolume maior do que os outros tratamentos ($2,77 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$), sendo 4 vezes maior do que a concentração encontrada em Co 4 (com 8 μM de Co) , o qual obteve a menor média ($0,69 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (ANOVA, $p < 0,05$).

Da mesma forma no dia 20 os tratamentos extremos, Co 1 e Co 4, se diferenciaram na concentração de STX em 5,54 vezes, sendo Co 1 com valor maior que Co 4 ($1,22 \times 10^{-5}$ e $0,22 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$, respectivamente) (ANOVA, $p < 0,05$).

Comparando as concentrações de STX produzidas no dia 5 e 20 pode-se notar que todos os tratamentos obtiveram maior concentração no dia 5, esta diferença não foi significativa somente em Co 2 (0,8 μM).

Figura 40 - Concentração de STX por biovolume ($10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) produzida por *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Manganês durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)

• BORO

Analisando as concentrações de STX por biovolume produzidas no dia 5 pode-se notar um decaimento no tratamento B 4 (4000 μM) o qual obteve $0,57 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ de STX. Este tratamento foi menor que todos os outros tratamentos (Figura 42) (ANOVA, $p < 0,05$).

Já no dia 20, diferentemente do dia 5, houve um pico de produção de STX no tratamento B 3 (1200 μM) com $1,64 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$, sendo maior que os outros tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

O tratamento B 4 foi o único tratamento que obteve maior concentração de STX por biovolume no dia 20 do que no dia 5, no entanto esta diferença não foi significativa. Já os outros tratamentos obtiveram maiores valores de STX no dia 5, sendo estatisticamente diferente somente em B 1, Controle e B 2 (com 4, 40 e 400 μM de B).

Figura 41 - Concentração de STX por biovolume ($10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) produzida por *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Cobalto durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)

Figura 42 - Concentração de STX por biovolume ($10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) produzida por *C. raciborskii* exposta a cinco diferentes concentrações de Boro durante 20 dias. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)

- **Comparação entre os 24 tratamentos**

De modo geral, foi possível notar que a alteração na concentração de micronutrientes no meio de cultura ASM-1 afetou a produção de STX em *C. raciborskii*. Verificou-se efeito negativo na produção de STX com o aumento da concentração dos micronutrientes Fe, Zn, Co e B. Efeito contrário foi observado com o micronutriente Cu, que seu aumento acarretou um efeito positivo na síntese de STX. Quanto ao micronutriente Mn apresentou pico de produção no tratamento Controle.

Realizando uma comparação entre os 24 tratamentos verificou-se que, no dia 5 as maiores concentrações de STX ocorreram nos tratamentos Fe 1e Cu 3 (com $4,72 \times 10^{-5}$ e $4,45 \times 10^{-5}$ $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (ANOVA, $p < 0,05$), e as menores em B 4, Co 4, Mn 2 e Zn 4 (com $0,57 \times 10^{-5}$; $0,69 \times 10^{-5}$; $0,71 \times 10^{-5}$ e $0,73 \times 10^{-5}$ $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (Figura 43).

Em relação ao dia 20, verificou-se maiores concentrações de STX nos tratamentos Fe 1, B 3, Fe 4, Cu 3, Co 1 e Fe 2 (com médias de $1,79 \times 10^{-5}$; $1,64 \times 10^{-5}$; $1,59 \times 10^{-5}$; $1,43 \times 10^{-5}$; $1,22 \times 10^{-5}$ e $1,12 \times 10^{-5}$ $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (ANOVA, $p < 0,05$) e Co 4, Co 3, Zn 4 e Mn 4 exibiram as menores concentrações de STX ($0,47 \times 10^{-5}$; $0,39 \times 10^{-5}$; $0,38 \times 10^{-5}$ e $0,22 \times 10^{-5}$ $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (Figura 44).

As Figuras 43 e 44 apresentam gráficos que estão com a mesma escala de concentração de STX, com isso foi possível compará-los e verificar que é evidente as menores concentrações de STX no dia 20 (Figura 44) do que no dia 5 (Figura 43).

Figura 43 - Gráfico comparativo da concentração de STX produzida por *C. raciborskii* no dia 5, exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Figura 44 - Gráfico comparativo da concentração de STX produzida por *C. raciborskii* no dia 20, exposta a 24 tratamentos com diferentes concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

6. DISCUSSÃO

As escassas pesquisas que relacionam fatores ambientais à síntese de STX em *C. raciborskii* identificaram que a variação na temperatura (CASTRO et al., 2004), no pH e concentração de sódio (POMATI et al., 2004), na intensidade de luz (CARNEIRO et al., 2009), na concentração de cálcio (CARNEIRO et al., 2011), na relação N:P e interação com clorofíceas (VARGAS, 2012) afetaram a produção de STX em experimentos laboratoriais.

No entanto, não há referências sobre o efeito da variação dos micronutrientes (ou metais traço) na síntese de STX por *C. raciborskii*. Por isso, esta pesquisa buscou identificar e formular hipóteses para estas alterações, através de ensaios laboratoriais com diversas concentrações de micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B).

As hipóteses formuladas foram comparadas com pesquisas semelhantes realizadas com outras espécies tóxicas de cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* (LUKAC; AEGERTER, 1993; UTKILEN; GJOLME, 1995) e *Phormidium autumnale* (HARLAND et al., 2013); de dinoflagelados: *Alexandrium tamarense* (HE et al., 2010) e *Alexandrium excavatum* (STEWART, 2011); e de diatomáceas: *Pseudo-nitzschia* (MALDONADO et al., 2002).

Foi possível comparar e explicar os resultados obtidos nesta pesquisa com o apoio destes e de outros estudos. No entanto, existe uma dificuldade na comparação dos resultados de crescimento e concentração de STX, pois a forma de mensurar a biomassa diverge de acordo com o pesquisador.

Pesquisadores como, Lukac e Aegerter (1993) utilizaram DO₆₀₀ para monitorar o crescimento, e a microcistina foi normalizada pela biomassa seca. Harland et al. (2013), He et al. (2010), Maldonado et al. (2002) e Stewart et al. (2011) mensuraram $\mu_{\text{máx}}$ e normalizaram a toxina pela densidade de células.

Utkilen e Gjølme (1995) verificaram, através de experimento comparativo entre a normalização da cianotoxina com proteína, carboidrato e biomassa seca, que a melhor forma de expressar as mudanças de concentração de cianotoxina é através da normalização com a concentração de proteína. Eles demonstraram que a concentração de carboidrato ao longo do crescimento da cultura varia, afetando o peso da biomassa, sem necessariamente afetar a concentração de cianotoxina. Além disso, Negri et al. (1997) afirma que a normalização pela biomassa seca leva em consideração o peso de bactérias, quando o cultivo não é axênico.

Reynolds (2006) e Carneiro (2009) consideram o método de contagem das células em microscópio mais preciso apresentando menor chance de interpretações errôneas como as

citadas por Utkilen e Gjølme (1995). No entanto, observou-se na presente pesquisa que, dependendo da condição, as razões STX/densidade e STX/biovolume apresentam resultados bem diferentes, como verificado nos tratamentos com modificação de Cu.

