

Maria Cecília Miotto

**CARACTERIZAÇÃO ECOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
DUAS CEPAS DE *Cylindrospermopsis raciborskii*, PRODUTORAS  
DE SAXITOXINA, ISOLADAS DA LAGOA DO PERI,  
FLORIANÓPOLIS, SC.**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Doutor em  
Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo  
Rubi Rörig

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Miotto, Maria Cecília

Caracterização ecofisiológica e molecular de duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtoras de saxitoxina, isoladas da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC. / Maria Cecília Miotto ; orientador, Leonardo Rubi Rörig - Florianópolis, SC, 2016.

89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Ecofisiologia. 3. *Cylindrospermopsis raciborskii*. 4. Saxitoxina. 5. Expressão gênica. I. Rörig, Leonardo Rubi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.



Aos meus pais, Milvo e Joana, pelo  
exemplo e apoio incondicional

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Leonardo Rörig, pela orientação, confiança e por me apresentar esta cianobactéria tão peculiar e interessante. Obrigada pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

À professora Roselane Laudaes-Silva, com quem tive a oportunidade de conviver e trabalhar durante seu último ano no Laboratório de Ficologia. Agradeço as conversas e os ensinamentos sobre a Lagoa do Peri e a *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Ao professor José Bonomi Barufi, por estar sempre à disposição para discutir experimentos, ideias e tirar dúvidas. Agradeço por todos os ensinamentos sobre o PAM e a sua contribuição na revisão do artigo.

Ao professor João Sarkis Yunes, pela prontificação na realização das análises de toxina, pelas sugestões e críticas ao trabalho, e pela agradável companhia na amostragem da ETA da Lagoa do Peri, agradeço pela oportunidade. Agradeço também à Luiza Day F. da Costa, por realizar e enviar os dados das análises de toxinas.

À professora Maria Risoleta Marques, por disponibilizar seu laboratório e equipamentos para as análises de qPCR. Ao Jacó Mattos, pela troca de ideias e por todo auxílio na estrutura e desenvolvimento dos experimentos.

À equipe do Laboratório do professor Brett A. Neilan, pelas análises de extração, amplificação e de sequenciamento do DNA das cepas, em especial à Sarah Ongley, pela atenção e disponibilidade.

Ao Rafael Garcia Lopes, por disponibilizar seu tempo para me ajudar nas análises de expressão gênica. Obrigada pela troca de ideias, pelos ensinamentos, por deixar seu trabalho para me acompanhar durante todo o decorrer e após as análises.

À Débora M. Brentano, que durante seu período de doutorado sanduíche, realizou parte do procedimento de extração e amplificação, no Laboratório do prof. Brett A. Neilan, na Universidade de New South Wales, Austrália.

Ao Eduardo O. Bastos, pela ajuda nas fotos das cepas e pela edição das imagens.

Ao Mateus A. Reck, pela ajuda e suporte nas extrações de DNA e nas reações de PCR, obrigada pela paciência ao responder minhas inúmeras dúvidas. Ao Gustavo Kablunde, pela ajuda nas análises filogenéticas.

Aos amigos e colegas de laboratório, Luana Souza e Pablo Gressler, pelos momentos de trabalho, descontração e amizade, que deixaram esses quatro anos de laboratório mais agradáveis.

A todos os estagiários, que passaram pelo laboratório nesses quatro anos, e que de alguma forma ajudaram nos experimentos, Carolina da Luz Viscarra, Giovana Jeremias, aos que continuam e já não são mais estagiários, Ana Gabriela I. C. da Silva, João Vitor Heberle Lins e Rodrigo Chagas.

À Camila Nader, meu braço direito e esquerdo nesses três últimos anos. Obrigada por todo o suporte e ajuda nos experimentos, pela amizade e pelas caronas semanais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade e experiência proporcionada nestes anos de doutorado.

Agradeço também à minha família, meus pais, Milvo e Joana, minhas irmãs, Letícia e Marília, aos tios, Gildo e Rosane, e meu companheiro, Diego, por todo apoio, incentivo e amor, que fizeram esta caminhada mais leve.

Muito obrigada!!

“Leva na sua  
memória, pelo resto da  
vida, as coisas boas que  
surgiram no meio das  
dificuldades. Elas serão  
uma prova de sua  
capacidade em vencer,  
e lhe darão confiança  
na presença Divina,  
que nos auxilia em  
qualquer situação, em  
qualquer tempo, diante  
de qualquer obstáculo”

(Chico Xavier)



## RESUMO

*Cylindrospermopsis raciborskii* é uma cianobactéria planctônica de água doce, conhecida por produzir cilindrospermopsina, toxinas paralisantes e alguns outros compostos ainda não identificados. Esta espécie, originalmente identificada como restrita a regiões tropicais, apresenta grande capacidade de invasão e adaptação em corpos d'água ao redor do mundo. Na lagoa do Peri, um lago polimítico subtropical, localizado na costa sul do Brasil, *C. raciborskii* representa cerca de 90% da densidade do fitoplâncton total, mostrando-se dominante durante a maior parte do ano. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar duas cepas, LP1, isolada em 2006, e LP2, isolada em 2013, ambas na Lagoa do Peri, quanto sua morfologia, ecofisiologia e seu perfil de toxinas, bem como, sua filogenia, além de relacionar o conteúdo de toxinas com os níveis relativos de transcritos dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*, presentes no agrupamento responsável pela biossíntese da saxitoxina. As duas, LP1 e LP2, cepas apresentaram 100% de identidade nas sequências parciais correspondentes aos genes 16S rRNA, ITS e *rpoC1*, entretanto, possuem características morfológicas, ecofisiológicas e toxicológicas distintas. As cepas apresentam morfologias distintas e diferenças significativas quanto ao comprimento e volume dos tricomas. A cepa LP2 mostrou uma tendência a maiores taxas de crescimento que a cepa LP1, nas três temperaturas (17°C, 22°C e 28°C) e nas três razões N:P (4,5:1, 10:1 e 40:1) testadas. Ambas as cepas apresentam baixo requerimento de luz, mas foram capazes de tolerar intensidades luminosas em torno de 200  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A cepa LP2 apresentou maior concentração de clorofila-a e também maior dissipação de energia não fotoquímica (NPQ) que a cepa LP1, e quando exposta a altas intensidades luminosas, apresentou tricomas com maior volume. Com relação à produção de toxinas, a cepa LP2 apresentou um potencial tóxico maior que a cepa LP1, uma vez que apresentou uma maior variedade de análogos, sendo, portanto, considerada mais tóxica, de acordo com o nível de toxicidade de cada variante. A cepa LP1 não amplificou nenhum dos genes selecionados da via de biossíntese da saxitoxina, logo, apresentou ausência de expressão dos mesmos. De um modo geral, a expressão relativa dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*, foi menor na cepa LP2, quando comparada com os níveis relativos de transcritos da cepa *C. raciborskii* T3, usada como controle. Entretanto, só foi observada diferença estatística nos níveis de transcritos do gene *sxtA*. Também não foi observada diferença estatística entre os níveis relativos de transcritos dos quatro genes, dentro da mesma cepa. Esses resultados reforçam a

hipótese que existam diferentes ecótipos desta espécie, que provavelmente se originaram em resposta às variações ambientais existentes na Lagoa do Peri. A sua dominância durante grande parte do ano pode ser explicada pela alternância desses ecótipos na contribuição de biomassa total de acordo com suas vantagens fisiológicas, contribuindo para o sucesso ecológico da espécie.

**Palavras-chave:** cianobactéria; cianotoxinas; ecofisiologia; ecótipos; expressão gênica



## ABSTRACT

*Cylindrospermopsis raciborskii* is a freshwater planktonic cyanobacteria recognized to produce the alkaloid cylindrospermopsin, paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, and some other unknown compounds. This species, previously restricted to the tropics, has great ability of invasion and adaptation, and is currently found in water bodies from a wide range of latitudes. In Peri Lagoon, a subtropical polymictic lake located at the southern coast of Brazil, the species represents about 90% of the total phytoplankton, being dominant for most part of the year. In the present work we attempted to characterize two strains of *C. raciborskii*, LP1, isolated in 2006, and LP2, isolated in 2013, from Peri Lagoon, for their morphology, ecophysiology, phylogeny and toxin profiles. In addition, the relationship between the toxin content and the relative transcripts level of *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* and *sxtS* genes were evaluated. Both LP1 and LP2 strains showed 100% identity in the partial sequences corresponding to the 16S rRNA, ITS and *rpoC1* genes, however, they have different morphological, ecophysiological and toxicological characteristics. The strains showed different morphologies and significant differences in the length and volume of trichomes. LP2 strain showed a tendency to higher growth rates than the LP1 strain at the three temperatures (17 °C, 22 °C and 28 °C) and N: P ratios (4.5:1, 10:1 and 40:1) tested. Both strains showed low light requirements, but were able to tolerate irradiances around 200  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . LP2 strain showed higher chlorophyll-a concentration and also a higher non-photochemical quenching (NPQ) than LP1 strain, and when exposed to high light intensities, showed higher trichomes volume. Regarding toxin content, the LP2 strain LP2 strains exhibited a higher toxic potential than the LP1 strain, and a wider range of analogs, being therefore more toxic. LP1 strain did not amplify any of the selected genes of the biosynthesis pathway of saxitoxin, as well as, showed no expression. In general, the relative transcripts' level of the *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* and *sxtS* genes was lower in the LP2 strain when compared to the relative transcripts level of the *C. raciborskii* T3 strain used as control. However, only significant difference was observed in the *sxtA* gene transcript levels. In addition, no significant difference was observed between the relative levels of transcripts of the four genes within the same strain. These results support the hypothesis of ecotypes selection for this species, which probably were originated in response to environmental fluctuations in Peri Lagoon. Dominance during almost the whole year can be explained by the alternation of these ecotypes in

the total biomass contribution according to their physiological advantages, contributing to the ecological success of this species.

**Keywords:** cyanobacteria; cyanotoxins; ecophysiology; ecotypes; gene expression



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. . Estrutura química geral das toxinas PSPs. R, representa as posições dos grupos químicos variáveis (Llewellyn, 2006). .....	6
Figura 2. Organização estrutural do agrupamento gênico <i>sxt</i> da cepa <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3. Escala indica o tamanho dos genes em pares de base. Adaptado de Kelmann et al. 2008. ....	9
Figura 3. Via da biossíntese da saxitoxina. Modificado de Kelmann et al. 2008. ....	11
Figura 4. Mapa do mundo representando os países onde foi reportada a presença de <i>C. raciborskii</i> . Modificado de Antunes et al. (2015). ....	14
Figura 5. Mapa de localização da Lagoa do Peri, Florianópolis, Brasil. Modificado de Hennemann & Petrucio (2011). ....	18

### Capítulo I

Figura 1. . Fotomicrografias mostrando as diferenças na morfologia das duas cepas de <i>C. raciborskii</i> (A, B e C) LP1, (D e E) LP2. Células vegetativas, tricomas com aerótopos (a), acinetos (ac) e heterocitos terminais (h). A, B, C, E as barras representam 5 $\mu\text{m}$ e D, 100 $\mu\text{m}$ . ....	41
Figura 2. Curvas de fotossíntese <i>vr</i> irradiância ( <i>P-I</i> ) obtidas após o ajuste dos dados experimentais com o software Kaleida Graph, utilizando a equação de Platt et al. (1980). (A) cepa LP1 e (B) cepa LP2. ....	43
Figura 3. Experimento de fotoaclimação com as duas cepas de <i>C. raciborskii</i> , LP1 e LP2, cultivadas em duas irradiâncias: alta luz, HL (200 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e baixa luz, LL (40 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A. $F_v/F_m$ , rendimento quântico máximo da fotossíntese. B e C. Dados conjuntos de $F_v/F_m$ de acordo com a ANOVA (tabela 4). D. Concentração de clorofila-a ( $\mu\text{g}.\mu\text{m}^{-3}$ ). E. dissipação de energia não-fotoquímica (NPQ). F. Volumes celulares. Barras verticais indicam o desvio padrão de três réplicas. ....	46
Figura 4. Taxas de crescimento ( $\mu.\text{d}^{-1}$ ) determinadas pelo aumento da densidade óptica (OD) em 750 nm e concentração de clorofila-a das duas cepas de <i>C. raciborskii</i> (LP1 e LP2) nas três temperaturas, 17 °C, 22 °C e 28 °C e três razões N:P, 4,5:1, 10:1, 40:1 testadas. A. Resultados da interação das taxas de crescimento, considerando os fatores significativos temperatura e disponibilidade de nutrientes; B. Resultados da interação das taxas de crescimento considerando os fatores significativos temperatura e cepa; C. Resultados da interação da concentração de clorofila-a considerando os fatores significativos	

temperatura e disponibilidade de nutrientes; D. Resultados da interação da concentração de clorofila-a considerando os fatores significativos cepa e disponibilidade de nutrientes. Para detalhes dos fatores significativos, veja a Tabela 5. Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey..... 48

## **Capítulo II**

Figura 1. Concentração, em $\mu\text{g.L}^{-1}$ , das variantes da saxitoxina (médias $\pm$ desvio padrão, $n = 5$ ) detectadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das três cepas de <i>C. raciborskii</i> LP1(A), LP2(B) e T3(C). Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas, segundo teste de Bonferroni. ....	71
Figura 2. Gel eletroforese dos produtos da PCR dos genes <i>sxtA</i> , <i>sxtB</i> , <i>sxtI</i> e <i>sxtS</i> nas três cepas LP1, LP2 e T3. (L= marcador de peso molecular) .....	72
Figura 3. Expressão relativa dos genes <i>sxtA</i> (A), <i>sxtB</i> (B), <i>sxtI</i> (C), e <i>sxtS</i> (D), usando os <i>secA</i> , <i>rnpA</i> e <i>16S rRNA</i> como genes de referência, nas cepas de <i>C. raciborskii</i> LP1, LP2 e T3. Barras indicam a média $\pm$ desvio padrão. $n=4$ . Letras diferentes correspondem às diferenças estatísticas, segundo teste de Tuckey. ....	73
Figura 4. Árvore filogenética obtida através do método da Máxima Verossimilhança baseada nas sequências do gene 16S rRNA originários de diferentes regiões geográficas. Números nos nós indicam a porcentagem de confiança com base nos valores de bootstrap ( $n=1000$ ). ....	75
Figura 5. Árvore filogenética obtida através do método da Máxima Verossimilhança baseada nas sequências da região ITS-1, originários de diferentes regiões geográficas. Números nos nós indicam a porcentagem de confiança com base nos valores de bootstrap ( $n=1000$ ). ....	76
Figura 6. Árvore filogenética obtida através do método da Máxima Verossimilhança baseada nas sequências do gene <i>rpoC1</i> , originários de diferentes regiões geográficas. Números nos nós indicam a porcentagem de confiança com base nos valores de bootstrap ( $n=1000$ ). ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas químicas das variantes da saxitoxina, peso molecular e toxicidade relativa..... 7

### Capítulo I

Tabela 1. Dados da morfologia das duas cepas de <i>C. raciborskii</i> , LP1 e LP2, isoladas da Lagoa do Peri e mantidas em laboratório nas condições gerais de cultivo (média $\pm$ desvio padrão, n=30). .....	40
Tabela 2. Variantes da saxitoxina observadas nas cepas de <i>C. raciborskii</i> LP1 e LP2 ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ ) mantidas nas condições gerais de cultivo. GTX: goniautoxinas, STX: saxitoxina, dcSTX: decarbamoilsaxitoxina. ....	42
Tabela 3. Parâmetros das curvas <i>P-I</i> obtidos após o ajuste dos dados à equação de Platt et al. (1980). $\alpha$ : inclinação inicial da curva limitada por luz ( $\text{mgO}_2.\text{mgChla}^{-1}.\text{h}^{-1}.\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), $\beta$ : parâmetro fotossintético da regulação negativa da fotossíntese ( $\text{mgO}_2.\text{mgChla}^{-1}.\text{h}^{-1}.\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), $P_{\text{max}}$ : produtividade máxima ( $\text{mgO}_2.\text{mgChla}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), $E_k$ : irradiância de saturação ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), $I_{\text{opt}}$ : irradiância ótima ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e $I_c$ : ponto de compensação luminosa ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, os valores em que foram encontradas diferenças significativas com o teste t ( $p < 0,05$ ), comparando as duas cepas.....	44
Tabela 4. Resumo dos resultados da ANOVA das respostas fisiológicas das duas cepas de <i>C. raciborskii</i> cultivadas em duas intensidades luminosas. Os fatores luz e cepa foram fontes de variação. Parâmetros avaliados: rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ), dissipação não-fotoquímica (NPQ), conteúdo de chlorofila-a (Chl-a), e volume celular. Respostas significativas estão marcadas em negrito. N=3. ....	44
Tabela 5. Resumo dos resultados da ANOVA das respostas fisiológicas das duas cepas de <i>C. raciborskii</i> cultivadas em três temperaturas (17 °C, 22 °C and 28 °C) e três diferentes condições nutricionais (razões N:P, 4,5:1, 10:1, 40:1). Cepas, Temperaturas e razões N:P isolados e a interação dos fatores foram as fontes de variação. Parâmetros avaliados: taxas de crescimento e concentração de chlorofila-a (Chl-a). Respostas significativas estão marcadas em negrito. N=3. ....	47