Os tratamentos com modificação de Cu obtiveram significativa alteração na densidade e volume celular com o aumento da concentração de Cu. A densidade das células diminuiu 5 vezes com o aumento da concentração de Cu (Controle – $30,3 \times 10^4$ ind.mL⁻¹ e Cu 3 – $6,0 \times 10^4$ ind.mL⁻¹), já o volume aumentou 2,6 vezes (Controle – 1093,4 μm^3 e Cu 3 – 2843,4 μm^3). Estes resultados indicaram que a utilização da razão STX/densidade, neste caso, sem levar em consideração o aumento do volume, sobrestimaria a concentração de STX, devido à grande redução da densidade. Por isso, adotou-se neste estudo a razão STX/biovolume, já que dessa forma leva-se em conta as adaptações morfológicas de densidade e volume celular de *C. raciborskii*.

Tornando clara esta dificuldade de comparação entre as pesquisas, partiu-se para a discussão. Serão apresentados a partir de agora os principais resultados de síntese de STX e as possíveis explicações para o que ocorreu nos experimentos.

Foi evidente que a produção máxima de STX (intra e extracelular) por biovolume ocorreu durante a fase exponencial (dia 5) em quase todos os tratamentos. Esta maior produção de STX por biovolume contrasta com os resultados obtidos por Carneiro et al. (2009) que observaram maior produção por célula de *C. raciborskii*, na fase estacionária. Da mesma forma, as cianobactérias *Aphanizomenon* sp. (DIAS; PEREIRA; FRANCA, 2002) e *Anabaena circinalis* (NEGRI; JONES; 1997) apresentaram maiores concentrações de STX na fase final do crescimento. No entanto, os resultados da presente pesquisa corroboram com estudo de Harland et al. (2013) no qual a síntese de anatoxina-a por célula de *Phormidium autumnale* foi maior na fase exponencial. Além disso, corrobora com a tendência geral mostrada por vários dinoflagelados cultivados em batelada, em que as quotas de STX foram mais elevadas na fase exponencial, diminuindo quando a cultura entra na fase estacionária (ANDERSON; CHENG, 1988; TARONCHER-OLDENBURG, 1998).

Da mesma forma, foram encontrados em *Microcystis aeruginosa* (LYCK, 2004; ORR; JONES, 1998) elevadas quotas de microcistina na fase exponencial, atrelada a uma correlação positiva entre a quota de toxina e a $\mu_{\text{máx}}$. Estes resultados levam alguns pesquisadores a questionar o enquadramento das cianotoxinas como metabólito secundário (CARMICHAEL, 1992; LYCK, 2004) uma vez que em bactérias a síntese destes metabólitos é acionada quando o crescimento é interrompido (na fase estacionária), diferentemente do que ocorreu nas

pesquisas citadas e do que aconteceu no presente estudo: a síntese de STX foi maior na fase exponencial de crescimento.

Discussões como esta somente serão concluídas quando for descoberta a real função das cianotoxinas, pois ainda não há uma ideia consolidada dos benefícios e/ou prejuízos na sobrevivência das cepas não-tóxicas comparadas com cepas tóxicas, as quais gastam mais energia para síntese de toxina, cuja molécula é complexa e demanda energia e compostos nitrogenados essenciais às células.

Outra linha de pesquisa associa a síntese de toxina à limitação dos macronutrientes ao longo do crescimento. Anderson et al. (1990) identificaram em *Alexandrium sp* que a limitação de N que ocorre no final da fase exponencial é uma das causas para o decaimento da concentração da quota de toxina nesta fase, pois afeta a concentração do aminoácido arginina dentro da célula que está envolvido na biossíntese de STX. Já a limitação do P aumenta a concentração de STX nas células devido à inibição da divisão celular, causando maior acúmulo de toxina dentro das células.

Como descrito, a mudança da concentração dos nutrientes ao longo do crescimento em sistemas de batelada tem efeito na concentração de toxina. Por esta razão, a presente pesquisa focou-se na comparação da concentração de STX produzida no dia 5 pelos tratamentos, pois, além de ser a fase de maior produção de STX, há menor alteração da biodisponibilidade dos macronutrientes, como foi visto nos resultados de nitrato e ortofosfato.

Com relação à síntese de STX às diferentes condições de micronutrientes sobressaíram os resultados com limitação de Fe e maiores concentrações de Cu, os quais apresentaram os maiores valores de STX/biovolume, principalmente na fase exponencial ($4,72 \times 10^{-5}$ e $4,45 \times 10^{-5}$ pg. μm^{-3} , Fe 1 e Cu 3, respectivamente), por esta razão maior ênfase foi dada para estes micronutrientes.

Além disso, os resultados da modificação na concentração de Zn, Co e B também se destacaram com a diminuição gradual na concentração de STX à adição destes micronutrientes no meio.

Esta pesquisa demonstrou que a síntese de STX por *C. raciborskii* está relacionada à disponibilidade dos micronutrientes no meio de cultura. As hipóteses para explicar estes resultados estão baseadas em estudos que sugerem: a) que a toxina pode atuar como quelante extracelular ou intracelular, ora com ação de detoxificação em concentrações extremas de micronutrientes, ora como facilitador do acesso aos micronutrientes em concentrações limitantes (LUKAC; AEGERTER, 1993; MALDONADO et al., 2002; STEWART, 2011; UTKILEN; GJOLME, 1995); b) que a toxina pode se ligar a alguns transportadores de metais

presentes na membrana inibindo a absorção dos metais em excesso (CUSICK et al., 2012; CUSICK; SAYLER, 2013); c) que alguns metais podem regular a síntese de toxina afetando diretamente ou indiretamente sua expressão através de mecanismos genéticos (ALEXOVA et al., 2011; HE et al., 2010; SEVILLA et al., 2008;).

Analizando a ecofisiologia dos microrganismos fitoplânctônicos, todas estas hipóteses estão relacionadas ao desenvolvimento de estratégias para sobreviver em ambientes sob constantes mudanças da concentração de micronutrientes às quais foram desenvolvidas ao longo da evolução.

O micronutriente Fe é essencial para as cianobactérias, pois está envolvido em diversas vias metabólicas e estruturação de enzimas como: no transporte de elétrons através da enzima ferredoxina na fotossíntese e na respiração, na composição das enzimas nitrato e nitrito redutase responsáveis pela assimilação de nitrogênio, na composição da enzima nitrogenase e também do processo de fixação do nitrogênio atmosférico e na biossíntese de pigmentos (ANDERSEN, 2005; LEAL, 2006, REYNOLDS, 2006). Por esta razão, as cianobactérias desenvolveram mecanismos para facilitar ou acelerar a absorção deste importante micronutriente.

Nos oceanos geralmente o Fe é limitante, com 99% complexado com ligantes orgânicos (LEÃO et al., 2006; WELLS; PRICE; BRULAND, 1995). Já em águas continentais essa concentração é maior, mas da mesma forma que nos oceanos, grande parte encontra-se indisponível para os microrganismos. As principais fontes de Fe nos ambientes aquáticos continentais são: desgaste dos solos e rochas, lançamento de efluentes de metalúrgicas e pelo uso de coagulantes a base de ferro no tratamento da água (XING; LIU, 2011). Algumas cianobactérias possuem ligantes na membrana e ligantes livres extracelulares com finalidade de se associar aos íons de Fe e tornar sua disponibilidade maior ou menor, dependendo do ligante. Em ambientes com limitação deste micronutriente, um destes ligantes é o sideróforo (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006; LEÃO et al., 2006).

Muitas espécies de cianobactérias de águas continentais possuem esta molécula sideróforo (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006), mas ainda não foram encontradas em *C. raciborskii*. Pesquisadores identificaram que algumas toxinas podem agir de forma semelhante aos sideróforos ligando-se ao Fe para que este se torne disponível (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; STEWART, 2011).

Lyck et al. (1996), verificaram que em condições com baixas concentrações de Fe, as cepas tóxicas de *Microcystis* mantiveram-se vivas por muito mais tempo do que as não-tóxicas. Da mesma forma, Utikilen e Gjølme (1995), observaram que cepas tóxicas

apresentaram maiores taxas de absorção de Fe do que as não-tóxicas. Já Lukac e Aegerter (1993), verificaram um aumento de 20 a 40 % na síntese de microcistina em condições de Fe-limitante (0,1 μM) pela *M. aeruginosa*, no entanto não foi possível afirmar a maior absorção de Fe, pois a concentração deste micronutriente não foi determinada.

Estudos mais recentes explicam este efeito na síntese de microcistina sob limitação de Fe através dos mecanismos genéticos. A expressão da microcistina pode ser regulada pela proteína Fur (*Ferric uptake regulator* – Regulador da absorção de ferro), por conseguinte, a síntese desta proteína é intensificada em condições de baixa concentração de Fe no citosol. Além desta proteína estar envolvida na síntese de microcistina, também regula a síntese dos sideróforos (ALEXOVA et al., 2011; SEVILLA et al., 2008)

Similar à síntese de microcistina, He et al. (2010) observaram que na concentração de 1nM de Fe, o dinoflagelado *Alexandrium tamarense* produziu STX 2,6 vezes mais (ou 160% mais) do que na condição controle, no entanto não foi determinada se a absorção de Fe aumentou. Já Stewart (2011), verificou que a adição do análogo goniatóxina 5 (GTX5) na cultura de *Alexandrium excavatum* ocasionou na redução do íon Fe^{3+} e ligação com Fe^{3+} , agindo semelhante à sideróforos de bactérias.

Outra toxina que obteve os mesmos efeitos que a microcistina e a STX foi o ácido domóico (DA). Maldonado et al. (2002) verificaram aumento de 3 vezes na velocidade de absorção de Fe na diatomácea marinha *Pseudo-nitzschia* na presença desta toxina em meio de cultura sob limitação de Fe (0,0017 μM). Os autores sugerem que o DA não pode ser comparado aos sideróforos, pois a capacidade de acelerar a absorção de Fe é muito maior com sideróforos do que com o DA, mas consideram como uma importante estratégia de absorver Fe quando está limitante no meio.

Diante disso, pode-se relacionar os resultados da presente pesquisa com o que foi verificado nos estudos citados. O aumento de STX foi de 2,82 vezes (ou 182 %) no tratamento com baixa concentração de Fe (0,4 μM), no entanto não foi possível afirmar se houve maior absorção de Fe, pois a concentração deste micronutriente não foi determinada. Além disso, neste estudo não se diferenciou a STX extra e intracelular, por isso não se pode afirmar se essa maior síntese teve como objetivo facilitar a absorção do Fe. No entanto, identificou-se pela primeira vez que a cepa tóxica *C. raciborskii* sintetiza maior quantidade de STX/biovolume, quando em condição de Fe-limitante, sendo semelhante às pesquisas com outros microrganismos fitoplanctônicos produtores de toxina.

Com relação à síntese de STX nos tratamentos com modificação de Cu, ocorreu o oposto comparando com os resultados de modificação de Fe. A maior concentração de

STX/biovolume ($4,45 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) foi verificada no tratamento com elevada quantidade de Cu ($0,8 \mu\text{M}$), sendo um aumento de 2,68 vezes (168%) em relação ao Controle ($0,0008 \mu\text{M}$ de Cu). Maldonado et al. (2002) obtiveram resultados semelhante com cepa de *Pseudo-nitzschia* produtora de ácido domóico (DA), com um aumento de 20 vezes na concentração de DA sob condições de Cu-estressado ($1,8 \mu\text{M}$). Além disso, os autores verificaram que a adição de DA em culturas com altas concentrações de Cu, o crescimento das células aumentou. No entanto, tanto no presente estudo, quanto no de Maldonado et al. (2002) não foi determinada a absorção de Cu pelas células. Já Cusick et al. (2012) demonstraram que a exposição à STX inibiu a absorção de Cu pela levedura *S. cerevisiae*.

Maldonado et al. (2002) verificaram semelhanças entre as moléculas de DA e as moléculas de ligantes de cobre, as quais são liberadas por outras diatomáceas sob alta concentração de Cu, com o objetivo de se complexarem com este metal, diminuindo sua disponibilidade e por consequência sua toxicidade. Comparando a constante de estabilidade de complexação com Cu (K), os autores identificaram que os ligantes apresentam maior afinidade do que o DA ao íon Cu, no entanto os autores consideraram a síntese de DA uma importante estratégia de sobrevivência em meio com altas concentrações de Cu.

Diferentemente de Maldonado et al. (2002), Cusick et al. (2012) propuseram que ao invés da STX se complexar com o Cu, a STX se liga diretamente aos transportadores de Cu, impedindo a assimilação deste metal. Este recente estudo identificou que a STX, além de apresentar afinidade pelos canais de sódio, também possui afinidade aos transportadores de Cu presentes na membrana celular de algas, cianobactérias e leveduras.

Analisando estas duas pesquisas nota-se duas hipóteses de mecanismo de detoxificação às altas concentrações de Cu através da síntese de toxina: complexação com o íon Cu (tornando-o indisponível para a diatomácea) e ligação com os transportadores de Cu da membrana (impedindo que este seja assimilado). Comparando estas hipóteses com os resultados do presente estudo, pode-se afirmar que a síntese de STX por *C. raciborskii*, sob estresse de Cu, pode ter como função a detoxificação deste metal.

Apesar de não termos utilizado ferramentas bioquímicas para investigar complexação e ligação da toxina ao Cu, a hipótese de detoxificação pode ser sustentada analisando os dados de assimilação de ortofosfato por biovolume (P/biovolume). Verificou-se que em todos os tratamentos, com exceção dos tratamentos com modificação de Cu, houve um aumento ou pico de assimilação de P/biovolume nas maiores concentrações de micronutrientes no meio, apresentando destaque nos tratamentos com modificação no Mn e no Fe. Associou-se este aumento gradual da assimilação de P/biovolume com um mecanismo de detoxificação de metais,

que consiste na formação intracelular de grânulos de polifosfato, os quais tem o papel de complexar metais dentro da célula (KNAUER, 1996; HUDEK et al., 2009).

Estes resultados indicaram que o aumento em mil vezes na concentração de Cu no meio de cultura, não alterou a absorção de P/biovolume por *C. raciborskii*, como observado nos outros tratamentos. Por isso, é provável que sob alta concentração de Cu o mecanismo utilizado para sobrevivência de *C. raciborskii* não seja a complexação com as moléculas de polifosfato intracelular, como observa-se em algumas cianobactérias, mas sim a complexação da STX com os transportadores de Cu na membrana plasmática ou a ligação com Cu dissolvido.

Os resultados de concentração de STX/biovolume obtidos pela variação dos micronutrientes Zn, Co e B indicaram uma tendência de redução com a adição destes micronutrientes. Comparando os maiores e menores valores de STX/biovolume, o tratamento Zn 4 (19,4 μM) apresentou redução de 2,82 vezes (182%), Co 4 (8 μM) obteve diminuição de 4 vezes (300%) e B 4 (4000 μM) redução de 3,1 vezes (210%). Já a modificação do micronutriente Mn não apresentou tendência com a síntese de STX/biovolume.