## **Capítulo II**

Tabela 1. Especificações e condições de análise segundo o método Rourke et al. (2008) para Saxtoxinas. ....	65
Tabela 2. Sequências dos iniciadores desenhados para este trabalho, e os iniciadores utilizados como controle. ....	67
Tabela 3. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises filogenéticas. ....	69
Tabela 4. Resumo dos resultados da ANOVA dos níveis relativos de transcritos das três cepas de <i>C. raciborskii</i> , LP1, LP2 e T3. Os fatores cepa e gene foram fontes de variação. Respostas significativas estão marcadas em negrito. N=4 .....	73

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Chla-a – clorofila-a

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CYN – cylindropermopsina

dcGTX – decarbamoilgoniautoxina

dcNeoSTX – decarbamoilneosaxitoxina

dcSTX – decarbomailsaxitoxina

doGTX – deoxi-carbamiolgoniautoxina

doSTX- deoxi-carbamiolsaxitoxina

Fm – fluorescência máxima no escuro

Fm' – fluorescência máxima na luz

Fv/Fm – rendimento quântico máximo da conversão da energia fotossintética no PSII

GTX – goniautoxinas

HPLC - High-performance liquid chromatography

LPS – lipopolissacarídeos

NCBI – National Center of Biotechnology Information

NeoSTX – neosaxitoxina

NPQ – Dissipação de energia não-fotoquímica

OD – oxigênio dissolvido

PSII – Fotossistema II

PSP – Paralytic Shellfish Poisoning

PST - Paralytic Shellfish Toxin

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

RFU – unidade bruta de fluorescência

STX – saxitoxina



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Cianobactérias - Aspectos gerais e toxicológicos.....	3
2.2. Toxinas produzidas por cianobactérias .....	4
2.2.1. Saxitoxina e seus derivados.....	6
2.2.2. Biossíntese de Saxitoxina em cianobactérias .....	8
2.3. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> .....	11
2.3.1. Aspectos gerais e ecofisiologia .....	11
2.3.2 Ocorrência e Distribuição.....	14
2.3.3. Expansão e Filogenia.....	16
2.4. Lagoa do Peri .....	18
3. OBJETIVOS .....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
REFERÊNCIAS .....	22
Capítulo I - Caracterização ecofisiológica e perfil de toxinas de duas cepas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> isoladas da Lagoa do Peri, SC, Brasil .....	32
1. Introdução .....	32
2. Material e Métodos.....	34
2.1. Cepas e condições gerais de cultivo .....	34
2.2. Caracterização morfológica e identificação molecular .....	34
2.3. Análise de toxinas .....	35
2.4. Produtividade primária.....	36
2.5. Experimento 1: Capacidade de aclimação de <i>C. raciborskii</i> a níveis baixos e altos de luz.....	37

2.6. Experimento 2: Influência de diferentes temperaturas e razões N:P na taxa de crescimento de <i>C. raciborskii</i> .....	38
2.7. Análises estatísticas .....	39
3. Resultados .....	40
3.1. Caracterização morfológica e identificação molecular .....	40
3.2. Análises de toxinas .....	42
3.3. Produtividade primária .....	42
3.4. Experimento 1: Capacidade de aclimatação de <i>C. raciborskii</i> a níveis baixos e altos de luz .....	44
3.5. Experimento 2: Influência de diferentes temperaturas e razões N:P na taxa de crescimento de <i>C. raciborskii</i> .....	47
4. Discussão .....	49
Referências .....	55
Capítulo II - Relação filogenética, expressão gênica e concentração de toxinas em duas cepas produtoras de saxitoxina isoladas da Lagoa do Peri, Florianópolis, Brasil .....	62
1. Introdução .....	62
2. Material e Métodos .....	64
2.1. Cepas e condições de cultivo .....	64
2.2. Concentração celular e biovolume .....	64
2.3. Extração e quantificação de toxinas .....	64
2.4. Desenho e validação dos iniciadores .....	66
2.5. Extração de RNA e síntese de cDNA .....	67
2.6. qPCR .....	68
2.7. Análises Filogenéticas .....	68
2.8. Análises estatísticas .....	70
3. Resultados .....	70
3.1. Concentração celular e Análise de toxinas .....	70
3.2. Presença dos genes <i>sxt</i> .....	71
3.3. qPCR .....	72

3.1. Análises Filogenéticas.....	74
4. Discussão.....	78
Referências.....	83
Conclusão Geral.....	88

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido registrado um grande aumento na ocorrência e dominância de cianobactérias em ambientes de água doce, principalmente, em mananciais e reservatórios de água destinados ao consumo humano.

Fatores como limitação de luz, elevada temperatura da água e baixa relação nitrogênio: fósforo (N:P), são descritos como os principais fatores responsáveis pela variação na densidade, biomassa e na grande diversidade de espécies de cianobactérias (Dokulil & Teubner, 2000). Entretanto, determinadas espécies podem ser favorecidas por variações ambientais, levando a sua dominância na comunidade fitoplanctônica, em função de adaptações fisiológicas e morfológicas, conferindo assim, uma vantagem competitiva sobre as demais espécies. Entre estas, destacam-se eficiência na exploração de recursos como luz e nutrientes, e a produção de substâncias alelopáticas (Pearl et al., 2001; Leflaive & Ten-Hage, 2007).

O grande problema da dominância de determinadas espécies de cianobactérias em reservatórios e mananciais de água, é a capacidade de esses microrganismos produzirem e liberarem para o meio toxinas (cianotoxinas) que podem afetar a saúde humana, pela ingestão de água, por contato em atividades de recreação no ambiente, pelo consumo de pescado contaminado (Chorus & Bartram, 1999; Falconer, 1999), ou ainda pelo consumo de produtos agrícolas irrigados com águas que contêm as espécies tóxicas (Codd et al., 1999).

Dentre as cianobactérias potencialmente nocivas, destaca-se a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, que vem chamando a atenção de pesquisadores, devido ao grande número de relatos de ocorrência em diversos ecossistemas aquáticos de água doce (Padisák, 1997), e principalmente, devido a sua capacidade de dominância sobre as demais espécies da comunidade fitoplanctônica.

Sua ocorrência na Lagoa do Peri, importante manancial de água potável da Ilha de Santa Catarina (SC – Brasil), vem sendo registrada desde meados de 1990, assim como um grande aumento da sua densidade e períodos de dominância (Laudares-Silva, 1990; Kormáková et al. 1990; Grellmann, 2006; Hennemann & Petrucio, 2011; Silveira, 2013; Tonetta et al., 2013).

Tem sido dedicado um grande esforço em se entender os fatores ambientais que estão relacionados com a sua dominância na Lagoa do

Peri, entretanto, há uma carência de estudos relacionados com a ecofisiologia da espécie, bem como sua relação filogenética, sendo de extrema importância na compreensão da dinâmica desta espécie na Lagoa do Peri. Este trabalho buscou contribuir com informações sobre a produtividade e eficiência na captura da luz, o efeito da temperatura e condições de nutrientes nas taxas de crescimento de duas cepas de *C. raciborskii*, denominadas LP1 e LP2, ambas isoladas da Lagoa do Peri, bem como contribuir com dados de perfil de toxinas, análise da presença e expressão dos genes relacionados com a biossíntese de saxitoxinas, e sua relação filogenética.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Cianobactérias - Aspectos gerais e toxicológicos**

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis ou cianofíceas, são um grupo diverso de microrganismos fotossintéticos procarióticos encontrados nos mais diversos ambientes terrestres, marinhos e de água doce. Sua origem é datada de três a quatro bilhões de anos (Schopf & Packer, 1987), sendo considerados os primeiros organismos fotossintetizantes oxigênicos, criando uma atmosfera química adequada para outras formas de vida (Graham & Wilcox, 2000). Com cerca de 2000 espécies, as cianobactérias estão distribuídas em todo o mundo, apresentando uma notável diversidade ecológica.

O sucesso ecológico das cianobactérias decorre de sua longa história evolutiva e de suas características fisiológicas e estruturais. Entre estas, destacam-se a eficiente cinética de captação de nutrientes e a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, através da atividade da enzima nitrogenase que opera sob diferentes modelos evolutivos dependendo do grupo taxonômico. É um dos poucos grupos capazes de realizar fotossíntese aeróbica e respiração simultaneamente no mesmo compartimento, sendo esta flexibilidade metabólica, uma das características responsáveis pela sua resistência evolutiva e a sua capacidade de crescer sob uma ampla gama de condições ambientais (Vermaas, 2001).

O sucesso das cianobactérias em diferentes ambientes também tem sido relacionado a adaptações morfológicas, como os aerótopos, que possibilitam a migração na coluna d'água, ao crescimento em temperaturas entre 15°C e 30°C, e em valores de pH entre 7 e 9 (Carmichael, 1994; Choruse & Bartram, 1999; Graham & Wilcox, 2000), podendo se tornar dominantes em altas concentrações de nitrogênio e fósforo, formando florações.

Apresentam grande importância ecológica como produtores primários na cadeia trófica, na ciclagem de nutrientes, bem como pela fertilidade de corpos aquáticos e do solo (Rai, 1990). Contribuem expressivamente na assimilação fotossintética do carbono, e desempenham papel importante na síntese de nitrogênio orgânico (Capone, 1999).

As cianobactérias também apresentam grande importância econômica, devido à produção de alimentos com alto valor nutricional, ao seu potencial na conversão de energia solar, além da habilidade em sintetizar metabólitos secundários complexos, colocando-as como um

dos grupos de organismos mais promissores na produção de compostos com atividade bioativa (Raja et al., 2008; Abed et al., 2009). Podem igualmente serem utilizadas como herbicidas, antifúngicos e fertilizantes agrícolas.

Por outro lado, algumas cianobactérias são conhecidas por produzirem toxinas (cianotoxinas), que podem apresentar um sério risco para a saúde pública, quando presentes em corpos d'água utilizados para recreação e abastecimento. Casos de intoxicação de seres humanos e de animais já foram relatados, resultantes de florações de cianobactérias, em países como Austrália, China e África do Sul (Falconer, 1994; Chorus & Bartam, 1999). No Brasil, o primeiro caso confirmado de mortes causadas por cianotoxinas ocorreu em 1996, na cidade de Caruaru – PE, aonde mais de 70 pacientes renais vieram a falecer em decorrência de uma grave hepatotoxicose, ocasionada por uma contaminação por microcistinas na água utilizada nas sessões de hemodiálise (Carmichael et al., 2001; Azevedo et al., 2002).

De acordo com Sant'Anna & Azevedo (2000) já foi registrada a ocorrência de pelo menos 20 espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, incluídas em 14 gêneros, em diferentes ambientes aquáticos brasileiros. De acordo com esses autores, a espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta a distribuição mais ampla no Brasil e *Anabaena* é o gênero com o maior número de espécies potencialmente tóxicas. Entretanto, na última década tem sido observado um grande aumento na ocorrência da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, em diferentes regiões brasileiras (Bouvy et al., 1999; Branco & Senna, 1994; Komárkova et al., 1999; Huszar et al., 2000).

## **2.2. Toxinas produzidas por cianobactérias**

As cianobactérias são conhecidas por produzir uma variedade de metabólitos secundários, muitos ainda com função desconhecida, e que, aparentemente, não são essenciais à vida e ao crescimento dos organismos que os produzem (Bentley, 1999). As cianotoxinas são um diverso grupo de toxinas naturais, tanto do ponto de vista químico como toxicológico (Chorus & Bartam, 1999).

De acordo com a caracterização química das cianotoxinas é possível dividi-las em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos (incluindo as microcistinas e nodularinas), os alcalóides (incluindo as cilindrospermopsinas, as neurotoxinas e as citotoxinas) e os lipopolissacarídeos, que são potencialmente irritantes (Chorus & Bartram, 1999; Carmichael, 2001). De acordo com seu mecanismo de

ação, também podem ser divididas em hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (Sivonen & Jones, 1999).

#### a) **Hepatotoxinas**

As hepatotoxinas, que abrangem os peptídeos cíclicos microcistinas e nodularinas, são as cianotoxinas que apresentam o maior risco de intoxicação, para os consumidores de água potável (Falconer & Humpage, 2005; Sant'Anna et al., 2006). São toxinas que causam a necrose do fígado e morte por hemorragia. As hepatotoxinas chegam aos hepatócitos por meio de receptores dos ácidos biliares (Runnegar et al. 1981; Falconer, 1991) e promovem uma desorganização do citoesqueleto dos hepatócitos. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. Através de estudos dos mecanismos de ação dessas hepatotoxinas, foi observado que várias microcistinas e nodularinas são potentes inibidores das fosfatases do tipo 1 e 2 em células eucarióticas (Yoshizawa et al., 1990; Matsuhima et al., 1990).

#### b) **Neurotoxinas**

As neurotoxinas são alcalóides que, em geral, atuam bloqueando a transmissão do sinal nervoso entre os neurônios. São divididos em três grupos, que diferem entre si pela ação farmacológica e esqueleto estrutural: Saxitoxinas, Anatoxina-a e Anatoxina-a(s). Recentemente, devido aos seus efeitos neurodegenerativos, o aminoácido  $\beta$ -metilaminoalanina (BMAA) também foi incluído entre as neurotoxinas (Carmichael, 1992; Falconer, 1996; Sant'Anna et al., 2006).

#### c) **Citotoxinas**

As citotoxinas agem na inibição da síntese protéica causando alterações citológicas essencialmente no fígado, mas também no baço, rins, pulmões e coração (Hawkins et al., 1997; Runnegar et al., 1995). Falconer & Humpage (2001) encontraram evidências experimentais *in vivo* que sugerem um efeito carcinogênico crônico da cilindrospermopsina.

#### d) **Dermatotoxinas**

Dentre as dermatotoxinas, destacam-se os lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são componentes da parede celular de bactérias gramnegativas e de todas as cianobactérias e formam complexos com proteínas e fosfolipídios (Chorus & Bartram, 1999). Podem causar irritação nos olhos, conjuntivite e alergias na pele de humanos e animais e, ainda, podem ser responsáveis por gastroenterites, doenças respiratórias, dores de cabeça e febre (Chorus & Bartram, 1999; Codd, 2000; Hoehn & Long, 2004). Os LPS são pirogênicos e tóxicos

provocando trombocitopenia, neutropenia, níveis anormais de glicose e mudanças metabólicas como acidose e alcalose (Stewart et al., 2006)

### 2.2.1. Saxitoxina e seus derivados

A saxitoxina (STX) e seus derivados são alcalóides neurotóxicos também conhecidos como PSTs (*Paralytic Shellfish Toxins*) devido ao fato de seus efeitos terem sido primeiramente descritos em humanos envenenados após a ingestão de moluscos contaminados (Llewellyn, 2006). Agem no sistema nervoso central, bloqueando os canais de sódio presentes nas membranas das células neuronais, interrompendo a condução nervosa e conseqüentemente causando paralisia muscular (Kao & Levinson, 1986), e também interferem nos canais de cálcio e potássio nas células do músculo do coração (Wang et al., 2003)

A STX é uma das mais potentes neurotoxinas naturais conhecidas, e desde sua descoberta inicial, mais de 57 análogos já foram identificados (Wiese et al., 2010). As PSTs possuem uma estrutura tricíclica central (Figura1), e de acordo com a variação dos grupamentos químicos laterais, resultam em compostos com diferentes toxicidades (Van Dolah, 2000). Podem ser classificadas em não-sulfatadas como, por exemplo, a saxitoxina (STX) e a neosaxitoxina (NeoSTX), com um único grupamento sulfato (GTX1-6) ou com dois grupamentos sulfatos (C 1-4). Além dessas, estruturas com grupamentos decarbamoil (dcSTX, dcneoSTX, dcGTXs1-4) e deoxi-carbamiol (doSTX, doGTXs1-3) tem sido recentemente isoladas (Wiese et al., 2010).

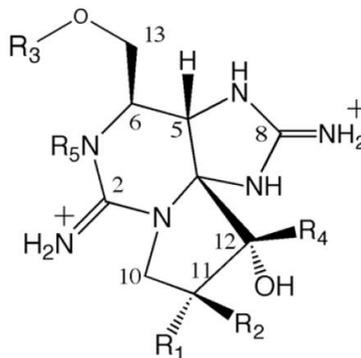


Figura 1. . Estrutura química geral das toxinas PSPs. R, representa as posições dos grupos químicos variáveis (Llewellyn, 2006).

**Tabela 1. Estruturas químicas das variantes da saxitoxina, peso molecular e toxicidade relativa.**

Toxina	Grupamentos químicos variáveis				Peso Molecular	Toxicidade relativa
	R1	R2	R3	R4		
SXT	H	H	H		301	1,00
Neo-SXT	OH	H	H		317	0,92
GTX-1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> N-CO	412	0,99
GTX-2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Carbamoil	396	0,36
GTX-3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		396	0,64
GTX-4	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		412	0,73
GTX-5	H	H	H		380	0,06
GTX-6	OH	H	H	O <sub>3</sub> S-NH-COO	396	-
C3	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-sulfo-	492	0,01
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	carbamoil	476	<0,01
C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		476	0,10
C4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		492	0,06
dc-SXT	H	H	H		258	0,51
dc-Neo	OH	H	H		274	-
dc-GTX-1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		369	-
dc-GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	353	0,65
dc-GTX-3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	Decarbamoil	353	0,75
dc-GTX-4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		369	-

Diferente das outras cianotoxinas, STXs são o único grupo de toxinas produzidas também por dinoflagelados marinhos, principalmente dos gêneros *Alexandrium*, mais especificamente as espécies *A. andersoni*, *A. fundyense*, *A. tamiyavanichi*, *A. catenella*, *A. excavatum*, *A. ostenfeldi* e *A. tamarense*, *Gymnodinium catenatum* e *Pyrodinium bahamense* (Cembella, 1998; Dittmann et al., 2013). Em cianobactérias, as toxinas PSPs são produzidas pelas espécies *Anabaena circinalis*, *Anabaena lemmermanii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Lyngbya wollei*, *Planktothrix* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Raphidiopsis brookii* e *Scytonema* sp. (Yunes et al., 2009; Neilan et al., 2013).

No Brasil, linhagens das espécies *C. raciborskii*, *A. issatschenkoi*, *R. brooki* e *Scytonema* sp. já foram descritas como produtoras de diferentes variantes da STX (Sant'Anna et al., 2008).

O perfil de toxinas e a concentração variam, tanto nos dinoflagelados como nas cianobactérias, entre diferentes espécies do mesmo gênero, assim como entre diferentes cepas da mesma espécie, geograficamente distintas (Wang et al., 2016). Por exemplo, a produção

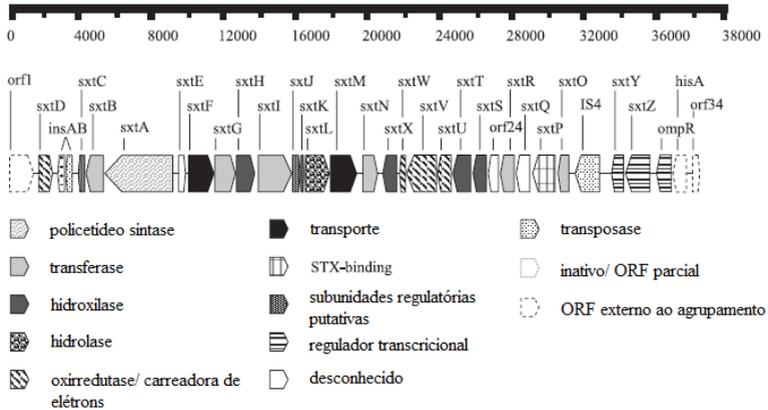
de toxinas PSPs é geograficamente limitada em *A. circinalis* e *C. raciborskii*. Análises filogenéticas mostraram que somente isolados australianos de *A. circinalis* e os isolados brasileiros de *C. raciborskii* são produtores de saxitoxina e seus análogos. Segundo Soto-Liebe et al. (2010) a interpretação dos perfis das toxinas PSPs em cianobactérias baseia-se no pressuposto que a composição da toxina é determinada geneticamente, e por isso é refratária a grandes mudanças ao longo do tempo em cultura ou em resposta a condições de crescimento. Sendo assim, enquanto a concentração de toxina celular pode variar significativamente ao longo do ciclo de crescimento e pode ser afetada por condições externas, o perfil de toxinas permanece estável.

### **2.2.2. Biossíntese de Saxitoxina em cianobactérias**

A via responsável pela biossíntese da saxitoxina foi proposta recentemente, e o grupamento gênico *sxt* foi primeiramente elucidado na cianobactéria *C. raciborskii* T3 (Figura 2), o qual é codificado por mais de 35kb e a análise comparativa da sequência atribuiu 30 funções catalíticas para 26 proteínas (Kellmann et al., 2008). Muito esforço foi dedicado, e desde então, o grupamento gênico *sxt* foi caracterizado em cinco espécies de cianobactérias (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2009; Stucken et al., 2010; Mihali et al., 2011).

Todas as espécies apresentam um conjunto de genes responsáveis pela biossíntese da STX, no entanto, o perfil dos genes do agrupamento *sxt* em cada espécie pode variar, resultando na produção de diferentes análogos da STX (Wiese et al., 2010).

Baseados nas funções que desempenham na biossíntese da STX os 26 genes identificados foram classificados em três grupos. O primeiro grupo inclui oito genes (*sxtA*, *sxtG*, *sxtB*, *sxtD*, *sxtS*, *sxtU*, *sxtH/T* e *sxtI*) os quais estão envolvidos diretamente na biossíntese da SXT, e três genes adicionais (*sxtL*, *sxtN* e *sxtX*), os quais codificam proteínas relacionadas com a modificação das moléculas da SXT em seus análogos. O segundo grupo de genes é responsável pelo transporte das toxinas (*sxtF* e *sxtM*), e o terceiro grupo, pela a regulação transcricional (*sxtY* e *sxtZ*) (Person et al., 2010; Wang et al., 2016).



**Figura 2. Organização estrutural do agrupamento gênico *sxt* da cepa *Cyindrospermopsis raciborskii* T3. Escala indica o tamanho dos genes em pares de base. Adaptado de Kelmann et al. 2008.**

A biossíntese da STX e seus análogos inicia com o gene *sxtA*, que codifica quatro domínios catalíticos com atividades previstas de metiltransferases SAM dependentes (SxtA1), GCN-5 relacionadas com N-acetiltransferases – GNAT (SxtA2), ACP – proteína carreadora de acila (SxtA3) e aminotransferases classe II (SxtA4) (Murray et al., 2011; Mihali et al., 2009; Wang et al., 2016). Segundo revisão proposta por Wang et al. (2016), o gene *sxtA* inicia a biossíntese da STX. No primeiro passo da via, o domínio *sxtA2* catalisa a transferência do acetato da acetil-CoA para a ACP (*sxtA3*), seguida pela metilação da acetil-ACP convertendo-a em propinil-ACP através do domínio *sxtA1*. No segundo passo da via, o domínio *sxtA4* realiza a condensação de Claisen entre o propinil-ACP e a arginina, formando o produto A. Em seguida, o *sxtG*, o segundo gene envolvido na biossíntese da STX, codifica uma aminotransferase que transfere um grupo amino da arginina ao produto do gene *sxtA* (Passo 3). O novo derivado é então condensado via a enzima citidina deaminase, codificada pelo gene *sxtB*, passo 4, formando o primeiro heterociclo. No passo 5 da via, a enzima esterol dessaturase, codificada pelo gene *sxtD*, presume-se que seja responsável por introduzir uma dupla ligação entre C-1 e C-5, resultando na mudança do 1,2-H entre C-5 e C-6. As subseqüentes etapas, passos 6 e 7, incluem uma  $\alpha$ -cetoglutarato dioxigenase-dependente, codificada pelo gene *sxtS*, catalizando a formação de dois heterociclos, uma álcool desidrogenase, codificada pelo gene *sxtU*,

catalizando o aldeído terminal em um álcool. No passo 9, uma fenilpropionato dioxigenase, codificada pelos genes *sxtH* e *sxtT*, realiza a hidroxilação consecutiva de C-12, para formar a dcSTX (decarbamoilsaxitoxina). Finalmente, no passo 10, a enzima O-carbamoiltransferase, codificada pelo gene *sxtI*, catalisa a transferência de um grupo carbamoil da carbamoilfosfato para a hidroxila livre do C-13, com a catalise de enzimas codificadas pelos genes *sxtJ* e *sxtK*, formando a saxitoxina (STX), sendo portanto, uma das enzimas chave na biossíntese da saxitoxina (Figura 3).

Diferenças entre o agrupamento gênico da *C. raciborskii* T3 com o de outras cianobactérias, forneceram informações relevantes sobre a função de alguns genes, bem como refletem diferenças no perfil de produção de toxinas (Soto-Liebe et al., 2010; Wang et al., 2016). Dentre esses genes, o *sxtN*, supõe-se codificar uma sulfotransferase convertendo a STX e GTX-2/3 em GTX-5 e C-1/2, respectivamente, e o *sxtX*, que foi detectado apenas em linhagens capazes de produzir os análogos N-1 hidroxilado da STX, como a neoSTX (Kelmann et al., 2008; Mihali et al., 2009).

Os genes *sxtF* e *sxtM* codificam enzimas MATE, as quais, provavelmente, estão envolvidas na exportação de STX. Já os genes *sxtY* e *sxtZ*, relacionados com as enzimas Phou, reguladora da absorção de fosfato, e OmpR, reguladora de uma variedade de metabólitos, incluindo nitrogênio e equilíbrio osmótico, respectivamente, sugerem que a produção de SXT é regulada ao nível transcricional em resposta à disponibilidade de fosfato, bem como outros fatores ambientais. Agrupamentos gênicos similares ao *sxt* da *C. raciborskii* T3 foram descritos em outras espécies produtoras de STX, entretanto, a topologia desses agrupamentos *sxt* é também variada, o que sugere a ocorrência de eventos de transposição múltiplos ao longo da evolução da biossíntese de saxitoxina nas cianobactérias (Fiore et al., 2011).

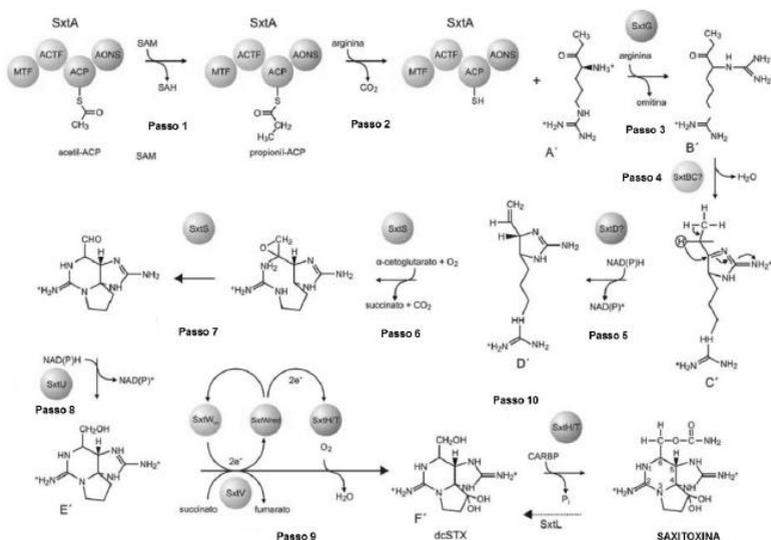


Figura 3. Via da biossíntese da saxitoxina. Modificado de Kelmann et al. 2008.

## 2.3. *Cylindrospermopsis raciborskii*

### 2.3.1. Aspectos gerais e ecofisiologia

*Cylindrospermopsis raciborskii* é uma cianobactéria filamentosa pertencente à ordem Nostocales e sua ocorrência está restrita a ambientes de água doce. As principais características da espécie são tricomas isopolares, solitários (não formam colônia), cilíndricos ou ligeiramente estreitos nas extremidades, com 50–250 µm de comprimento, com pouco e nenhuma constrição na parede celular, podendo ser retos, sigmóides ou espiralados. As células vegetativas são mais longas do que largas, 5-10 µm de comprimento e 1,5-2,5 µm de diâmetro. Apresentam heterocitos terminais, em uma ou nas duas extremidades do tricoma, podendo ser solitários, cônicos, pontiagudos ou ainda arredondados nas extremidades. Os acinetos são solitários ou em pares, separados da célula terminal por uma a três células vegetativas (Komárková, 1998; Sant'Anna & Azevedo, 2000).

Devido ao seu potencial de produzir toxinas e ao aumento do número de relatos de sua ocorrência nos últimos anos em ecossistemas aquáticos continentais de regiões tropicais, subtropicais, e mesmo temperadas (Padisák, 1997), *C. raciborskii* tornou-se uma das espécies

de cianobactérias mais bem estudadas. Apresenta grande habilidade de invasão e adaptação em diferentes ambientes, sendo seu sucesso ecológico atribuído a diversos fatores como alta plasticidade fenotípica (Bonilla et al., 2012) e a existência de diferentes ecótipos com variabilidade intra-específica (Chonudomkul et al., 2004; Piccini et al., 2011) que conferem à espécie a habilidade de tolerar grandes variações ambientais, a produção de compostos alelopáticos, capazes de inibir o crescimento de outras espécies, promovendo uma vantagem ecológica para esta cianobactéria (Figueiredo et al., 2007; Antunes et al., 2012), bem como as mudanças climáticas, que estão diretamente relacionadas com seu comportamento invasivo (Sinha et al., 2012).

Segundo Padisák (1997), o sucesso ecológico de *C. raciborskii* está relacionado com a capacidade de migração na coluna d'água, tolerância à baixa luminosidade, habilidade em utilizar fontes internas de fósforo, alta afinidade com fósforo e amônio, capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, resistência à herbivoria pelo zooplâncton, alta capacidade de dispersão e sobrevivência em condições levemente salinas. Desde então, diferentes estudos buscaram abordar o efeito da temperatura, o requerimento de luz e a dinâmica dos nutrientes no êxito ecológico de *C. raciborskii*.

A temperatura parece ser um dos principais fatores que influenciam o crescimento de *C. raciborskii*. Embora considerada uma espécie de origem tropical, crescendo preferencialmente em temperaturas entre 25-32°C, foi observado que cepas de diferentes regiões do mundo apresentam uma ampla tolerância a valores de temperatura (Briand et al., 2004; Recknagel et al., 2014; Antunes et al., 2015). Segundo Chonudomkul et al. (2004) e Piccini et al. (2011), *C. raciborskii* foi capaz de sustentar biomassa crescendo em temperatura em torno de 14-17°C. Além da tolerância a ampla variação da temperatura, o aumento da temperatura da água dos lagos, devido ao fenômeno de aquecimento global, também é um fator que vem contribuindo para a invasão da espécie em regiões temperadas (Sinha et al., 2012).

É considerada uma espécie adaptada a sombra, e possui baixo requerimento de luz (Padisák, 1997). Entretanto, seu crescimento também tem sido observado em uma ampla gama de intensidades luminosas, variando de algumas dezenas a algumas centenas de  $\mu\text{molphotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Briand et al., 2004). Em alguns lagos rasos brasileiros, *C. raciborskii* foi observada proliferando em intensidades de 15 a 180  $\mu\text{molphotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Bouvy et al., 1999, 2000). Por outro lado, algumas cepas são capazes de tolerar intensidades luminosas acima de

500  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Briand et al., 2004) até 2500  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , como foi observado em um lago na Austrália, formando florações (Fabbro & Duivenvoorden, 1996). Também foi observado, que *C. raciborskii* quando submetida a altas intensidades luminosas em condições de baixas temperaturas, é mais suscetível ao estresse, respondendo, nestas condições, com uma maior proporção de pigmentos fotoprotetores, como os carotenóides (Padisák, 1997; Mehnert et al., 2012).

A estratificação da coluna d'água é, também, considerada favorável a esta espécie (Bouvy et al., 1999; McGregor & Fabbro, 2000), entretanto, em uma revisão de Soares et al. (2013), observou-se a dominância de *C. raciborskii* em sistemas com mistura da água em períodos secos no Brasil, assim como, em sistemas sem estratificação da coluna d'água, como é o caso da Lago do Peri – SC (Baptista & Nixdorf, 2014).

A espécie apresenta alta afinidade e capacidade de armazenamento de fósforo (P) (Wu et al., 2009; Istvánovics et al., 2000), que permite sua dominância em ambientes com baixa concentração deste nutriente, sendo uma vantagem competitiva sobre as demais espécies de cianobactérias (Wu et al., 2009). Além disso, também é capaz de usar diferentes fontes de P, quando este se encontra limitante no ambiente (Bai et al., 2014). *C. raciborskii* é considerada uma espécie generalista com relação ao uso do nitrogênio (N), por ser diazotrófica facultativa. Pode alternar entre a fixação atmosférica do  $\text{N}_2$  e a assimilação do N inorgânico dissolvido (Moisander et al., 2012). Alguns trabalhos mostraram que apresenta preferência de meio contendo amônio, seguido por nitrato e por último a ureia (Saker & Neilan, 2001).

São conhecidas como produtoras de saxitoxinas e cilindrospermopsina (CYN). Entretanto, todas as cepas tóxicas de *C. raciborskii* isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros, até agora, demonstraram produzir neurotoxinas do grupo das saxitoxinas (Lagos et al., 1999; Bernard et al., 2003; Pomati et al., 2003). As variantes de saxitoxinas caracterizadas a partir de amostras de cepas brasileiras de *C. raciborskii* até o momento foram: saxitoxina, neosaxitoxina, dc-saxitoxina, dc-neosaxitoxina GTX-2, GTX-3, GTX-5, GTX-6, (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Ferrão-Filho et al., 2007; Soto-Liebe et al., 2010; Hoff-Risseti et al., 2013). Entretanto, em um trabalho realizado por Hoff-Risseti et al. (2013), algumas cepas apresentaram, além dos genes responsáveis pela biossíntese da SXT, fragmentos de genes pertencentes ao grupamento *cyr*, responsável pela biossíntese de

CYN. Embora tenha sido observada a presença destes genes, apenas a produção de SXT e seus derivados foram detectados.