Lukac e Aegerter (1992) obtiveram resultado semelhante com a alteração da concentração de Zn, sendo menor a produção de microcistina nas concentrações mais elevadas de Zn (1,0 μM). Não foram encontradas referências relacionando os micronutrientes Co, B e Mn com síntese de toxina, por isso pela primeira vez identificou-se que estes micronutrientes afetam significativamente a produção de STX por *C. raciborskii*.

Este efeito na síntese de STX nas condições com menores concentrações de micronutrientes (Zn, Co e B) pode ser relacionada à hipótese de que a STX funciona como um complexante de metais, tornando-os disponíveis para a cianobactéria.

Além disso, verificou-se, através do teste de correlação de Pearson, que Zn e B apresentam forte correlação positiva entre $\mu_{\text{máx}}$ e STX/biovolume ($r = 0,7$ e $0,71$ para Zn e B, repectivamente). O oposto aconteceu com o micronutriente Co, que apresentou forte correlação negativa de $\mu_{\text{máx}}$ e STX/biovolume ($r = -0,92$). Estes resultados indicam que o efeito da variação destes micronutrientes sobre a síntese de STX (Zn, B e Co), pode ser indireto, sendo regulada pelos mecanismos de divisão celular. (ANDERSON et al., 1990; LYCK, 2004; ORR; JONES, 1998).

Em relação ao Fe, Cu e Mn apresentaram correlação fraca entre $\mu_{\text{máx}}$ e STX/biovolume, indicando que a alteração na síntese de STX provavelmente está relacionada à outras variáveis, como já discutido sobre os micronutrientes Fe e Cu.

Além da discussão sobre a síntese de STX, foram investigados os efeitos no crescimento desta cianobactéria sob diferentes concentrações de micronutrientes, identificando as melhores faixas de crescimento e também as concentrações que causaram limitação no crescimento de *C. raciborskii*.

A assimilação dos micronutrientes (metais traço) acontece através da membrana plasmática podendo ser de forma não específica, com capacidade de transportar mais de uma espécie para dentro da célula, e de forma específica através de transportadores. O transporte não específico de metais ocorre mais rapidamente e acompanha o gradiente quimiosmótico, já o transporte específico necessita de ATP e está envolvido na regulação da concentração de micronutrientes dentro das células (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006; CAVET et al., 2003).

Um dos mecanismos que contribuem para a toxicidade dos metais, em meio com elevadas concentrações, é o transporte de metais não específico presente na membrana celular, o qual continua carregando metais para dentro da célula mesmo quando a concentração do metal no citoplasma já está elevada. Dentro da célula, esses metais em excesso podem inativar enzimas e competir com outros metais, inibindo sua função fisiológica (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006; CAVET et al., 2003).

Como já descrito, as cianobactérias tem a capacidade de regular a biodisponibilidade dos metais através de mecanismos como adsorção, oxidação e redução dos metais na superfície da célula, liberação de substâncias complexantes e aumento da absorção de fosfato para constituir os grânulos de polifosfato, permitindo acesso facilitado aos metais menos disponíveis, ou, ao contrário, impedindo que os metais atinjam níveis intoleráveis pelas células (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006; CAVET et al., 2003; KNAUER, 1996).

Verificou-se no presente trabalho que o efeito de Fe e Mn no crescimento de *C. raciborskii* foi semelhante: enquanto concentrações extremas inibiram o crescimento (Fe: 0,4 e 400 μM e Mn: 0,7 e 600 μM), as concentrações centrais o favoreceram (4 a 60 μM para Fe e 7 a 200 μM para Mn). Reynolds (2006), afirmou que a quantidade destes micronutrientes nas células de algas e cianobactérias são similares, corroborando com os efeitos no crescimento de *C. raciborskii*.

Foi observado que a menor concentração de Fe (0,4 μM) não afetou significativamente a $\mu_{\text{máx}}$ nem a quantidade de clorofila *a* em *C. raciborskii*. É provável que esta concentração de Fe (0,4 μM) foi suficiente para manter a divisão celular e a síntese de clorofila *a*, no entanto, o acúmulo de biomassa (fixação do carbono) foi afetado, por essa razão os valores de rendimentos foram significativamente menores.

Sabe-se da essencialidade do Fe para as cianobactérias, mas sob alta disponibilidade resulta em um acúmulo intracelular causando estresse oxidativo que por sua vez provoca danos nas proteínas, DNA e lipídios da membrana plasmática através dos metabólitos reativos de oxigênio (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006; LEAL, 2006,). Neste estudo, verificou-se que a alta concentração de Fe (400 μM) no meio diminuiu o crescimento de *C. raciborskii*.

Com relação ao Mn, sua principal função nos organismos fitoplanctônicos, é a constituição da enzima do complexo produtor de oxigênio, nos centros de oxidação da água, no processo de fotofosforilação. Por isso, sob limitação deste micronutriente a fotossíntese é afetada (CAVET et al., 2003). Este efeito foi confirmado pelos valores de clorofila *a*, que estavam diminuídos nos tratamentos com menores concentrações de Mn. Além disso, verificou-se que o excesso deste micronutriente afetou de forma mais evidente a concentração de clorofila *a*, mantendo-a praticamente constante ao longo do crescimento.

Além destes efeitos no crescimento, observou-se maior assimilação de ortofosfato por biovolume nos tratamentos com excesso de Mn e Fe, sendo considerada uma resposta fisiológica para proteger as células de altas concentrações destes micronutrientes. Como discutido anteriormente, é provável que a maior absorção de P/biovolume ocorreu para formação de grânulos de polifosfato com papel de se complexar com o excesso de metais dentro da célula. Este efeito também foi observado nos tratamentos com excesso de Fe, Zn, Co e B, no entanto foi mais evidente em Mn. Hudek et al. (2009) verificaram que estes grânulos geralmente estão mais associados ao Mn do que com outros metais. Da mesma forma, Rangsayatorn et al. (2002) verificou o aumento da formação destes grânulos em *Spirulina plantensis* quando exposta à alta concentração de Cd (71 μM).

Com relação ao efeito do Cu em *C. raciborskii*, verificou-se, no início da aclimação, alta toxicidade deste micronutriente que impediu o cultivo com concentração de 1,8 μM . Porém, ao longo das gerações notou-se que a cianobactéria se adaptou às novas concentrações, apresentando resultados de crescimento iguais ou até melhores comparado ao tratamento Controle (ASM-1) em concentrações de 10, 100 e 1000 vezes maiores.

Foi observado que a concentração de Cu no meio de cultura ASM-1 (0,0008 μM) é limitante ao crescimento de *C. raciborskii*, pois um aumento em 10 vezes na concentração de Cu no meio de cultura ASM-1 resultou em melhor crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e rendimento), e o aumento de 100 vezes na concentração de Cu resultou em maiores valores de clorofila *a*. Segundo Reynolds (2006), este micronutriente é utilizado por várias enzimas como cofator, e devido à sua habilidade em se converter entre os estados reduzido e oxidado seu principal

papel nos organismos fitoplanctônicos é a transferência de elétrons na fotossíntese (plastocianina).