### 2.3.2 Ocorrência e Distribuição

*Cylindrospermopsis raciborskii* foi observada pela primeira vez na Ilha de Java, Indonésia, e identificada por Woloszynska em 1912. Mais tarde, foi descrita na Índia, em 1939, e em outras regiões tropicais, sendo, conseqüentemente, considerada uma espécie tropical (Antunes et al., 2015). Entretanto, um crescente aumento de registros nos últimos dez anos, tem descrito a espécie em clima tropical, subtropical e temperado, em todos os continentes, exceto a Antártida (Dokulil & Mayer, 1996; Briand et al., 2002; Saker et al., 2003; Vidal & Kruk, 2008; Fastner et al., 2003).

Atualmente, sua ocorrência já foi registrada em grande parte da Europa, Oceania, Ásia, África e América do Norte (Briand et al., 2002; Fastner et al., 2003; Saker et al., 2003; Ryan et al., 2003). Na América do Sul, *C. raciborskii* está amplamente distribuída nas águas tropicais e subtropicais brasileiras (Huszar et al., 2000) e uruguaias (Vidal & Kruk, 2008) (Figura 4).



Figura 4. Mapa do mundo representando os países onde foi reportada a presença de *C. raciborskii*. Modificado de Antunes et al. (2015).

O primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* no Brasil foi feito por Palmer, em 1969, para o Lago Paranoá, Brasília (Branco & Senna, 1991). Porém, somente na década de 80, passou-se a verificar a ocorrência desta cianobactéria em outras regiões brasileiras, como na represa de Serrarias, em São Paulo, e na Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul. (Tucci & Sant'Anna, 2003). Entretanto, foi a partir da década de 90, que se pode observar a grande expansão na distribuição de *C. raciborskii* nas demais regiões brasileiras (Sant'Anna & Azevedo, 2000). Há indícios que o forte evento de El-Niño que ocorreu nos anos de 1997-1998, tenha favorecido o desenvolvimento desta espécie em diferentes regiões do Brasil, devido a redução do volume de vários reservatórios, resultando num aumento da condutividade elétrica da água, da concentração de nutrientes e numa maior estabilidade da coluna d'água (Bouvy et al., 1999, 2000), assim como, a eutrofização de diversos sistemas aquáticos brasileiros (Sant'Anna & Azevedo, 2000).

Em 1994, Branco & Senna, registraram a dominância de *C. raciborskii* no Lago Paranoá, em Brasília, relacionando-a com vários fatores como depleção de nutrientes, estratificação da coluna d'água e baixa predação pelo zooplâncton. Souza et al. (1998) descreveram a dominância de *C. raciborskii* no reservatório de Billings, em São Paulo, mais especificamente no braço do Rio Pequeno, relacionando-a com as condições naturais do rio, como alto valor de pH, disponibilidade de ferro, além da capacidade de migração na coluna d'água, e a baixa predação pelo zooplâncton. A dominância de *C. raciborskii* em reservatórios de água, também foi observada nas regiões do semi-árido do nordeste, por Bouvy et al. (1999, 2000), relacionando-a com altas temperaturas e valores de pH, e baixa razão N:P, além da ausência de predadores eficientes, ressaltando ainda, a influência do fenômeno do El- Niño no ano de 1997.

Na região Sul do Brasil, Komárková et al. (1999) descreveram a dominância e a grande variabilidade morfológica de *C. raciborskii* na Lagoa do Peri, Santa Catarina. Esses autores relacionaram os períodos de dominância da espécie com condições de altas temperaturas, baixa concentração de nitrogênio e altas concentrações de fósforo solúvel e ortofosfato total. Nessas condições, foi observada uma maior concentração de filamentos com a presença de heterocitos.

Yunes et al. (2003) relataram o primeiro caso de PSP em sistemas de água doce no Sul do Brasil, na barragem de Salto, Rio Grande do Sul, durante uma floração de *C. raciborskii* no ano de 1999. Os mesmos autores ainda relatam o caso do reservatório de Alagados, no Paraná, onde foi registrada uma floração quase que persistente no local. Outro

trabalho relevante sobre a dominância de *C. raciborskii* em sistemas de reservatório de águas brasileiros, foi realizado por Huszar et al. (2000), ao analisar o fitoplâncton de oito sistemas das regiões sudeste e nordeste, dos quais cinco, são dominados por *C. raciborskii*. Mais recentemente, Soares et al. (2013), em uma revisão sobre a ocorrência de cianobactérias no Brasil, relacionou a dominância de *C. raciborskii* com períodos secos, em sistemas com mistura anual da coluna d'água, limitados por luz e com altas concentrações de fósforo total.

### 2.3.3. Expansão e Filogenia

A primeira hipótese para compreender a dispersão de *C. raciborskii* através dos cinco continentes foi proposta por Padisák (1997), baseado em dados epidemiológicos, hidrológicos, e na fisiologia da espécie. Segundo a autora, *C. raciborskii* teria originado em lagos tropicais na África, e então, dispersado para outras regiões equatoriais como Indonésia e América Central. Um segundo centro de radiação seria situado na Austrália, responsável pela dispersão as regiões tropicais, subtropicais e temperadas. A dispersão da Austrália, segundo Padisák (1997), provavelmente ocorreu por duas vias: uma oceânica para a América do Norte e Sul através das aves, ou por introdução humana não intencional, e uma rota continental para a Ásia Central atingindo o continente Europeu, também através de aves e pelo curso de rios.

Estudos subsequentes, baseados em dinâmica de populações, sugeriram que a colonização de *C. raciborskii* em regiões temperadas, está provavelmente relacionada com a tolerância a diferentes condições ambientais, combinada ao aumento das temperaturas decorrentes do fenômeno de aquecimento global (Briand et al., 2004, Wiedner et al., 2007). Entretanto, com o desenvolvimento e a utilização de ferramentas moleculares, a partir do ano 2000, vários estudos propuseram elucidar os padrões evolutivos, através de semelhanças genéticas da espécie, com base em marcadores genéticos.

Os primeiros trabalhos a caracterizar a filogeografia da espécie com base molecular, foram realizados por Dyble et al. (2002) e Neilan et al. (2003). Cepas originárias da Austrália, Alemanha, Hungria, Brasil e Estados Unidos foram comparadas baseadas na análise do gene *nifH*, que codifica a nitrogenase redutase (Dyble et al., 2002), e através do gene 16S rRNA (Neilan et al., 2003), e separadas em três grupos, de acordo com a localização geográfica: Americanas, Europeias e

Australianas. Os autores encontraram maior divergência do grupo das cepas Americanas (Brasil e Estados Unidos) quando comparadas ao grupo das Europeias e Australianas, e sugeriram uma dispersão da espécie da Austrália para o continente Europeu, de acordo com a proposta inicial de Padisák (1997). Esta mesma perspectiva também foi levantada por Moreira et al. (2011).

Gugger et al. (2005) estudou a diversidade genética entre cepas de *C. raciborskii* isoladas da Europa, América, Austrália e da África, pelo sequenciamento da região ITS1-L, separando também as cepas de acordo com a localização geográfica, entretanto, agrupou dentro do mesmo cluster as cepas Australianas e Africanas. Haande et al. (2008) também mostraram uma clara separação entre populações de *C. raciborskii* de diferentes regiões geográficas. As análises filogenéticas das regiões ITS1-L e do gene *nifH* mostraram que as cepas originadas do mesmo continente são mais fortemente relacionadas entre si, do que com as cepas originárias de outros continentes (Haande et al. 2008).

Através da análise concatenada de quatro marcadores genéticos, o gene 16S rRNA, os fragmentos ITS1-L, ITS1 e o gene da RNA polimerase *rpoC1*, Moreira et al. (2011) analisaram cepas isoladas de Portugal, França, Austrália, Brasil, Tunísia e do Vietnã. As análises filogenéticas mostraram uma separação das cepas em três grupos distintos bem suportados: Europeu, Africano/Americano e Asiático/Australiano, sendo que o grupo Europeu apresentou uma maior similaridade genética com os grupos das cepas isoladas da Ásia e da Austrália, do que com o grupo Africano e Americano.

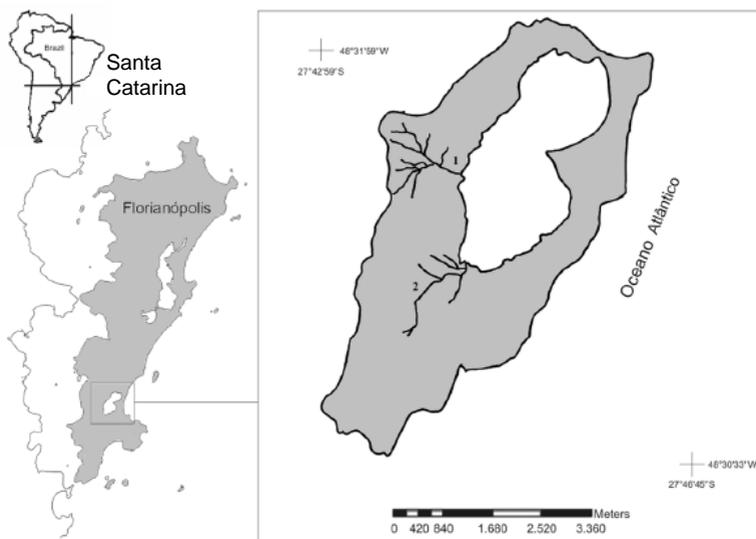
Recentemente, Moreira et al. (2015), utilizando cepas isoladas dos cinco continentes, e três marcadores moleculares, 16S rRNA, ITS-L e o *rpoC1*, sugeriu uma nova rota de dispersão para *C. raciborskii*, com origem nas áreas tropicais do continente Americano. Segundo os autores, *C. raciborskii* primeiramente se propagou para o continente Africano, quando os blocos continentais ainda eram unidos, e em seguida, se dispersou para a Ásia e Austrália, sendo a Europa o último e mais recente continente a ser colonizado.

Apesar de se observar em vários trabalhos que a separação das populações de *C. raciborskii* dos diferentes continentes isolados, formam grupos distintos, e que podem ser relacionados com a produção de toxinas (Gugger et al. 2005, Haande et al. 2008, Stucken et al. 2009, Moreira et al. 2015), Stucken et al. (2009), analisando cepas produtoras e não produtoras de cilindrospermopsina, não observaram qualquer relação entre a filogenia e os fenótipos tóxicos em *C. raciborskii*.

## 2.4. Lagoa do Peri

A bacia hidrográfica da Lagoa do Peri ( $27^{\circ}43'S - 48^{\circ}38'O$ ), localizada na parte sudeste da Ilha de Santa Catarina, está inserida no Parque Municipal da Lagoa do Peri, estabelecido como patrimônio natural desde 1976 (Laudares-Silva, 1999) (Figura 5). Com um volume em torno de 21,2 milhões de metros cúbicos de água (Laudares-Silva, 1999; Oliveira, 2002), abriga o maior manancial de água doce da Ilha e um dos últimos remanescentes da Mata Atlântica, destacando-se como importante ecossistema de preservação da biodiversidade (Sbroglia & Beltrame, 2012).

A lagoa apresenta área superficial de  $5,7 \text{ km}^2$ , comprimento máximo de 4 km, largura média de 1,7 km, profundidade média de 4,2 m e profundidade máxima de 11 m. Está situada a 3 metros acima do nível do mar, não sofrendo influência das marés, representando, assim, um dos principais reservatórios de água doce da costa catarinense (Laudares-Silva, 1999; Simosassi, 2001). A partir de setembro de 2000, a Lagoa do Peri passou a ser utilizada como manancial de abastecimento de água para as regiões sul e leste da Ilha de Santa Catarina, em projeto concebido pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) (Mondardo, 2004).



**Figura 5.** Mapa de localização da Lagoa do Peri, Florianópolis, Brasil. Modificado de Hennemann & Petrucio (2011).

Apresenta natureza turbulenta, típica de ambientes polimícticos e a zona eufótica geralmente é menor que a zona de mistura, sendo, portanto limitado por luz (Laudares-Silva, 1999; Tonetta et al., 2013). Segundo Hennemann & Petrucio (2011) a lagoa apresenta homogeneidade espacial para a concentração de clorofila-a e nutrientes, e a baixa concentração de nutrientes totais, média de nitrogênio total: 745  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e média de fósforo total: 14,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , indicam um ambiente limitado por fósforo. Segundo os mesmos autores, a lagoa foi classificada como oligotrófica de acordo com a concentração de nutrientes e meso-eutrófica para transparência da água e clorofila-a.

A temperatura média observada na Lagoa do Peri varia de 15 °C a 30 °C segundo Laudares-Silva (1999), e valores de pH entre 5,4 (Hennemann & Petrucio, 2011) a 8,1 (Laudares-Silva, 1999; Simonassi, 2001). Quanto às concentrações de clorofila-a, Laudares-Silva (1999) encontrou valores médios entre 7,44  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 18,74  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em 1996, enquanto Simonassi (2001) obteve valores médios entre 15,5 e 38,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em 1998, e Hennemann & Petrucio, (2011) valores entre 4,5 a 23,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em um trabalho mais recente, Hennemann & Petrucio, (2016), encontraram valores de clorofila-a variando de 4,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a quase 60,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Segundo Silveira (2013), a diversidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri é baixa, devido principalmente à dominância por poucas espécies de cianobactérias. Desde meados de 1990, vem sendo registrada a presença da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, e vem se evidenciado o aumento na sua densidade e períodos de dominância (Komárková et al., 1999; Laudares-Silva, 1999; Grellmann, 2006; Mondardo et al., 2006; Tonetta et al., 2013; Silveira, 2013; Baptista & Nixdorf, 2014).

Komárková et al. (1999) mostrou a grande variabilidade morfológica de *C. raciborskii* na Lagoa do Peri, durante dois anos de estudo, relacionando os períodos de dominância da espécie com altas temperaturas e concentração de fósforo. Laudares-Silva (1999) destacou a dominância de *C. raciborskii* em dois meses de coleta, e a considerou abundante durante seis meses do ano. No trabalho realizado por Grellmann (2006), *C. raciborskii* foi considerada a única espécie dominante durante o período estudado.

Da mesma forma, no trabalho realizado por Tonetta et al. (2013), *C. raciborskii* foi a espécie dominante durante quase todo o ano estudado, sendo substituída por *Limnothrix* sp. quando houve um aumento na temperatura e na concentração de fósforo, e diminuição da velocidade do vento. A presença de *C. raciborskii* em altas proporções

durante toda a série temporal, também foi registrada por Silveira (2003). *C. raciborskii* foi observada com grande densidade de heterocitos, levando a inferir que a fixação de nitrogênio atmosférico parece estar exercendo papel crucial para o sucesso da espécie. De maneira geral, segundo Silveira (2003), a estrutura e dinâmica do fitoplâncton da lagoa do Peri demonstraram estar relacionadas à limitação por luz e nutrientes dissolvidos, somados a um amplo gradiente temporal de temperatura, promovendo o sucesso de espécies adaptadas a este cenário.

Baptista & Nixdorf (2014) relacionaram a mono-dominância de *C. raciborskii* com períodos de regime de não estratificação da coluna d'água e com baixa disponibilidade de nutrientes dissolvidos. Os mesmos autores ainda indicam que a espécie apresenta uma alta capacidade em converter o fósforo em biomassa, bem como capacidade efetiva de exploração de recursos. As diferenças na temperatura e na disponibilidade de nitrogênio parecem ser os parâmetros de condução para mudanças sazonais na comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri.

Recentemente, Hennemann & Petrucio (2016) relacionaram a alta concentração de clorofila-a observada na Lagoa do Peri com a condição de limitação de fósforo, profundidade e a transparência da coluna d'água, que provavelmente, estão favorecendo a dominância de *C. raciborskii*, especialmente durante as maiores temperaturas registradas no verão, conduzindo a alta concentração de clorofila-a, mesmo em um ambiente com baixa concentração de nutrientes dissolvidos.

Com relação à presença de toxinas na água da Lagoa, Grellmann (2006) registraram a presença de saxitoxinas e seus análogos (NeoSXT, GTX3 e GTX5), ainda que em concentrações baixas. Recentemente, Brentano et al. (2016) relacionaram a variação da concentração de STX na Lagoa do Peri com fatores abióticos, e segundo esses autores, a condutividade e a concentração de nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN) proporcionaram o maior poder explicativo para a concentração de STX *in situ*.

Com base nos estudos realizados na Lagoa do Peri, pode-se observar o grande esforço em compreender os fatores relacionados à ocorrência e os períodos de dominância de *C. raciborskii*, uma espécie produtora de toxinas e de grande risco para a segurança da saúde pública. Entretanto, ressalta-se a necessidade de estudos sobre a ecofisiologia da espécie a partir de cepas isoladas da Lagoa, assim como a confirmação da toxicidade desses isolados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a morfologia, filogenia e a ecofisiologia das duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii*, LP1 e LP2, isoladas da Lagoa do Peri, a fim de se buscar compreender os fatores relacionados com a sua dominância neste lago subtropical, assim como, investigar a relação entre a concentração de toxinas e os níveis relativos de transcritos dos genes envolvidos na biossíntese de saxitoxina.

#### 3.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar, através de microscopia óptica, a morfologia das cepas LP1 e LP2;
- ✓ Confirmar a identificação taxonômica das cepas, através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA;
- ✓ Analisar a produção e o perfil de saxitoxinas nas duas cepas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- ✓ Avaliar a produtividade primária das duas cepas através de curvas de fotossíntese vs. Irradiância;
- ✓ Avaliar a capacidade de aclimação das duas cepas quando submetidas a baixas e altas intensidades luminosas;
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes temperaturas e condições de nutrientes na taxa de crescimento das duas cepas;
- ✓ Analisar a relação filogenética das duas cepas com base nos marcadores moleculares 16S rRNA, ITS1 e *rpoC1*;
- ✓ Relacionar o conteúdo de toxinas e os níveis relativos de transcritos nas duas cepas.

## REFERÊNCIAS

- Abed, R.M.M., Dobretsov, S. & Sudesh, K. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1-12.
- Antunes, J.T., Leão, P.N., & Vasconcelos, V.M. 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology* 6, 473.
- Antunes, J.T., Leão, P.N., & Vasconcelos, V.M. 2012. Influence of biotic and abiotic factors on the allelopathic activity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* strain LEGE99043. *Microb.Ecol.* 64: 584–592.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R. & Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru Brazil. *Toxicology*, 181: 441-446.
- Bai, F., Liu, R., Yang, Y., Ran, X., Shi, J. & Wu, Z. 2014. Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 39: 112-120.
- Baptista, M.G. & Nixdorf, B. 2014. Low disturbances favor steady state: Case of cyanobacterial monodominance in a Brazilian coastal lagoon. *Inland Waters* 4: 243-254.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.-F., Bire', R., Krys, S. & Fontaine, J.-J. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environmental Toxicology* 18: 176–86.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., Gonzáles-PiENA, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lüring, M., Antoniadis, D., Padisák, J. & Kruk, C. 2011. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology* 79: 594-607.
- Bouvy, M., Falcão, O.D., Marinho, M., Pagano, M., & Moura, A. 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 2: 13–27.
- Bouvy, M., Molica, R.J.R., De Oliveira, S., Marinho, M. & Beker, B. 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast Brazil. *Aquatic Microbiol Ecology* 20: 285–297.

- Branco, C.W.C. & Senna, P.A.C. 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoa reservoir, Brasília, Brazil. *Algalogical Studies* 75: 85–96.
- Branco, C.W.C. & Senna, P.A.C. 1991. The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasilia, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 61: 85–91.
- Brentano, D.M., Giehl, E.L.H. & Petrucio, M.M. 2016. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae* 56: 22–28.
- Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C. & Dufour, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at midlatitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology* 40: 231–238.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F. & Coute, A. 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research* 36: 3183–3192.
- Capone, D.G., O’Neil, J., Zehr, J. & Carpenter, E.J. 1990. Basis for diel variation in nitrogenase activity in the marine planktonic cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Applied Environmental Microbiology* 56: 3532–3536.
- Carmichael, W.W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHabs”. *Human and Ecological Risk Assessment* 7: 1393–1407.
- Carmichael, W. W. 1994. The toxins of cyanobacterial. *Scientific American* 270: 78–86.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- The Cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445–459.
- Cembella, A.D. 1998. Ecophysiology and Metabolism of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Microalgae. In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*; Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, pp. 381–403.
- Chonodomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K. & Watanabe, M.M. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 345–355.

- Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, WHO, E&FN Spon, Routledge, London.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A. 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria, *Toxicon* 37: 1181-1185.
- Codd, G.A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51-60.
- Dittmann, E., Fewer, D.P. & Neilan, B.A. 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Review* 37: 23-43.
- Dokulil, M. & Teubner, K. 2000. Cyanobacterial dominance in lake. *Hydrobiologia*, 438: 1-12.
- Dokulil, M.T. & Mayer, J. 1996. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* - *Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria. *Algological Studies* 83: 179-119.
- Dyble, J., Paerl, H.W. & Neilan, B.A. 2002. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. *Applied Environmental Microbiology* 68: 2567-2571.
- Fabbro, L.D. & Duivenvoorden, L.J. 1996. Profile of a bloom of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical Central Queensland. *Marine Freshwater Research* 47: 685-694.
- Falconer, I.R. & Humpage, A.R. 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin Cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 16: 192-195.
- Falconer, I.R. 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental toxicology and water quality* 6: 177-184.
- Falconer, I.R., Burch, M.D., Steffensen, D.A., Choice, H. & Coverdade, O.R. 1994. Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9: 131-139.
- Falconer, I.R. & Humpage, A.R. 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2: 43-50.

- Falconer, I.R., 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14: 5-12.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K. & Chorus, I. 2003. *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 4: 3313–3321.
- Ferrão Filho, A.S., da Costa, S.M., Ribeiro, M.G.L. & Azevedo, M.F.O., 2008. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology* 23: 161–168.
- Figueredo, C.C., Giani, A. & Bird, D.F., 2007. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology* 43: 256–265.
- Fiore, M.F., Alvarenga, D.O. & Silva-Stenico, M.S. 2011. Genética de cianotoxinas. *Microbiologia em Foco* 12: 24-35.
- Grahm, I. E. & Wilcox, I. W. 2000. *Algae*. Upper Saddle River.NJ: Prentice.
- Grellmann, C. 2006. Aspectos da morfologia e ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszinska) Seenayya et Subba Raju e produção de cianotoxinas na Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 94p.
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. & Humbert, J.F., 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Applied Environmental Microbiology* 71: 1097–1100.
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M. & Wiedner, C. 2008. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7: 692–701.
- Hoff-Rissetti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D., Pinto, E., Werner, V.R., & Fiore, M.F. 2013. *Cylindrospermopsis* and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PLoS ONE* 28: e74238.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R. & Falconer, I.R. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35: 341-346.

- Hennemann, M.C. & Petrucio, M.M. 2016. High chlorophyll a concentration in a low nutrient context: discussions in a subtropical lake dominated by Cyanobacteria. *Journal of Limnology* 75: 520-530
- Hoehn, R.C. & Long, B.W. 2004. Toxin cyanobacteria (blue-green algae): An emerging concern *Water Treatment Technology*, pp. 1-20.
- Huszar, V. L. M., Silva, L. H. S., Marinho, M., Domingos, P. & Anna, C. L. S. 2000. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424: 67-77.
- Istvaánovics, V., Shafik, H.M., Présing, M. & Juhos, S. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in through flow cultures. *Freshwater Biology* 43: 257-275.
- Kao, C.Y. & Levinson, S.R. 1986. Tetrodotoxin, saxitoxin, and the molecular biology of the sodium channel. In: Boland, B., Cullinan, J., Cohn, T. (Eds.), *Annals of the New York Academy of Science*. New York Academy of Science, New York, pp. 1-445
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F. & Neilan, B.A. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 74: 4044-4053.
- Komárková, J., Laudares-Silva, R. & Senna, P.A.C. 1999. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. *Algological Studies* 94: 207-222.
- Komárková, L.J. 1998. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In IV Congresso Latino Americano de Ficologia, Brazil. (M.T.P. Azevedo, coord.). In: Azevedo, T. de Paiva (ed.): *Anais dos rv Congresso latino-americano de Ficologia, II Reunião Ibero americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia*. - Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Vol. I.: 327-340.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.O. & Oshima, Y. 1999. The first evidence of paralytic shelfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.
- Laudares-Silva, R. 1999. Aspectos limnológicos, variabilidade especial e temporal na estrutura da comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, Santa Catarina, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 216p.

- Leflaive, J. & Ten-Hage, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52: 199-214.
- Llewellyn, L.E. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports* 23: 200–222.
- Matsushima, R., Yoshizawa, S., Watanabe, M.F., Harada, K-I., Furusawa, M., Carmichael, W.W. & Fujiki, H. 1990. In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 171: 867-874.
- Mehnert, G., Rücker, J., Nicklisch, A., Leunert, F. & Wiedner, C. 2012. Effects of thermal acclimation and photoacclimation on lipophilic pigments in an invasive and a native cyanobacterium of temperate regions. *European Journal of Phycology* 47: 182–92.
- Mihali, T.K.; Carmichael, W.W.; Neilan, B.A. 2011. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. *PLoS One* 6, e14657.
- Mihali, T.K., Kellmann, R. & Neilan, B.A. 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochemistry* 10- 8.
- Moisander, P.H., McClinton, E. & Paerl, H.W. 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbiology Ecology* 43: 432–442.
- Molica, R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S. & Lagos, N. 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycology* 41: 606-611.
- Monardo, R.I., Sens, M.L. & Melo-Filho, L.C. 2006. Pre-treatment with chlorine and ozone for removal of the cyanobacteria. *Engenharia Sanitária e Ambiental* 11: 337-342.
- Mondardo, R I. 2004. Influência da pré-oxidação na tratabilidade das águas via filtração direta descendente em manancial com elevadas concentrações de microalgas e cianobactérias. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Moreira, C., Fathalli, A., Vasconcelos, V. & Antunes, A. 2011. Genetic diversity and structure of the invasive toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Current Microbiology* 62: 1590–1595.

- Moreira, C., Fathalli, A., Vasconcelos, V. & Antunes, A. 2015. Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Archives of Microbiology 197:47-52
- Murray, S.A., Mihali, T. K. & Neilan, B. A. 2011. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. Molecular Biology and Evolution 28: 1173–1182.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C. & Dittmann, E. 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. Environmental Microbiology 15: 1239-53.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Törökne, A. & Burns, B.P., 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Molecular Ecology 12: 133–140.
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Archives of Hydrobiology Supplement 107: 563-593.
- Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. Limnology Oceanography 33: 823-847.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R. & Neilan, B. 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. Marine Drugs 8: 1650–1680.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., Gonzáles-Piana, M., Giand, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C. & Bonilla, S. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. Harmful Algae 10: 644-653.
- Pomati, F., Neilan, B.A., Suzuki, T., Manarolla, G. & Rossetti, C. 2003. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). Journal of Phycology 39: 535–542.
- Rai, A.N. 1990. CRC handbook of symbiotic cyanobacteria. Boca Raton: CRC press, 253p.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok, K.N., Sridhar, S. & Rengasamy, R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. Critical Reviews in Microbiology 34:77–88.
- Recknagel, F., Orr, P.T. & Cao, H. 2014. Inductive reasoning and forecasting of population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* in three sub-tropical reservoirs by evolutionary computation. Harmful Algae 31: 26-34.

- Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z. & Lu, S.C. 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid Cylindrospermopsin in cultured hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 49: 219-225.
- Runnegar, M.T.C., Falconer, I.R & Silver, J. 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Archives of Pharmacology* 317: 268-272.
- Ryan, E.F., Hamilton, D.P. & Barnes, G.E. 2003. Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waikato lakes of New Zealand, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 829-836.
- Saker, M. L., Nogueira, I. C. G., Vasconcelos, V. M., Neilan, B. A., Eaglesham, G. K. & Pereira, P. 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55:243-50.
- Saker, M.L. & Neilan, B.A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. *Applied Environmental Microbiology* 67: 1839-1845.
- Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Werner, W.R., Dogo, C.R., Rios, F.R. & Carvalho, L.R. 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126: 249-263.
- Sant'Anna CL & Azevedo MTP. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71: 359-385.
- Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Agujaro, L.F., Carvalho, M.C., Carvalho, L.R. & Souza, R.C.R. 2006. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. *Interciência/Sociedade Brasileira de Ficologia*, pp. 1-58.
- Sbroglia, R.M. & Beltrame, A.V. 2012. O zoneamento, conflitos e recategorização do parque municipal da Lagoa do Peri, Florianópolis/SC. *Boletim de Geografia* 30:5-18.
- Schopf, J.W. & Packer, B.M. 1987. Early Archean (3.3 Billion to 3.5 Billion-Year-Old) Microfossils from Warrawoona Group, Australia, *Science* 237: 70-73.
- Simonassi, J.C. 2001. Caracterização da Lagoa do Peri, através da análise de parâmetros físico-químicos e biológicos, como subsídio ao gerenciamento dos recursos hídricos da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 72p.*

- Sinha, R., Pearson, L.A., Davis, T.W., Burford, M.A., Orr, P.T. & Neilan BA. 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones: Is climate change responsible? *Water Research* 46: 1408-1419.
- Sinha, R., Pearson, L.A., Davis, T.W., Muenchhoff, J., Pratama, R., Jex, A., Burford, M.A. & Neilan, B.A. 2014. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics* 15:83.
- Sivonen, K., Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London and New York, Cap. 3, pp. 41-95.
- Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Miranda, M.N., Mello, M.M., Roland, F. & Lüring, M. 2013a. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia* 717: 1–12.
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A. & Vásquez, M. 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56: 1350–1361.
- Souza, R.C.R., Carvalho, M.C. & Truzzi, A.C. 1998. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings reservoir, Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality* 13:73-81.
- Stewart, I., Schluter, P.J. & Shaw, G.R. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environmental Health* 5: 23.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdvas, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., Vassquez, M. & Glockner, G. 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE* 5:e9235.
- Tucci, A. & Sant'anna, C. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira Botanica* 26: 97-112.
- Van Dolan, F.M., Fire, S.E., Leighfield, T.A., Mikulski, C.M. & Doucette, G.J. 2012. Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish by Receptor Binding Assay: Collaborative study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 95: 795–812.

- Vermaas, W.F. 2001. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. Encyclopedia of Life Sciences (Nature Publishing Group, London), pp 245–251.
- Vidal, L. & Kruk, C. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 3: 142-151.
- Wang, D.Z., Zhang, S.F., Zhang, Y. & Lin, L. 2016. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview. Journal of Proteomics 135: 132–140.
- Wang, J.X., Salata, J.J. & Bennett, P.B. 2003. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K<sup>+</sup> channels. Journal of General Physiology 121: 583–598.
- Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R. & Nixdorf, B. 2007. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. Oecologia 152: 473–484
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M. & Neilan, B.A. 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. Marine Drugs 8: 2185-2211.
- Wu, Z., Shi, J. & Li R. 2009. Comparative studies on photosynthesis and phosphate metabolism of *Cylindrospermopsis raciborskii* with *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos-aquae*. Harmful Algae 8: 910-915.
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ichihara, A, Carmichael, W.W. & Fujiki, H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 116: 609-614.
- Yunes, J.S., Cunha, N.T., Barros, L.P., Proença, L.A.O. & Monserrat, J.M., 2003. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. Comments on Toxicology 9: 103-115.
- Yunes, J.S., De La Rocha, S., Giroldo, D., Bonoto da Silveira, S., Comin, R., da SilvaBicho, S., Melcher, S.S., Sant'anna, C.L. & Vieira, A.A., 2009. Release of carbohydrate and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. Journal of Phycology 45: 585–591.

## Capítulo I - Caracterização ecofisiológica e perfil de toxinas de duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas da Lagoa do Peri, SC, Brasil

### 1. Introdução

*Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska 1912) Seenayya and Subba Raju (1972) é uma cianobactéria planctônica, de água doce, conhecida por produzir cianotoxinas como a cilindrospermopsina, saxitoxina e seus derivados, e alguns compostos tóxicos ainda não conhecidos. Originalmente descrita em regiões tropicais, a espécie tem sido cada vez mais relatada em corpos de água doce de regiões subtropicais e temperadas (Padisák, 1997; Saker & Griffiths, 2001; Neilan et al., 2003; Figueiredo et al., 2007) mostrando uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes.

Vários estudos têm sugerido que o sucesso invasivo de *C. raciborskii* está relacionado principalmente com sua capacidade de tolerar uma vasta gama de condições ambientais, como baixo requerimento de luz e a disponibilidade de nutrientes (Padisák & Reynolds, 1998; Wu et al., 2009; Piccini et al., 2011; Gomes et al., 2013). Outros autores também atribuem o sucesso ecológico a sua plasticidade fenotípica (Bonilla et al., 2011), a produção de compostos alelopáticos (Figueredo et al., 2007), alterações climáticas (Sinha et al., 2012) e a existência de diferentes ecótipos (Chonudomkul et al., 2004; Piccini et al., 2011).

*Cylindrospermopsis raciborskii* tornou-se uma das espécies de cianobactérias mais bem estudadas, e a importância da compreensão dos fatores que levam à sua dispersão e dominância em diferentes regiões do mundo está relacionada, principalmente, à produção de potentes toxinas, como a cilindrospermopsina (CYN) (Othani et al., 1992) e a saxitoxina (SXT) (Lagos et al., 1999). Nos sistemas de água doce brasileiros, *C. raciborskii* é conhecida por produzir saxitoxina (STX) e seus análogos (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002). Estes são uma classe de alcalóides neurotóxicos, que atuam bloqueando os canais de sódio dependentes da voltagem nas células excitáveis, resultando no envenenamento paralítico pelo consumo de marisco, do inglês *Paralytic Shellfish Poisoning* (Stevens et al., 2011). A STX é uma das mais potentes neurotoxinas naturais conhecidas, e desde a sua descoberta, 57 análogos naturais da STX foram identificados. As toxinas paralisantes podem ser classificadas em não-sulfatadas (STX, neoSTX), mono-sulfatadas (GTX1-6), di-sulfatadas (C1-4), decarbamoil (dcSTX,

dcneoSTX, dcGTXs1-4) e deoxi-decarbamoil (doSTX, doGTXs1-3) de acordo com a variação e a posição dos radicais (Wiese et al., 2010).