Com relação à toxicidade de Cu, Brand, Sunda e Guillard (1986) averiguaram que altas concentrações de Cu causam redução no crescimento, principalmente de cianobactérias, diminuindo $\mu_{\text{máx}}$ e a taxa fotossintética. Além disso, este metal pode causar interferências na absorção do metal Mn que também está relacionado com transporte de elétrons na fotossíntese (CAVET et al., 2003). Devido a esta alta toxicidade, o sulfato de cobre é largamente utilizado no controle de algas e cianobactérias em reservatórios (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006).

No entanto, verificou-se no presente trabalho que a concentração de 0,8 μM de Cu afetou significativamente as concentrações de clorofila *a*, porém o crescimento não foi prejudicado, apresentando altos valores de $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento. A hipótese é que pigmentos acessórios, tais como ficocianina e ficoeritrina foram sintetizados e utilizados na fotossíntese. Este resultado mostra que o uso desta variável (clorofila *a*) como mensuração de biomassa, dependendo da condição, pode apresentar graves erros de interpretação.

Além disso, *C. raciborskii* sofreu alterações morfológicas e fisiológicas para se adaptar à maior concentração de Cu, como: a) aumento de 2,6 vezes (160%) no volume dos tricomas diminuindo a absorção de nutrientes, causada pela menor relação superfície/volume e b) maior síntese de STX, provavelmente para impedir a assimilação de Cu em excesso ou para imobilizá-lo por complexação.

Sobre a adaptação de *C. raciborskii* exposta a Cu no início do experimento, pode ser uma mutação na expressão dos transportadores de Cu. García-Villada et al. (2004) verificaram alta taxa de mutação espontânea em *Microcystis aeruginosa*, a qual era sensível à elevadas concentrações de Cu e após permanecer sob condições de alta concentração, tornou-se resistente a este metal em concentrações de até 5,8 μM .

Estes resultados sobre o efeito de Cu em *C. raciborskii* são de extrema importância devido à comum utilização de sulfato de cobre como algicida em lagos e reservatórios. Diante das estratégias de sobrevivência de *C. raciborskii* observadas neste estudo, e outras que não foram mensuradas, o uso deste produto no ambiente aquático pode estar selecionando cepas mais resistentes e mais tóxicas. Além disso, estes algicidas promovem o rompimento da membrana celular, liberando a toxina para o ambiente.

C. raciborskii se mostrou sensível ao micronutriente Zn, sobrevivendo com um aumento na concentração de somente 6 vezes (19,4 μM), em relação ao ASM-1, já os outros micronutrientes estudados alcançaram maiores concentrações, com aumento de até 100 vezes

em relação ao ASM-1. Resposta semelhante quanto à toxicidade de Zn foi verificada por Lukac e Aegerter (1992), os quais observaram as maiores $\mu_{\text{máx}}$ em *M. aeruginosa*, nas condições com baixa concentração de Zn (0,01 a 1 μM), no entanto, na concentração de 10 μM a cianobactéria não sobreviveu.

O Zn é essencial para a atividade da enzima anidrase carbônica que é responsável pela conversão do bicarbonato em gás carbônico, e em seguida a Rubisco incorpora o carbono em açúcar. (BAPTISTA; VASCONCELOS, 2006; REYNOLDS, 2006) Dessa forma, este micronutriente está envolvido indiretamente com a fixação do C. Porém altas concentrações causam danos na membrana celular e um transporte descontrolado de eletrólitos e íons na célula (OKMEN et al., 2011). Isso explica a inibição do crescimento observada neste estudo.

Averiguou-se baixa concentração de clorofila *a* em *C. raciborskii* exposta a maior concentração de Zn. Okmen et al. (2011) também observaram este decaimento em *Anabaena* sp. e em *Gloeothoece* sp e explica este fato pela destruição dos pigmentos e da membrana fotossintética.

Outro fator que interfere no crescimento é a competição de Zn com o Mn pelo sistema de transporte da célula, e quando em ambientes com alta concentração de Zn a cianobactéria pode ser afetada pela limitação de Mn em seu citoplasma (CAVET et al. 2013 SUNDA; HUNTSMAN, 1998).

Nas maiores concentrações de Zn verificou-se ligeiro aumento na absorção de P/biovolume, indicando uma possível resposta à toxicidade de Zn através do acúmulo de grânulos de polifosfato. Este mesmo efeito foi observado por Andrade et al. (2004) em testes laboratoriais com *Synechocystis aquatilis* exposta à 25 μM de Zn.

Com relação ao micronutriente cobalto, a concentração máxima adotada neste estudo (8 μM), não foi tóxica para *C. raciborskii*. No entanto, a menor concentração (0,008 μM) limitou o acúmulo de biomassa, com baixo valor de rendimento, sem afetar a divisão celular ($\mu_{\text{máx}}$). Saito, Rocap e Moffet (2005), também identificaram limitação no crescimento das cianobactérias marinhas *Synechococcus* e *Prochlorococcus* sob baixa concentração de Co e evidenciaram a existência de ligantes de Co nos oceanos que facilitam sua absorção.

O micronutriente Co é o cofator metálico central da molécula de vitamina B₁₂ (cobalamina) que somente é sintetizada por organismos procariontes, como as cianobactérias. Por esse motivo para as cianobactérias a exigência deste micronutriente é maior do que para os organismos fitoplanctônicos eucariontes. No entanto, a vitamina B₁₂ é essencial para os grupos fitoplânctônicos, pois é necessária para a síntese de várias enzimas. Além disso, Co

pode substituir a função de Zn na enzima anidrase carbônica, participando de forma indireta na fixação de C (MARTENS et al., 2001; PANZECA et al., 2008; SAITO et al., 2002)

Notou-se, no presente trabalho, que a grande variação da concentração de Co (mil vezes) não afetou a concentração de clorofila *a*. Este resultado evidencia que a disponibilidade de Co (nesta escala que foi adotada) não está relacionada à síntese de clorofila *a*. Além disso, é provável que nestas concentrações testadas não houve competição com outro metal que tenha relação com a síntese de clorofila *a*.

Quanto ao micronutriente boro, não houve inibição estatística no crescimento de *C. raciborskii*, no entanto foi nítido o decaimento do valor do rendimento quando exposta às maiores concentrações, indicando toxicidade. Este foi o micronutriente com maiores concentrações no meio, alcançando até 4000 µM.

O micronutriente B não é essencial a todos os organismos do fitoplâncton, por isso poucas pesquisas evidenciaram seu papel no crescimento destes microrganismos. Bonilla, Garcia-González e Mateo (1990) verificaram, em experimentos laboratoriais, que a limitação deste micronutriente no meio de cultura inibiu o crescimento e a atividade da enzima nitrogenase nas cianobactérias diazotróficas *Nodularina sp.*, *Chlorogloeopsis sp.* e *Nostoc sp.* Observaram que a possível causa para esta inibição da enzima nitrogenase foram alterações no heterocito que possibilitou o contato do oxigênio com esta enzima, inibindo assim sua atividade. Por isso, estes autores sugerem que para cianobactérias diazotróficas o micronutriente B é essencial.

Porém no presente trabalho não foi verificada limitação causada pela baixa concentração de B, seria necessário realizar experimentos com concentrações menores do que as testadas neste estudo.

Também foi averiguado que nas maiores concentrações de B a absorção de P/biovolume aumentou, indicando uma possível resposta de *C. raciborskii* à toxicidade de B através do acúmulo de grânulos de polifosfato.

Diante do que foi discutido, observou-se pela primeira vez, em ensaios laboratoriais, que cepa tóxica da cianobactéria *C. raciborskii* respondeu às alterações na concentração de micronutrientes (ou metais), através de mudanças em seu crescimento, na síntese de clorofila *a*, na assimilação de nitrato e ortofosfato e na produção de STX. Este fato é de extrema importância para ampliar os conhecimentos sobre esta espécie, contribuindo com as atuais investigações que estão sendo realizadas para desvendar os fatores que permitem sua dominância em lagos e reservatórios em diversas regiões do planeta.

Além disso, estudos como este são fundamentais para análise criteriosa de cada variável ambiental (neste caso os micronutrientes), podendo ser utilizados como ferramenta de diagnóstico e prevenção de florações tóxicas.

Embora se deva ter prudência nas extrapolações destes resultados laboratoriais para o ambiente, as florações podem estar associadas à presença destes micronutrientes na água. Por isso, recomenda-se monitoramento desta variável em ambientes com florações, possibilitando maior compreensão da dinâmica destes eventos.

Por ser um estudo sem precedentes na literatura, os resultados expostos aqui ainda são preliminares e por isso limita extrapolações sobre a síntese de STX em todas as cepas desta espécie, visto que podem se diferenciar pela morfologia e fisiologia, habitar variados ambientes e sintetizar diferentes análogos de STX, os quais não foram identificados neste estudo. Além disso, estudos com metais traço requerem informações mais aprofundadas sobre, por exemplo a fração biodisponível presente em cada tratamento.

Portanto, como era de se esperar, este estudo chega ao fim com questões ainda pendentes para serem respondidas em pesquisas futuras.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos sobre a modificação da concentração dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn, Co e B em cultura de *C. raciborskii*, pode-se concluir:

I. Quanto ao efeito na síntese de STX:

- A síntese de STX (intra e extracelular) por biovolume foi maior durante a fase exponencial (dia 5) em praticamente todos os tratamentos, indicando relação entre a síntese de STX com o crescimento de *C. raciborskii*.
- No tratamento com menor concentração de Fe (0,4 μM) houve aumento de 2,82 vezes (182%) na produção de STX, no dia 5. A hipótese, baseada em pesquisas com outros microrganismos fitoplancônicos, é que a toxina pode atuar como facilitador ao acesso do Fe que estava limitante no meio.
- Na condição com maior concentração de Cu (0,8 μM), houve elevada síntese de STX/biovolume no dia 5, com aumento de 2,68 vezes (168%) em relação ao Controle. A hipótese é que a STX pode se ligar aos transportadores de Cu ou se complexar com os íons de Cu, impedindo sua absorção.
- Houve tendência de redução na síntese de STX/biovolume nas maiores concentrações de micronutrientes para Zn, Co e B, nos seguintes níveis: 2,82 vezes (182%) para Zn (19,4 μM), 4 vezes (300%) para Co (8 μM) e 3,1 vezes (210%) para B (4000 μM). Este efeito, similar ao ocorrido com o micronutriente Fe, pode ser relacionada à hipótese de que a STX funciona como complexante de metais, tornando-os disponíveis para a cianobactéria.

II. Quanto ao efeito no crescimento de C. raciborskii:

- Para o micronutriente Fe e Mn, enquanto concentrações extremas inibiram o crescimento (Fe: 0,4 e 400 μM e Mn: 0,7 e 600 μM), as concentrações centrais o favoreceram (Fe: 4 a 60 μM e Mn : 7 a 200 μM).
- Na maior concentração de Cu (0,08 μM) *C. raciborskii* sofreu alteração morfológica com aumento de 2,6 vezes (160%) do volume celular, diminuindo a relação superfície/volume da célula. Esta alteração pode ser uma estratégia de adaptação à elevada concentração de Cu, diminuindo sua absorção.

- A síntese de clorofila *a* foi significativamente afetada no tratamento com maior concentração de Cu (0,8 μM), no entanto seu crescimento não foi prejudicado. Este resultado mostra que o uso desta variável (clorofila *a*) como mensuração de biomassa, dependendo da condição, pode apresentar graves erros de interpretação.
- Concentração de 19,4 μM de Zn inibiu o crescimento de *C. raciborskii*, com menores valores de $\mu_{\text{máx}}$ e rendimento.
- A menor concentração de Co testada (0,008 μM), limitou o acúmulo de biomassa, com baixo valor de rendimento, sem afetar a divisão celular ($\mu_{\text{máx}}$).
- Maiores concentrações de B (4000 μM), inibiram o crescimento de *C. raciborskii*.
- O aumento da concentração dos micronutrientes Fe, Zn, Mn e B no meio de cultura causaram maior assimilação de ortofosfato por biovolume (P/biovolume) em *C. raciborskii*, sendo que nos micronutrientes Mn e Fe esta assimilação foi maior. A hipótese é que esta resposta fisiológica de *C. raciborskii* pode estar relacionada a um mecanismo de detoxificação que consiste na formação de grânulos de polifosfato que complexam com o excesso de metais dentro da célula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOVA, R.; FUJLL, M.; BIRCH, D.; CHENG, J.; WALTE, T.D.; FERRARI, B.C.; NEILAN, B.A. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 1064-1077, 2011.

ANDERSON, D. Red tides. **Scientific American**, August: 52-58, 1994.

ANDERSON, D. M.; D. M. KULIS; J. J. SULLIVAN; S. HALL; C. LEE. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* **Marine Biology**. v. 104, p. 511-524, 1990.

ANDERSON, D. M.; CHENG, T. P. Intracellular localization of saxitoxins in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. **J. Phycol.** v. 24, p. 17 – 22, 1988.

ANDERSEN, R.A. **Algal Culturing Techniques**. Academic Press. 563p, 2005.

ANDRADE, L.; KEIM, C. N.; FARINA, M.; PFEIFFER, W. C. Zinc detoxification by a cyanobacterium from a metal contaminated bay in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 147-152. 2004

APHA, American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed., Washington: Byrd Prepress Springfield, 2005.

BARKÁCS, K.; VARGA, A.; GÁL-SOLYMOS, K.; ZÁRAY, G. Direct determination of metal concentrations in freshwater algae by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 577-581, 1999.

BAPTISTA, M. S.; VASCONCELOS, M. T. Cyanobacterial metal interactions: Requirements, toxicity and ecological implications. **Informa Healthcare**, v. 32, p. 127 – 137, 2006.

BRAND, L. E.; SUNDA W. G.; GUILLARD, R. R. L. Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v. 96, p. 225 – 250. 1986.

BERRY, J.P.; LIND, O. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). **Toxicon**, v. 55, p. 930-938, 2010.

BICUDO, C.E.M. e MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. Ed. Rima, 2006, 489p.

BRIAND, J.; LEBOULANGER, C.; HUMBERT, J.; BERNARD, C.; DUFOUR, P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, v. 40, p.231-238, 2004.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 30, p.82-90, 2003.

BONILLA, I.; GARCIA-GONZÁLEZ, M.; MATEO, P. Boron requirement in Cyanobacteria. **Plant Physiol.** v. 94, p. 1554 – 1560, 1990.

BRASIL. **Portaria nº518 de 25 de março de 2004**. Brasília: Ministério da Saúde, 21p.

BURFORD, M. A.; DAVIS, T. W. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 29, p. 883-891, 2011.

CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; DOS SANTOS, A.C.A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: Rima, 109p, 2006.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 72, p. 445 – 459, 1992.