No Brasil, a dominância de *C. raciborskii* foi registrada principalmente em reservatórios eutrofizados das regiões nordeste e sudeste (Bouvy et al., 1999; Tucci & Sant'ana, 2003; Soares et al., 2009) e na região sul, foi registrada nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul (Yunes et al., 2003), e Santa Catarina (Laudares-Silva, 1999). Sua ocorrência está associada a períodos de seca, em sistemas com mistura anual da coluna d'água e com alta concentração de fósforo (Soares et al., 2013). Embora *C. raciborskii* seja capaz de atingir níveis elevados de biomassa individualmente, são encontradas co-ocorrendo com diferentes espécies de cianobactérias em muitos sistemas (Soares et al., 2013).

A Lagoa do Peri é um lago costeiro subtropical localizado na região sudeste da Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil (27°43'59"S; 48°31'34"O). O lago tem sido considerado polimítico e limitado por luz, apresentando baixas concentrações de nutrientes e ausência de influência marinha direta (Laudares-Silva, 1999; Simonassi, 2001). A Lagoa do Peri foi classificada como oligotrófica para a concentração de nutrientes e meso-eutrófica para a concentração de clorofila-a e transparência da água (Hennemann & Petrucio, 2010). A alta concentração de clorofila-a, devido principalmente a elevada densidade de *C. raciborskii*, reflete diretamente na transparência da água (Tonetta et al., 2015) e a concentração de nutrientes totais revela um ambiente potencialmente limitado por fósforo (Reynolds, 2006; Tonetta et al., 2013).

*Cylindrospermopsis raciborskii* tem sido registrada na Lagoa do Peri desde 1994 (Laudares-Silva, 1999; Grellmann, 2006), representa cerca de 90% da densidade total do fitoplâncton, mostrando-se dominante durante maior parte do ano (Tonetta et al., 2013; Silveira, 2013). A temperatura da água na Lagoa do Peri varia entre 15 °C e 30 °C, sugerindo uma grande tolerância à temperatura desta espécie neste ambiente (Briand et al., 2004; Hennemann & Petrucio, 2011).

Embora a concentração de nutrientes não tenha apresentado mudanças significativas desde 1994 (Tonetta et al., 2013), um aumento na sua densidade e períodos de dominância na Lagoa do Peri tem sido observado, nos últimos dez anos. Em 1996-1997, a densidade de *C. raciborskii* variou em torno de 3 e 41 x 10<sup>3</sup> ind.mL<sup>-1</sup>, em 2004 – 2005, de 40 a 116 x 10<sup>3</sup> ind.mL<sup>-1</sup>, e em 2009 e 2011, a densidade variou de 23 a 220 x 10<sup>3</sup> ind.mL<sup>-1</sup> (Laudares-Silva, 1999; Grellmann, 2006; Hennemann & Petrucio, 2011; Tonetta et al., 2013). A Lagoa do Peri é

um dos principais reservatórios de água doce na Ilha de Santa Catarina, fazendo parte do sistema de abastecimento de água, fornecendo de água potável para cerca de 100.000 habitantes. Assim, entender os fatores que levam a dominância desta cianobactéria com potencial efeito tóxico na Lagoa do Peri é de extrema e crucial importância para a segurança da saúde pública.

Existem vários trabalhos realizados na Lagoa do Peri, relacionando a presença de *C. raciborskii* com fatores ambientais, entretanto, nenhum trabalho foi conduzido em laboratório em nível experimental com cepas locais da espécie. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a ecofisiologia e toxicologia de duas linhagens de *C. raciborskii* isoladas de Lagoa do Peri, para proporcionar uma melhor compreensão da ecologia e riscos potenciais da espécie. Isto foi feito através da avaliação do efeito de diferentes temperaturas, razões N:P e regimes de luz sobre o crescimento das cepas, além da determinação dos perfis de toxina.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Cepas e condições gerais de cultivo**

As duas cepas de *C. raciborskii* utilizadas no presente estudo foram isoladas da Lagoa do Peri, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. A cepa *C. raciborskii* LP1 foi isolada em 2006 e a cepa *C. raciborskii* LP2 foi isolada em 2013.

Ambas as cepas foram mantidas em meio de cultura ASM-1 (Gorham et al., 1964) a  $22 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12:12 claro-escuro e irradiância de  $60 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Nestas condições, as cepas LP1 e LP2 foram molecularmente identificadas e comparadas quanto as suas respectivas morfologias, produtividades fisiológicas e potencial tóxico. Foram também realizados dois experimentos com as cepas nestas condições de cultivo: i. capacidade de aclimação a baixas e altas intensidades de luz; e ii. resposta do efeito dos nutrientes e da temperatura nas taxas de crescimento das duas cepas.

### **2.2. Caracterização morfológica e identificação molecular**

As características morfológicas dos tricomas (comprimento, largura e volume) foram determinadas através de um microscópio Olympus BX41 e analisadas utilizando literatura especializada (Komárková, 1998; Komárek & Komárková, 2003).

As células das culturas de *C. raciborskii* LP1 e LP2, foram coletadas na fase exponencial de crescimento e concentradas através de centrifugação por 10 min a 5.000 g. O DNA genômico total de cada cepa foi extraído usando do kit de extração Fast DNA™ SPIN for Soil (MP Biomedical, Illkirsh, France) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a amplificação do gene *16S rRNA* foi utilizado o conjunto de iniciadores específicos para cianobactérias, 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 809R (5'-CTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA) (Neilan et al., 1997). Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 15,5 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL 5x Hi-Fi Buffer, 3,1 µL dNTPs, 0,5 µL de cada iniciador, 0,25 µL Velocity DNA polymerase (Bioline) e 0,5 µl do DNA extraído. A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR system 2400 (PerkinElmer, Norwalk, USA) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 92 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 20 s, anelamento a 50 °C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram então purificados através de precipitação com etanol e enviados para o sequ nciamento. As análises foram realizadas no *Ramaciotti Centre for Genomics*, Universidade de New South Wales, Austrália.

As sequencias de DNA obtidas das cepas LP1 e LP2 foram editadas e alinhadas utilizando um software de alinhamento múltiplo de sequências, Geneous 6.1.8 (Biomatters) e a identidade foi determinada através de uma busca na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

### 2.3. Análise de toxinas

Para a determinação qualitativa e quantitativa de saxitoxinas, uma alíquota de 100 mL foi retirada de cada cepa na condição geral de cultivo. As alíquotas foram filtradas em filtros de fibra de vidro GF/C (Whatmann, UK), e colocadas em ampolas de vidro para extração das toxinas durante, pelo menos, 12 horas   5 °C em 10 ml de HCL 0,05 M.

Após de 12 horas, as alíquotas foram sonicadas a 20 kHz (Hielscher-UP100H- Alemanha) em banho de gelo durante 3 minutos. Essas alíquotas foram, então, filtradas em filtros de Ester de celulose de 45µm de diâmetro (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). A presenç a de saxitoxinas foi analisada através de Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE), com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência (Rourke et al., 2008).

A cromatografia foi realizada em um sistema HPLC (Shimadzu, Japan), que consiste em uma controladora CBM 20A, um detector de Fluorescência RF-10Ax1 (excitação 330nm e emissão 390 nm), duas bombas binárias LC-20AD e um forno de coluna CTO-20A controlados através do software Labsolution 5.41.240. Para as reações de pós derivatização foi utilizada uma bomba quaternária LC-10AD controlada manualmente e um sistema de banho (Novatecnica, modelo NT 245), com temperatura controlada a 80°C, em que ficam imersas as mangueiras de teflon. A coluna analítica utilizada para as análises foi Zorbax Bonus-RP C8 (150 x 4,60mm, 5µm) marca Agilent®.

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: O eluente A (GTX1-5), consistiu de heptanosulfonato de sódio 11 mM, ácido fosfórico 5,5mM com pH ajustado para 7,1, e o eluente B (Neo-STX, dc-STX, STX), consistiu em heptanosulfonato de sódio 11mM, ácido fosfórico 16,5mM e acetonitrila 11,5 % (v/v), e pH 7,1. O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição de 15 minutos.

Para as análises de saxitoxina totais, padrões dos análogos das Gonyautoxinas (GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4 e GTX-5) e três saxitoxinas, neosaxitoxina (NeoSTX), decarbamoylsaxitoxina (DcSTX), além do padrão da saxitoxina (STX) foram utilizados. Todas as análises, os padrões, assim como o controle (fase móvel e ácido clorídrico 0,05 N), foram realizadas em triplicatas.

A concentração final de cada amostra foi determinada pelo total de cada variante, levando em conta sua toxicidade relativa, obtendo-se, então a concentração total de STX equivalentes. Os padrões, material de referência certificados, foram obtidos da *National Research Council Canadá (NRC)*.

## **2.4. Produtividade primária**

A produtividade primária das duas cepas foi avaliada através de curvas de fotossíntese vs. irradiância (P-I), com as cepas aclimatadas nas condições gerais de cultivo. Foi utilizada uma incubadora com água circulante na temperatura de  $25 \pm 2$  °C, e com uma fonte luminosa, obtida através de uma lâmpada de halogênio de 1500 W. Os cultivos, de ambas as cepas, foram distribuídos em 13 frascos DBO, de borosilicato, de 300 mL cada. Os frascos foram colocados em fileiras, a partir da fonte luminosa, gerando um gradiente de luminosidade. O último frasco

foi coberto com papel alumínio, para se obter uma condição de escuro, sendo este, utilizado para determinar a respiração (R) da cultura.

A irradiância foi medida atrás de cada frasco utilizando um sensor quântico subaquático (Li-Cor LI-192SA), previamente calibrado, conectado a uma unidade datalogger LI-1400. O enfileiramento dos frascos de DBO, determinou um gradiente de luz variando de 26 a 1650  $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  em todas as incubações. Os experimentos tiveram duração de 1,5 h, e a produtividade foi calculada a partir dos valores de oxigênio dissolvido medidos no início e final de cada incubação, através de um oxímetro digital devidamente calibrado. A produção primária bruta foi obtida pela soma dos valores da produção primária líquida e da respiração, sendo os dados normalizados pela concentração de clorofila-a ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Os valores de produtividade foram expressos em  $\text{mgO}_2.\text{mgChla}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

As curvas P-I foram ajustadas usando o software Kaleida Graph Versão 4.0, de acordo com a equação 2 (Platt et al., 1980):

$$P = P_{max} \times \left(1 - e^{-\frac{\alpha \times PAR}{P_{max}}}\right) \times e^{-\frac{\beta \times PAR}{P_{max}}}, \quad (2)$$

Onde,  $P$  é a produção primária bruta;  $P_{max}$  é a taxa fotossintética máxima;  $\alpha$  é a inclinação da curva P-I limitada por luz;  $\beta$  é o parâmetro fotossintético da regulação negativa da fotossíntese. Esses parâmetros foram utilizados para o cálculo da irradiância de saturação da fotossíntese ( $Ek$ ), intensidade ótima de luz ( $I_{opt}$ ), e ponto de compensação luminosa ( $Ic$ ), de acordo com as seguintes equações3 (Hanley, 1993):

$$Ek = \frac{P_{max}}{\alpha}, I_{opt} = \frac{P}{\alpha} \ln\left(\frac{\alpha + \beta}{\beta}\right), Ic = \frac{-Rd}{\alpha}, \quad (3)$$

Onde  $Rd$  é a respiração no escuro.

## 2.5. Experimento 1: Capacidade de aclimação de *C. raciborskii* a níveis baixos e altos de luz

O efeito de baixas e altas intensidades luminosas no aparato fotossintético das cepas de *C. raciborskii* foi avaliado pela exposição das duas cepas a intensidades luminosas de 40  $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e 200  $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . O experimento foi realizado em triplicatas e teve duração de 10 dias. Foram analisadas a concentração de clorofila-a,

medidas citométricas e respostas fotossintéticas através da fluorescência da clorofila-a.

Amostras foram retiradas no início e no final do experimento para a determinação do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) de acordo com a metodologia descrita por Hillebrand et al. (1999). E a concentração de clorofila-a ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) foi determinada fluorimetricamente de acordo com Arar & Colins (1997).

Medidas de fluorescência foram realizadas utilizando um fluorímetro de pulso de amplitude modulada (Water-PAM, Walz, Germany). As amostras foram submetidas a uma luz actínica de  $480 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , e pulsos de saturação foram aplicados para obtenção dos valores da fluorescência máxima na luz,  $F_m'$ . As amostras foram então aclimatadas no escuro por 10 min e expostas a uma luz de saturação para estimar a fluorescência,  $F_m$ , e o rendimento quântico máximo da conversão da energia fotossintética no PSII ( $F_v/F_m$ ) foi calculado. A dissipação de energia não-fotoquímica (NPQ) foi calculada utilizando a equação 4 (Bilger & Björkman, 1990):

$$NPQ = \frac{(F_m - F_m')}{F_m'} \quad (4)$$

## 2.6. Experimento 2: Influência de diferentes temperaturas e razões N:P na taxa de crescimento de *C. raciborskii*

Com o objetivo de se verificar o efeito da temperatura e da razão N:P no crescimento das duas cepas, foi realizado um experimento fatorial, utilizando uma mesa de gradiente. Foram testadas três temperaturas 17 °C, 22 °C e 28 °C, e três razões N:P, 4,5:1, 10:1 e 40:1.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e tiveram duração de 10 dias. A fluorescência da clorofila-a, expressa em unidade bruta de fluorescência (RFU) e a densidade óptica (OD) a 750 nm foram medidas a cada três dias, através de um fluorímetro (Turner, Aquafluor) e um espectrofotômetro (Biospectro, SP-220), respectivamente.

As curvas de crescimento foram geradas a partir dos valores de  $OD_{750}$  e as fases exponenciais foram identificadas para o cálculo das taxas de crescimento específico ( $\mu$ ) de acordo com a equação 5:

$$\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1} \quad (5)$$

Onde  $OD_1$  é a densidade óptica da cultura no início da fase exponencial,  $OD_2$  é a densidade óptica da cultura no final da fase exponencial,  $t_1$  e  $t_2$  são, respectivamente, os tempos de início e final (dias) da fase exponencial.

## **2.7. Análises estatísticas**

Para as comparações entre as respostas paramétricas das duas cepas, foi utilizado o teste-*t*, a fim de se avaliar as diferenças entre o comprimento, largura e o volume dos tricomas, assim como os dados da produtividade primária. Com relação ao experimento 1, foi utilizada a análise de variância ANOVA bi-fatorial para avaliar a influência dos fatores luz e cepa. E em relação ao experimento 2, a análise de variância ANOVA tri-fatorial foi utilizada para verificar a influência da cepa, temperatura e disponibilidade de nutrientes na concentração de clorofila-a e nas taxas de crescimento. A comparação pelo teste *post hoc* de Tuckey HSD foi utilizada quando necessário ( $P < 0.05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software Statistica 6.0.

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização morfológica e identificação molecular

Ambas as cepas apresentaram tricomas não constrictos ou levemente constrictos, extremidades levemente acuminadas e a presença de inúmeros aerótopos. Os heterocitos são cônicos e terminais, aparecendo em uma ou nas duas extremidades dos tricomas (Figura 1). Entretanto, os tricomas das duas cepas diferem quanto à forma, comprimento e volume. A cepa LP1 possui tricomas retos, enquanto a cepa LP2 apresenta tricomas ligeiramente curvados, com comprimento ( $p < 0,0001$ ) e volume ( $p = 0,01$ ) significativamente maiores que a cepa LP1 (Tabela 1). Em relação à largura, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1. Dados da morfologia das duas cepas de *C. raciborskii*, LP1 e LP2, isoladas da Lagoa do Peri e mantidas em laboratório nas condições gerais de cultivo (média  $\pm$  desvio padrão, n=30).**

<b>Morfologia</b>	<b>LP1</b>	<b>PL2</b>
Filamento	Reto	Curvados
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	71,75 $\pm$ 16,87	356,5 $\pm$ 127,78
Largura ( $\mu\text{m}$ )	4,15 $\pm$ 1,15	3,3 $\pm$ 1,03
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	1.111,68 $\pm$ 627,39	3.162,89 $\pm$ 1.635,84

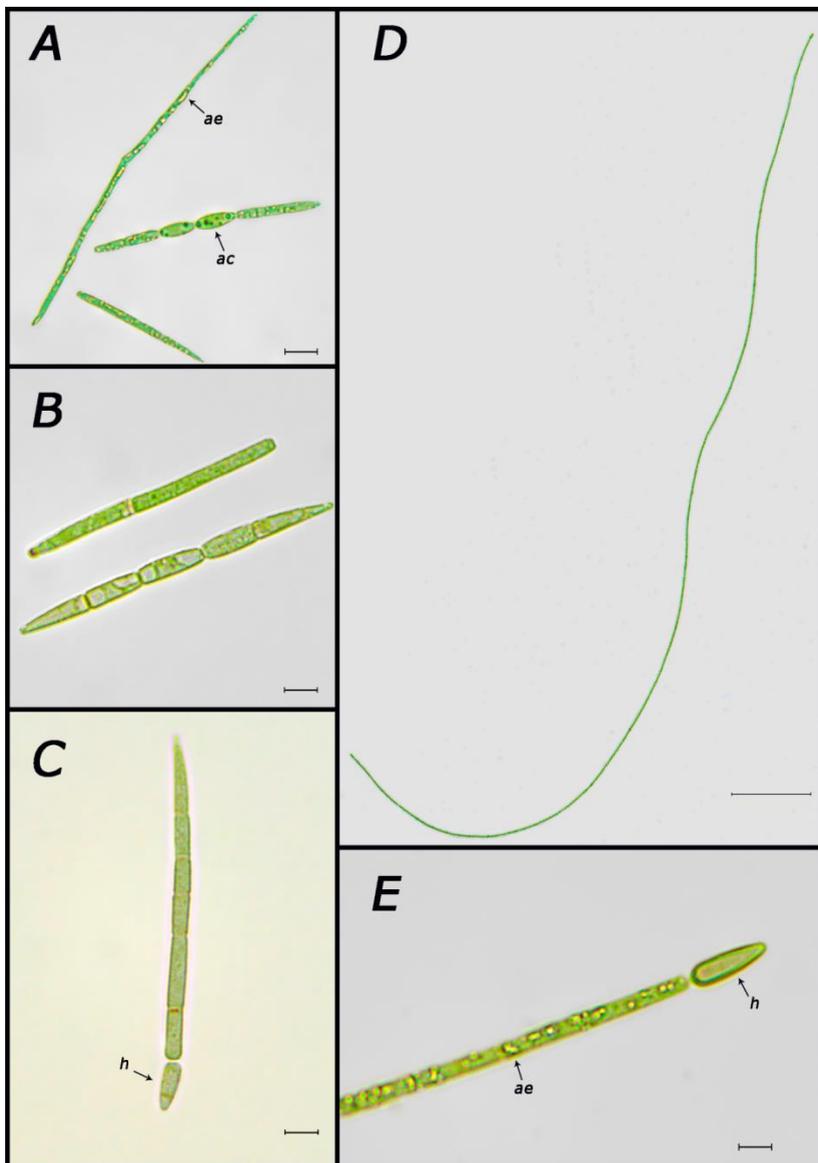


Figura 1. . Fotomicrografias mostrando as diferenças na morfologia das duas cepas de *C. raciborskii* (A, B e C) LP1, (D e E) LP2. Células vegetativas, tricomas com aerótopos (a), acinetos (ac) e heterocitos terminais (h). A, B, C, E as barras representam 5  $\mu\text{m}$  e D, 100  $\mu\text{m}$ .

A amplificação e o sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou 100% de identidade de ambas as cepas com *C. raciborskii* (Woloszynska, 1912) Seenayya and Subba Raju (1972). Os números de acesso são: KX961611 (LP1) e KX961612 (LP2).

### 3.2. Análises de toxinas

As concentrações de toxinas de ambas as cepas estão apresentadas na Tabela 2. A cepa LP2 apresentou um potencial tóxico maior que a cepa LP1, uma vez que a cepa LP2 apresentou uma maior quantidade de toxinas ([total] STX eq. =31,025  $\mu\text{g. L}^{-1}$ ) que a cepa LP1 ([total] STX eq. =18,768  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). A mesma diferença foi observada em relação à variedade de análogos, enquanto a cepa LP1 apresentou os análogos GTX-4 e GTX-5, na cepa LP2 quatro análogos adicionais foram observados (GTX-3, GTX-2, dc-STX e STX) (Tabela 2).

**Tabela 2. Variantes da saxitoxina observadas nas cepas de *C. raciborskii* LP1 e LP2 ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ ) mantidas nas condições gerais de cultivo. GTX: goniautoxinas, STX: saxitoxina, dcSTX: decarbamoilsaxitoxina.**

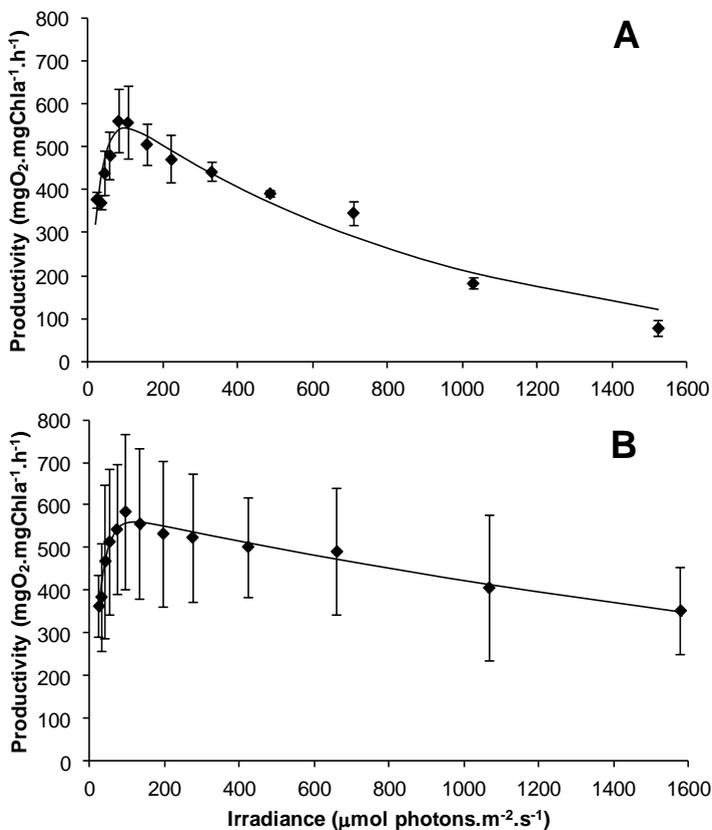
Análogos	LP1 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LP2 ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )
GTX-4	25,474	8,411
GTX-5	4,211	0,783
GTX-3	-	6,011
GTX-2	-	5,739
dcSTX	-	6,103
STX	-	15,830
[STX equivalentes]	18,768	31,025

### 3.3. Produtividade primária

As curvas P-I obtidas a partir dos experimentos de produtividade primária estão mostradas na Figura 2, e os parâmetros obtidos através dos ajustes das curvas estão apresentados na Tabela 3. A concentração inicial de clorofila-a nos experimentos com a cepa LP1 variou entre 0,51  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 0,88  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , e nos experimentos com a cepa LP2 de 0,68  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 0,74  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

As curvas P-I mostraram diferenças significativas para os parâmetros  $\beta$  ( $p = 0,012$ ), indicativo de regulação negativa da

fotossíntese, com os menores valores observados na cepa LP2. Os valores de intensidade de compensação luminosa ( $I_c$ ) ( $p = 0,011$ ) foram maiores na cepa LP1 que na cepa LP2. Não sendo observadas diferenças significativas entre as duas cepas para os valores de  $P_{max}$  ( $p = 0,66$ ),  $\alpha$  ( $p = 0,49$ ),  $I_{opt}$  ( $p = 0,06$ ) e  $E_k$  ( $p = 0,259$ ).



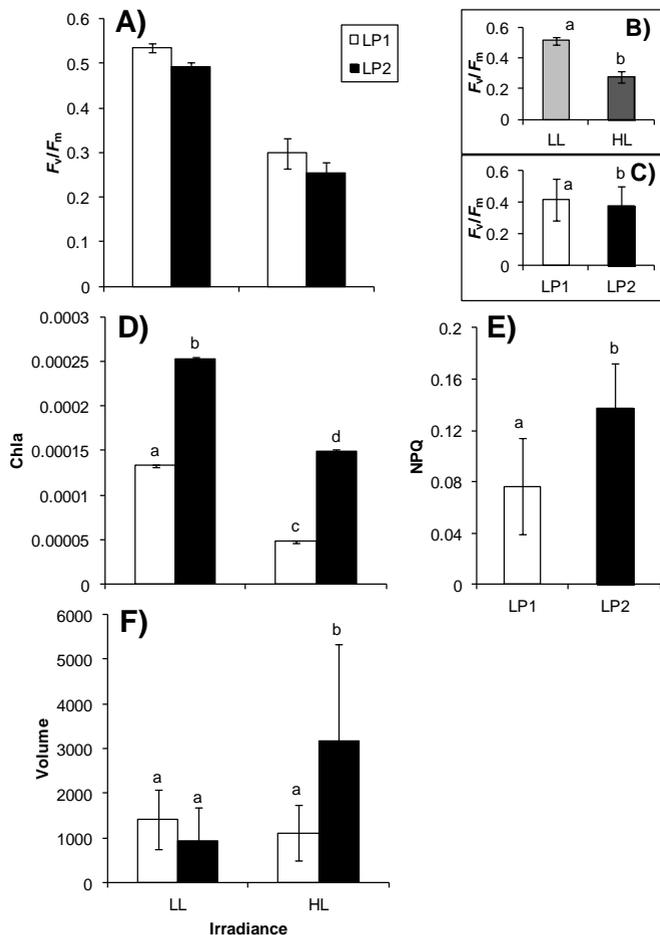
**Figura 2.** Curvas de fotossíntese *vs* irradiância ( $P$ - $I$ ) obtidas após o ajuste dos dados experimentais com o software Kaleida Graph, utilizando a equação de Platt et al. (1980). (A) cepa LP1 e (B) cepa LP2.



As cepas apresentaram variações no rendimento quântico máximo da fotossíntese ( $F_v/F_m$ , Figura 3A), embora estes, foram determinados separadamente pelos fatores luz e cepa. Valores maiores de  $F_v/F_m$  foram registrados para as cepas expostas a alta intensidade luminosa ( $0,51 \pm 0,02$ ) em comparação com as amostras de baixa intensidade luminosa (Figura 3B). A mesma situação foi observada com a cepa LP1, apresentando maior potencial fotossintético que a cepa LP2 (Figura 3C).

A concentração de clorofila-a de *C. raciborskii* foi afetada pela interação entre os fatores disponibilidade de luz e cepa (Tabela 4). A maior concentração de clorofila foi registrada na cepa LP2 quando mantida em baixa intensidade luminosa (Figura 3D). Além da grande quantidade de pigmentos, a cepa LP2 foi capaz de dissipar melhor o excesso de energia através da dissipação não-fotoquímica (NPQ) que a cepa LP1 (Figura 3E). Este parâmetro foi influenciado apenas pelo fator cepa (Tabela 4).

A aclimação das duas cepas de *C. raciborskii* a alta e a baixa intensidade luminosa resultou também em alteração do volume celular, induzidos pelos fatores disponibilidade de luz e cepa (Tabela 4). A cepa LP2 apresentou tricomas mais longos, com volumes maiores que a cepa LP1, porém, somente foi observado quando mantidas em alta intensidade luminosa (Figura 3F).



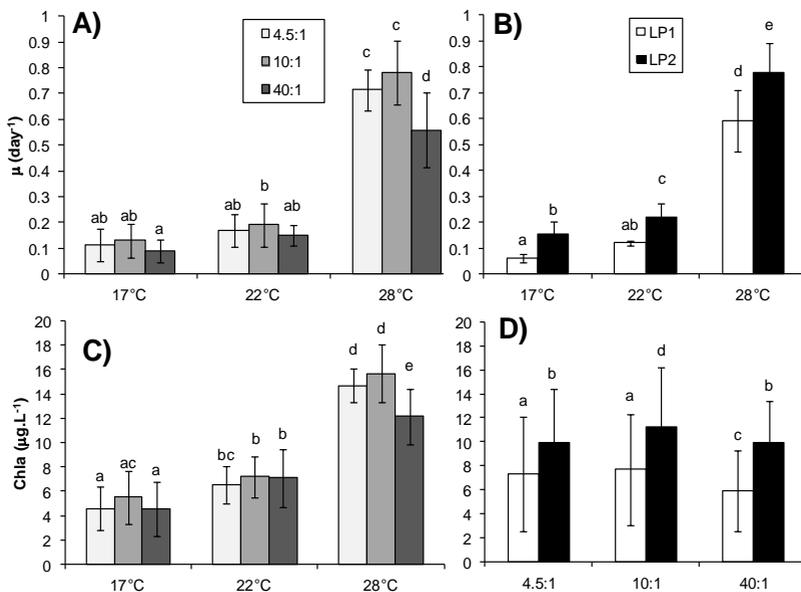
**Figura 3.** Experimento de fotoaclimação com as duas cepas de *C. raciborskii*, LP1 e LP2, cultivadas em duas irradiâncias: alta luz, HL ( $200 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e baixa luz, LL ( $40 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A.  $F_v/F_m$ , rendimento quântico máximo da fotossíntese. B e C. Dados conjuntos de  $F_v/F_m$  de acordo com a ANOVA (tabela 4). D. Concentração de clorofila-a ( $\mu\text{g}.\mu\text{m}^{-3}$ ). E. dissipação de energia não-fotoquímica (NPQ). F. Volumes celulares. Barras verticais indicam o desvio padrão de três réplicas.

### 3.5. Experimento 2: Influência de diferentes temperaturas e razões N:P na taxa de crescimento de *C. raciborskii*

Quando submetida a diferentes condições de nutrientes e diferentes temperaturas, houve interação desses fatores com a taxa de crescimento e a concentração de clorofila-a (Tabela 5). Para as taxas de crescimento, duas duplas interações foram significativas, considerando cepa e temperatura, e entre temperatura e razões N:P. *C. raciborskii* apresentou as maiores taxas de crescimento quando cultivada em 28°C e nas razões N:P 4,5 ou 10:1 (Figura 4A). Da mesma forma, a cepa LP2 sempre apresentou maiores taxas de crescimento em comparação com a cepa LP1, sendo as maiores observadas na temperatura de 28°C (Figura 4B). Uma tendência similar foi observada para a concentração de clorofila-a, com os maiores valores observados nas amostras mantidas a 28°C, e quando cultivadas nas razões N:P 4,5 ou 10:1 (Figura 4C). A cepa LP2 também apresentou maior concentração de clorofila-a, em relação à cepa LP1, em todas as condições de nutrientes testadas (Figura 4D).

**Tabela 5. Resumo dos resultados da ANOVA das respostas fisiológicas das duas cepas de *C. raciborskii* cultivadas em três temperaturas (17 °C, 22 °C and 28 °C) e três diferentes condições nutricionais (razões N:P, 4,5:1, 10:1, 40:1). Cepas, Temperaturas e razões N:P isolados e a interação dos fatores foram as fontes de variação. Parâmetros avaliados: taxas de crescimento e concentração de clorofila-a (Chl-a). Respostas significativas estão marcadas em negrito. N=3.**

	Taxas de crescimento			Chl-a	
	df	F	p	F	p
Cepa (1)	1	113,606	0,000	272,731	0,000
Temperatura (2)	2	941,098	0,000	754,147	0,000
Razão N:P (3)	2	24,780	0,000	18,856	0,000
(1)*(2)	2	<b>6,760</b>	<b>0,003</b>	0,524	0,597
(1)*(3)	2	0,854	0,434	<b>4,459</b>	<b>0,019</b>
(2)*(3)	4	<b>9,375</b>	<b>0,000</b>	<b>10,409</b>	<b>0,000</b>
(1)*(2)*(3)	4	1,725	0,166	0,555	0,697
Residuo	36				



**Figura 4.** Taxas de crescimento ( $\mu$ .d<sup>-1</sup>) determinadas pelo aumento da densidade óptica (OD) em 750 nm e concentração de clorofila-a das duas cepas de *C. raciborskii* (LP1 e LP2) nas três temperaturas, 17 °C, 22 °C e 28 °C e três razões N:P, 4,5:1, 10:1, 40:1 testadas. A. Resultados da interação das taxas de crescimento, considerando os fatores significativos temperatura e disponibilidade de nutrientes; B. Resultados da interação das taxas de crescimento considerando os fatores significativos temperatura e cepa; C. Resultados da interação da concentração de clorofila-a considerando os fatores significativos temperatura e disponibilidade de nutrientes; D. Resultados da interação da concentração de clorofila-a considerando os fatores significativos cepa e disponibilidade de nutrientes. Para detalhes dos fatores significativos, veja a Tabela 5. Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

#### 4. Discussão

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que as duas cepas, LP1 e LP2, apresentam 100% de identidade nas sequências parciais do gene 16S rRNA, entretanto, apresentam características morfológicas, ecofisiológicas e toxicológicas distintas. *C. raciborskii* é conhecida por apresentar uma alta variabilidade morfológica tanto em condições naturais como em laboratório (Padisák, 1997; Komárková, 1998; Komárková et al., 1999). Em um estudo realizado por Komárková et al. (1999), na Lagoa do Peri, foram distinguidas quatro morfologias durante dois anos de estudo, todas apresentaram filamentos retos ou formas mais onduladas como encontrado neste trabalho, não sendo observado nenhum filamento espiralado. Baptista & Nixdorf (2014) também evidenciaram diferentes morfotipos, incluindo a ocorrência de filamentos espiralados, que segundo os autores foram mais evidentes durante períodos secos e frios. Tricomas espiralados já foram observados em outras regiões do Brasil (Bouvy et al., 1999), entretanto, não é a morfologia mais abundante. Na Austrália, Saker et al. (1999) observaram a presença das duas formas co-ocorrendo. Morfologias similares às observadas neste trabalho foram descritas em outras regiões brasileiras (Dyble et al., 2012; Soares et al., 2013; Wojciechowski et al., 2016), no Uruguai (Piccini et al., 2011) e na Europa (Briand et al., 2002; Aster et al., 2010). Diferenças no comprimento e largura dos tricomas já foram observadas na mesma cepa em respostas a variações de temperatura, concentrações de nutrientes e luminosidade (Soares et al., 2013; Rangel et al., 2016; Wojciechowski et al., 2016). Pode-se observar que a cepa LP2 além de maior comprimento, também apresentou maior variação no tamanho dos tricomas. Quando exposta a altas intensidades luminosas e temperaturas, foi observado maior número de tricomas, porém com menor comprimento, e quando exposta a baixas intensidades luminosas ou temperaturas, um menor número de tricomas, com comprimentos maiores, pode ser observado. Essa característica não foi evidenciada na cepa LP1, que mesmo exposta a variações de luz e temperatura, manteve o mesmo comprimento. Segundo Vidal & Kruk (2008), a morfologia parece estar mais relacionada com as condições ambientais locais do que a localização geográfica, entretanto, no presente caso, as cepas são oriundas do mesmo ambiente e foram cultivadas nas mesmas condições. Tal fato sugere que as diferenças morfológicas das cepas LP1 e LP2 tem origem endógena ou relacionada ao período do ano em que foram isoladas, A

cepa LP1 foi isolada no verão, enquanto a cepa LP2 foi isolada durante o período de inverno.