CARNEIRO, T.G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, Ed. 32, n. 32, 2007.

CARNEIRO, R. L.; DOS SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**. v. 31, n. 5., p. 481-488, 2009.

CARNEIRO, R. L.; ALÍPIO, A. C. N.; BISCH, P. M.; AZEVEDO, S. M. F. O.; PACHECO, A. B. F. The inhibitory effect of calcil on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) metabolism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1547-1559, 2011.

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VÁSQUEZ, M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, v. 44, p. 483-489, 2004.

CAVALIERE, R. **The regulation of saxitoxin production in cyanobacteria**. 136 f. Tese. (Doctor of Philosophy). School of Biotechnology and Biomolecular Sciences. The University of New South Wales – Australia, 2008.

CAVE, J. S.; BORRELLY, G. P. M.; ROBINSON, N. J. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 165 – 181, 2003.

CIRÉS, S.; WORMER, L.; TIMÓN, J.; WIEDNER, C.; QUESADA, A.. *Cylindrospermopsis* production and release by the potentially invasive cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* under temperature and light gradients. **Harmful Algae**, v. 10, p. 668-675, 2011.

CUCULIC, V.; MARKO, B. Adsorption of trace metals from sea-water onto solid surfaces: analysis by anodic stripping voltammetry. **Analyst**, v. 121, p. 1127 – 1131, 1996.

- CUSICK, K. D.; MINKIN JR, S.C.; DODANI, S. C.; CHANG, C.J.; WILHELM, S.W.; SAYLER, G. S. Inhibition of copper uptake in yeast reveals the copper transporter Ctr1p as a potential molecular target of saxitoxin. **Environ. Sci. Tecnol.**, v. 46, p. 2959-2966, 2012.
- DE SOUZA, R. C. R.; CARVALHO, M.C.; TRUZZI, A.C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) Dominance and a Contribution to the Knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings Reservoir, Brazil. **Reservoir water quality**, 1998.
- DE WEVER, A.; MUYLAERT, K.; LANGLET, D.; ALLEMAN, L.; DESCY, J.; ANDRÉ, L.; COCQUYT, C.; VYVERMAN, W. Differential response of phytoplankton to additions of nitrogen, phosphorus and iron in Lake Tanganyika. **Freshwater Biology**, v. 53, p.264-277, 2008.
- DIAS E.; PEREIRA P.; FRANCA, S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (Cyanobacteria). **J. Phycol.**, v. 38, p. 705 – 712, 2002.
- DUFOUR, P.; SARAZIN, G.; QUIBLIER, C.; SANE, S.; LEBOULANGER, C. Cascading nutrient limitation of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Sahelian lake (North Senegal) **Aquatic Microbial Ecology**, v. 44, p. 219-230, 2006.
- GARCÍA-VILLADA, L.; RICO, M.; ALTAMIRANO, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; LÓPEZ-RODOS, V.; COSTAS, E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulfate as algacide. **Water Research**, v. 38, p. 2207-2213, 2004.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v.15, p. 796-804, 1964.
- GRIFFITHS, M.J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S.T.L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 119-123, 2011.
- GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. WC Medium. In: ANDERSEN, R.A. **Algal culturing techniques**. Academic Press, 2005. 578p, 1972.
- GUILLARD, R.R.L. Purification Methods for Microalgae. In: ANDERSEN, R.A. (Ed). **Algal Culturing Techniques**. Academic Press. p. 117-132, 2005.
- HARLAND, F. M. J.; WOOD, S. A.; MOLTCHANOVA, E.; WILLIAMSON, W. M.; GAW, S. *Phormidium autumnale* growth and anatoxin-a production under iron and copper stress. **Toxins**, v. 5, p. 2504 – 2521, 2013.
- HE, H.; CHEN, F.; LI, H.; XIANG, W.; LI, Y.; JIANG, Y. Effect of iron on growth, biochemical composition and paralytic shellfish poisoning toxins production of *Alexandrium tamarense*. **Harmful Algae**, v. 9, p. 98-104, 2010.
- HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C.D.; KIRSCHTEL, D. Biovolume calculations for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 403-424, 1999.

HOLLAND, D.P.; PANTORNO, A.; ORR, P.T.; STOJKOVIC, S.; BEARDALL, J. The impacts of a high CO₂ environment on a bicarbonate user: The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Water Research**, v.46, p.1430-1437, 2012.

HONDA, R.Y.; CRESPI, E. In: JACINAVICIUS, F.R.; GAMA JÚNIOR, W.A.; AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L. **Manual para cultivo de cianobactérias**. Sem data.

HU, Q.; WESTERHOFF, P.; VERMAAS, W. Removal of Nitrate from Groundwater by Cyanobacteria: Quantitative Assessment of Factors Influencing Nitrate Uptake. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 133-139, 2000.

HUDEK, L.; RAI, L. C.; FREESTONE, D.; MICHALCZYK, A.; GIBSON, M.; SONG, Y. F.; ACKLAND, M. L. Bioinformatic and expression analyses of genes mediating zinc homeostasis in *Nostoc punctiforme*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 784-791. 2009.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-9, 2001.

KELLMANN, R.; NEILAN, B. Biochemical characterization of Paralytic Shellfish Toxin biosynthesis in vitro. **J. Phycol.**, v. 43, p. 497-508, 2007.

KNAUER, K. **Interactions of trace metals (Cu, Zn and Mn) with freshwater phytoplankton**. 1996. 118f. Dissertation (Doctor of Natural Science) – Swiss Federal Institute of Technology Zurich. 1996.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373, 1999

LEAL, T.V.S. **Efeitos da intensidade luminosa, fontes de nitrogênio e níveis de ferro no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* (UFC-P01) (Nostocales, Cyanobacteria)**. Tese. (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. Role of marine cyanobacteria in trace metal bioavailability in seawater. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 104 – 109, 2006.

LEFFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L.; Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**, v.52, p.199-214, 2007.

LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll *a*, protein and carbohydrates during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**, v. 26, p. 727 – 736. 2004;

LUKAC, M.; AEGERTER, R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 31, p. 293-305. 1993.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed. 12 ed, 2010.

MALDONADO, M.T.; HUGHES, M.P.; RUE, E.L.; WELLS, M.L. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 47, p. 515-526, 2002.

MARIN, K.S.S. **Physiogenomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) with Emphasis on Evolution, Nitrogen Control and Toxin Biosynthesis**. 222 f. Tese (Doktors der Naturwissenschaften). Faculty of Biology and Chemistry (Fachbereich 2), University Bremen. Germany, 2010.

MARTENS, J. H.; BARG, H.; WARREN, M. J.; JAHN, D. Micronial production of vitamin B₁₂. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 58, p. 275 – 285, 2001.

MCGREGOR, G. B.; FABBRO, L. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. **Lakes e Reservoirs: Research and Management**, v. 5, p.195-205, 2000.

MEREL, S.; CLÉMENT, M.; THOMAS, O. State of the art on cyanotoxins in water and their behavior towards chlorine. **Toxicon**, v. 55, p. 677-691, 2010.

MELO, R.S.; NEVES, M.H.C.B.; BAPTISTA, O.R. Cultivo axênico das cianobactérias marinhas *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 e *Chroococcus minutus* (Kützinger) Nägeli, 1849. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, p.234-240, 2011.

MOLICA, R.; ONNODERA, H.; GARCÍA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v. 6, p. 606-611, 2002.

MURPHY, T.P.; LEAN, D.R.S.; NALEWAJKO, C. Blue-Green Algae: Their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae. **Science**, v. 192, 1976.

NEDERLANDSE NORM. **Norm 6520**: water spectrophotometric determination of chlorophyll a content. Delft: NEN, 1981.

NEILAN, B.A.; SAKER, M.L.; FASTNER, J.; TOROKNÉS A.; BURNS, B.P. Phylogeography of invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 133-140, 2003.

NEGRI, A. P.; JONES, G. J. Effect of culture and bloom development and of sample storage on Paralytic Shellfish Poison in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*, **J. Phycol.**, v. 33, p. 26 – 35, 1997.

NICHOLSON, B.C.; BURCH, M.D. **Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines**.

National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia, and the Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, Australia, p.57, 2001.

NOGUEIRA, P.F.M.; LOMBARDI, A.T.; NOGUEIRA, M.M. *Cylindrospermopsis raciborskii* exudate–Cu complexes: impact on copper dynamics and bioavailability in an aquatic food chain. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 19, p. 1245-1251, 2012.

NUSH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment. **Arch. Hydrobiol. Bech. Stuttgart**, v.14, p. 14-36, 1980.

OKMEN, G.; BOZANTA, E.; UGUR, A.; CEYHAN, N. Zinc effect on chlorophyll a, total carbohydrate, total protein content and biomass of cyanobacterial species. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 2, p. 67 – 73, 2011.

OLIVEIRA, A. C. **Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de expolisacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). 183 f. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ORR, P. T.; JONES G. J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, p. 1604 – 1614, 1998.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review os its ecology. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 107, p. 563-593, 1997.

PANZECA, C.; BECK, A. J.; LEBLANC, K.; TAYLOR, G. T.; HUTCHINS, D. A.; SAÑUDO-WILHELMY, S. A. Potential cobalt limitation of vitamin B₁₂ synthesis in the North Atlantic Ocean. **Global Biogeochemical**, v. 22, p. 1-7, 2008.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1650-1680, 2010.

POMATI, F.; ROSSETTI, C.; MANAROLLA, G.; BURNS, B. P.; NEILAN, B. A. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. **Microbiology**, v.150, p. 455-461, 2004.

RANGSAYATORN, N.; POKETHITIYOOK, P.; UPATHAM, E. S.; LANZA, G. R. Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel. **Environ. Int.** v. 30, p. 57 – 63, 2002.

REYNOLDS, C.S.; JAWORSKI, G.H.M. Enumeration of natural *Microcystis* populations. *British Phycological Journal*, v.13, p. 269-277, 1978.

REYNOLDS, C.S. **The ecology of phytoplankton: Ecology, Biodiversity, and Conservation**. New York: Cambridge University Press. 55, 2006.

SAKER, M.L.; NOGUEIRA, I.C.G.; VASCONCELOS, V.M.; NEILAN, B.A.; EAGLESHAM, G.K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 243–250, 2003.

SAKER, M.; NEILAN, B.A. Varied Diazotrophies, Morphologies, and Toxicities of Genetically Similar Isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1839-1845, 2001.

SANTOS, P. V. **Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implicações no crescimento de culturas e na produção de microcistinas**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SAITO, M. A.; MOFFETT, J. W.; CHISHOLM, S. W.; WATERBURY, J. B. Cobalt limitation and uptake in *Prochlorococcus*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 47, p. 1629 – 1636, 2002.

SAITO, M. A.; ROCAP, G.; MOFFETT, J. W. Production of cobalt binding ligands in a *Synechococcus* feature at the Costa Rica upwelling dome. **Limnol. Oceanogr.**, v. 50, p. 279 – 290, 2005.

SEVILLA, E.; MARTIN-LUNA, B.; VELA, L.; BES, M.T.; FILLAT, M.F.; PELEATO, L.M. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC780. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 2476-2483, 2008.

SILVA, C.S.P. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**. Tese (Doutorado em Ciências: Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, eds, **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**, London, Spon Press, p. 41–111, 1999.

STEWART, J.E. Enhancement by gonyautoxin V of the iron(III) reducing or binding activity produced by the dinoflagellate, *Alexandrium excavatum*. **Harmful Algae**, v. 10, p. 706-712, 2011.

STERNER, R. W.; SMUTKA, T.M.; MCKAY, R. M.; XIAOMING, Q.; BROWN, E.T.; SHERRELL, R.M. Phosphorus and trace metal limitation of algae and bacteria in Lake Superior. **Limnol. Oceanogr.**, v. 49, n. 2; p. 495-507, 2004.

STEIN, J.R. 1973. **Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements**. Ed. Cambridge University Press, New York, USA. 448 p.

SUNDA, W.G.; PRICE, N.M.; MOREL, F.M.M. Trace metal ion buffers and their use in culture. In: ANDERSEN, R.A. (Ed). **Algal Culturing Techniques**. Academic Press. p. 117-132, 2005.

SUNDA, W. G ; HUNTSMAN, S. A. Interactive effects of external manganese, the toxic metals copper and zinc, and light in controlling cellular manganese and growth in a coastal diatom. **Limnol. Oceanogr.**, v. 43, p. 1467 – 1475, 1998.

TARONCHER-OLDENBURG, G. **Cell cycle dynamics and the physiology of saxitoxin biosynthesis in *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae).** 1998, 205 f. Dissertation (Doctor on Applied Ocean Science and Engineering) – Massachusetts Institute of Technology, Cambridge. 1998.

TÖRÖKNE, A, et al. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 280–284, 2004.

TWISS, M.R.; GOUVÊA, S.P.; BOURBONNIERE, R. A.; MCKAY, R.M.L., WILHELM, S.W. Field Investigations of Trace Metal Effects on Lake Erie Phytoplankton Productivity. **J. Great Lakes Res.**, v. 31, p. 168-179, 2005.

UTKILEN, H.; GJOLME, N. Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, p. 797-800, 1995.

VALER, R.M.; GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnológica Brasiliensis**, v.11, p. 149-156, 1998.

VARGAS, S. R. **Influência da concentração de nutrientes na interação entre duas espécies fitoplanctônicas isoladas do Reservatório de Itupararanga – S.P.** Dissertação. 147 f. (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, G.; RODRIGUEZ, M.H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. IBARRA, J.E. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, p. 115-121, 2004.

VIANA, M. **Avaliação de técnicas de tratamento na remoção de saxitoxinas em águas de consumo.** Dissertação. 212 f. (Mestrado em saneamento, meio ambiente e recursos hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

VIEIRA, A.A.H. Purification of phytoplankton cultures with Dakin's solution. **Rev. Microbiol.**, v.14, p. 202-203, 1983.

XING, W.; LIU, G. Iron biogeochemistry and its environmental impacts in freshwater lakes. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 20, 2011.

WANG, J.; SALATA, J.J.; BENNETT, P.B. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K⁺ Channels. **Journal of General Physiology**, 121: 583-598, 2003.

WETZEL, R. G.. **Limnologia**. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian. p. 919. 1993.

WELLS, M. L.; PRICE, N. M.; BRULAND, K. W. Iron chemistry in seawater and its relationship to phytoplankton: a workshop report. **Marine Chemistry**, v. 48, p. 157 – 182, 1995.

YILMAZ, M., et al. A comparative study of Florida strains of *ylindropermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. **Toxicon**, v. 51, p. 130-139, 2008.