A cepa LP1 apresentou menores taxas de crescimento nos dois extremos de temperaturas testadas, entretanto, ambas as cepas apresentaram crescimento satisfatório nas três temperaturas, 17 °C, 22 °C e 28 °C, sendo as maiores taxas de crescimento e as maiores diferenças entre as cepas observadas na temperatura de 28 °C. Esses dados corroboram com outros trabalhos, onde diferentes cepas de *C. raciborskii* apresentaram uma grande tolerância a variações de temperatura (Briand et al., 2004; Chonudomkul et al., 2004; Soares et al., 2013), sendo capazes de apresentar crescimento líquido positivo em temperaturas variando de 14-17°C (Piccini et al., 2011; Soares et al., 2013) à 35°C (Briand et al., 2004). Entretanto, a temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25.6°C – 32.7°C, segundo modelo proposto por Recknagel et al. (2014). Na Lagoa do Peri, *C. raciborskii* já foi registrada em temperaturas de 14.6°C, no período de inverno, contribuindo em cerca de 50% do fitoplâncton total, até a temperatura de 29°C, durante o verão, com contribuição de até 90% na comunidade fitoplanctônica, segundo dados de Silveira et al. (2013). A temperatura parece ser um dos fatores mais influentes na dominância de *C. raciborskii*, e conseqüentemente, populações perenes podem persistir durante todo o ano em lagos brasileiros (Bouvy et al., 1999; Komárková et al., 1999).

A concentração relativa de nitrogênio e fósforo dissolvidos na água (razão N:P) influencia diferentemente a fisiologia e o crescimento do fitoplâncton, sendo um parâmetro determinante da biomassa e composição de espécies. Segundo Guildford & Hencky (2000), razões molares de N:P superiores a 22,5, indicam ambientes limitados por P, enquanto razões inferiores a 22,5, indicam ambientes limitados por N, ainda que diferentes espécies tenham exigências ou adaptações específicas em relação a esses dois nutrientes. Nossos resultados mostraram que as duas cepas de *C. raciborskii* isoladas da Lagoa do Peri, apresentaram crescimento nas três razões N:P testadas, 4,5:1, 10:1, e 40:1, o que caracteriza habilidade de crescimento de ambas as cepas em condições de limitação dos dois nutrientes. Entretanto, houve diferença significativa na razão 40:1, na temperatura de 28°C, aonde a cepa LP1 apresentou menor taxa de crescimento que a LP2, sugerindo que em condições de limitação relativa de P, a cepa LP2 teria mais condições de prevalecer na lagoa. Resultados semelhantes foram observados em um trabalho realizado por Chisloch et al. (2014), onde *C. raciborskii* apresentou habilidade de dominar em razões N:P muito

baixas (7:1) e também muito altas (122:1). *C. raciborskii* apresenta uma maior vantagem competitiva com relação ao uso do fósforo, devido à sua alta afinidade de absorção (Wu et al., 2009) e alta capacidade de armazenamento de P (Istvánovics et al., 2000). Adicionalmente, tem habilidade de usar diferentes fontes de fósforo para suportar seu crescimento quando este se encontra limitado (Bai et al., 2014), o que a possibilita tolerar ambientes com baixa disponibilidade deste nutriente. Esses dados estão de acordo com o que acontece na Lagoa do Peri, visto que, segundo Henneman & Petrucio (2011), a Lagoa do Peri é fortemente limitada por P, durante grande parte do ano. Segundo Silveira (2013) a concentração de fósforo total variou de 10  $\mu\text{g. L}^{-1}$  a 44  $\mu\text{g. L}^{-1}$ , e a concentração de nitrogênio total variou de 254,5  $\mu\text{g. L}^{-1}$  a 1367,4  $\mu\text{g. L}^{-1}$ , não havendo diferenças entre as concentrações observadas na superfície e no fundo na grande maioria das amostras. Este também é um dado que chama atenção de pesquisadores, uma vez que a Lagoa do Peri é o único ambiente limitado por P, no qual *C. raciborskii* consegue dominar por longos períodos (Tonetta et al., 2015). Diferenças entre cepas isoladas da mesma região quanto ao requerimento de fósforo já foram descritas por Piccini et al. (2011). Segundo esses autores, alguns ecótipos são capazes de otimizar seu crescimento através de adaptações nos sistemas de captura de fósforo como já foi observado em outras espécies de cianobactérias que dominam a comunidade fitoplanctônica (Aubriot et al., 2012).

Analisando os dados das curvas P-I verificou-se que as duas cepas não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) nos valores de produtividade ( $P_{max}$ ), eficiência fotossintética ( $\alpha$ ) e nos valores de irradiância ótima ( $I_{opt}$ ) e de saturação da luz ( $I_k$ ), entretanto, apresentaram diferenças quando comparadas a irradiância de compensação ( $I_c$ ) e a fotoinibição ( $\beta$ ). A eficiência fotossintética ( $\alpha$ ) apresentou valores maiores (20-24  $\text{mgO}_2.\text{mgChla}^{-1}.\text{h}^{-1}.\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) do que os valores encontrados na literatura para a mesma espécie. Esta maior inclinação inicial da curva P-I, pode estar relacionada à aclimatação da cepa em laboratório, uma vez que as condições não são exatamente iguais às encontradas no ambiente natural. Células cultivadas por longos períodos em baixas intensidades luminosas podem apresentar maiores valores de  $\alpha$  (Kana & Glibert, 1987), obtendo alta produtividade em intensidades luminosas muito baixas, bem como maior suscetibilidade a fotoinibição (Platt et al., 1980; O'Brien et al., 2009).

Os valores de  $I_k$  foram similares aos encontrados em outros isolados de *C. raciborskii*, variando em torno de 15-26  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

$^2.s^{-1}$  (Padisák & Reynolds, 1998; Shakif et al., 2001; Briand et al., 2004; Wu et al., 2009), indicando serem cepas com baixo requerimento de luz para fotossíntese (Padisák & Reynolds, 1998). Pode-se observar que a cepa LP1, apresentou maior valor do parâmetro  $\beta$ , que a cepa LP2, sugerindo que a cepa LP2, possui uma maior capacidade de tolerar altas intensidades luminosas. Briand et al. (2004), mostrou que *C. raciborskii* consegue tolerar intensidades superiores a  $500 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.s^{-1}$ , e Wu et al. (2009), utilizando uma cepa de um lago subtropical na China, também observou elevado crescimento em baixas intensidades luminosas, porém, tolerância a intensidades superiores à  $900 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.s^{-1}$ . Entretanto, a fotoinibição observada na cepa LP1, pode ser efeito da limitação de carbono no meio e conseqüentemente a queda da produtividade bruta, do que um dano propriamente dito causado no aparato fotossintético. Devido à tolerância a intensidades luminosas mais altas, optou-se por caracterizar as duas cepas quando expostas à intensidades em torno de  $200 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.s^{-1}$  e  $40 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.s^{-1}$ . O aumento do volume celular observado na cepa LP2, já foi evidenciado em cepas de *C. raciborskii* submetidas a baixas intensidades luminosas, e pode ser considerado uma conseqüência da sua baixa taxa de crescimento, como foi observado por Pierangelini et al. (2015). Ambas as cepas apresentaram maiores concentrações celulares de clorofila-a quando expostas a baixas intensidades luminosas, que pode estar relacionada a um mecanismo de aclimação, promovendo à célula um aumento da habilidade em capturar a energia luminosa.

De acordo com as análises de fluorescência da clorofila, pode-se observar que ambas as cepas apresentaram valores similares de  $Fv/Fm$  e  $Y(II)$ , o que sugere que apresentam capacidades fotossintéticas similares, entretanto, esses valores diminuem quando expostas a intensidades mais altas. A cepa LP2 apresentou maiores valores de NPQ, sugerindo que possui maior capacidade de fotoproteção que LP1. Entretanto, apesar de que em microalgas o NPQ está relacionado a mecanismos de fotoproteção, Pierangelini et al. (2014), especulam que em *C. raciborskii*, NPQ provavelmente está relacionado à diferenças no estado redox da cadeia de transporte de elétrons induzido pela diferença na composição e excitação dos diferentes pigmentos. Neste trabalho não foram avaliadas a composição e concentração dos outros pigmentos fotossintéticos, entretanto, já ficou evidente a diferença na concentração celular de clorofila a entre as duas cepas.

Os valores de  $I_{opt}$  em torno de  $105 \pm 10,31 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.s^{-1}$  para a cepa LP1 e  $121 \pm 3,88 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.s^{-1}$  para a cepa LP2,

considerados relativamente altos, bem como os valores baixos de *Ik*, podem proporcionar às duas cepas vantagem competitiva sobre outras espécies. Na Lagoa do Peri, um sistema caracterizado por limitação de luz e por constante mistura da água (Hennemann & Petrucio, 2011; Baptista & Nixdorf, 2014), seu crescimento líquido positivo em uma ampla gama de intensidades luminosas, pode ser um dos fatores que favorecem sua dominância sobre as outras espécies de cianobactérias.

Foi confirmada a produção de saxitoxina nas duas cepas, assim como já foi descrito para outras cepas brasileiras de *C. raciborskii* (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Bernard, 2003; Pomatti et al., 2003). Entretanto, também foram observadas diferenças entre as duas cepas quanto o perfil e a concentração das variantes da saxitoxina, mesmo quando mantidas sob as mesmas condições de cultivo, caracterizando a cepa LP2 como mais tóxica. Diferenças no grupamento gênico responsável pela biossíntese da saxitoxina, também foram observadas (dados não publicados). Esses são os primeiros dados de perfil de toxinas em cepas isoladas da Lagoa do Peri. Até então, só havia dados de amostras de água da Lagoa realizados por Grellmann (2006), onde foram detectados NeoSXT, GTX3 e GTX5. Em isolados brasileiros, já foram detectados GTX-2, GTX-3, GTX-5, GTX-6, STX, NeoSTX, dcSTX, dcNeoSTX (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Ferrão-Filho et al., 2007; Soto-Liebe et al., 2010; Hoff-Risetti et al., 2013). Diferenças na concentração de toxinas observadas nas diferentes cepas podem estar relacionadas com o tempo e condições de cultivo, diferenças na expressão e regulação dos genes relacionados com a biossíntese, bem como o emprego de diferentes técnicas analíticas de detecção. Recentemente Brentano et al. (2016) relacionou a variação da concentração de STX na Lagoa do Peri com fatores abióticos, e segundo esses autores, a condutividade e a concentração de nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN) proporcionaram o maior poder explicativo para a concentração de STX *in situ*, entretanto, não especificaram o perfil de toxinas, apenas a concentração de STX foi analisada.

De acordo com a identificação a partir do gene 16S rRNA, podemos afirmar que as duas cepas isoladas da Lagoa do Peri correspondem a mesma espécie, *C. raciborskii*, e as diferenças morfológicas e ecofisiológicas observadas podem sugerir a seleção de diferentes ecótipos, originados em respostas às variações ambientais existentes neste lago subtropical. Essas características permitem que a *C. raciborskii* se mantenha dominante na comunidade fitoplancônica da lagoa do Peri, durante praticamente o ano todo, intercalando na contribuição de biomassa total, conforme suas preferências e tolerâncias

ambientais. Piccini et al. (2011), também observaram diferenças morfológicas e ecofisiológicas em dois isolados no Uruguai, sugerindo a seleção de ecótipos e de acordo com as análises filogenéticas, uma recente dispersão das cepas brasileiras e uruguaias. Segundo Chonudomkul et al. (2004), *C. raciborskii* não é apenas uma espécie em contínua invasão, mas também uma espécie com cepas ou ecótipos com diferentes tolerâncias fisiológicas. Diferenças ecofisiológicas relacionadas com aclimação das cepas devido ao tempo de cultivo, dez anos da cepa LP1 e três anos da cepa LP2, foram descartadas, uma vez que comparadas com a cepa *C. raciborskii* T3, a qual está mantida em cultivo a mais tempo que a cepa LP1, apresentou características semelhantes à cepa LP2 (dados não apresentados).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que as diferenças observadas na morfologia, taxas de crescimento em diferentes temperaturas e condições de nutrientes, diferenças no requerimento de luz, bem como na produção de toxinas nas duas cepas isoladas da Lagoa do Peri, são resultado da adaptação de determinados morfotipos às variações das condições ambientais existentes nesta lagoa. Esses resultados contribuem para um melhor entendimento dos fatores que levam à dominância desta espécie por longos períodos, e trabalhos futuros avaliando respostas fisiológicas, expressão e regulação dos genes relacionados com a biossíntese da saxitoxina, serão importantes no monitoramento da espécie e das concentrações de toxinas na Lagoa do Peri, importante manancial de água potável da Ilha de Santa Catarina.

## Referências

- Alster, A., Kaplan-Levy, R.N., Sukenik, A., Zohary, T., 2010. Morphology and phylogeny of a non-toxic invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* from a Mediterranean lake. *Hydrobiologia*. 639, 115–38.
- Arar, E.J., Collins, G.B., 1997. “In vitro” determination of Chlorophyll a and Pheophytina in marine and freshwater phytoplankton by fluorescence. EPA, Cincinnati. (EPA metod 445.0)
- Aubriot, L., Bonilla, S., 2012. Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology* 67, 251-263.
- Bai, F., Liu, R., Yang, Y., Ran, X., Shi, J., Wu, Z., 2014. Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*. 39, 112-120.
- Bailey, S., Grossman, A., 2008. Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. *Photochem Photobiol*. 84, 1410–1420.
- Baptista, M.G., Nixdorf, B., 2014. Low disturbances favor steady state: Case of cyanobacterial monodominance in a Brazilian coastal lagoon. *Inland Waters*. 4, 243-254.
- Bentley, R. 1990. The shilimate pathway. A metabolic tree with many branches. *Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 307-384.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., Gonzáles-Piña, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lüring, M., Antoniadis, D., Padisák, J., Kruk, C., 2011. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology*. 79, 594-607.
- Bouvy, M., Molica, R.J.R., De Oliveira, S., Marinho, M., Beker, B., 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast Brazil. *Aquatic Microbiol Ecology*. 20, 285–297.
- Brentano, D.M., Giehl, E.L.H., Petrucio, M.M., 2016. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae*. 56, 22-28.

- Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J.F., Bernanrd, C., Dufour, P., 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycology*. 40, 231-238.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F., Coute, A. 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Wat.Res.* 36, 3183–3192.
- Burford, M.A., O’Donohue, M.J., 2006. A comparison of phytoplankton community assemblages in artificially and naturally mixed subtropical water reservoirs. *Freshwater Biology*. 51, 973–982.
- Chislock, M.F., Sharp, K.L., Wilson, A.E., 2014. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. *Water Research*. 49, 207-214.
- Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology*. 48, 345–355.
- Dyble, J., Paerl, H.W., Neilan, B.A., 2002. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifh* and *cpba-igs* nucleotide sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 2567-2571.
- Ferrão Filho, A.S., da Costa, S.M., Ribeiro, M.G.L., Azevedo, M.F.O., 2008. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*. 23, 161–168.
- Figueredo, C.C., Giani, A., Bird, D.F., 2007. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *J. Phycology*. 43, 256–265.
- Gomes, A.M.A., Marinho, M.M., Azevedo, S.M.F.O., 2013. Which factors are related to the success of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Brazilian Aquatic Systems? In: Ferrão-Filho AS. (ed.) *Cyanobacteria: ecology, Toxicology and Management*. New York, Nova Science Publishers Inc. p. 73-94.

- Grellmann, C., 2006. Aspectos da morfologia e da ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et SubbaRaju e da produção de cianotoxinas na Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil. Msc Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.
- Guildford, S.J., Hecky, R.E., 2000. Total nitrogen, total phosphorus, and nutrient limitation in lakes and oceans: Is there a common relationship? *Limnology and Oceanography*. 45, 1213-1223.
- Givnish, T.J., 1988. Adaptation to sun and shade: A whole-plant perspective. *Australian J. of Plant Physiol.* 15, 63-92.
- Henley, W.J., 1993. On the measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.* 35, 729-39.
- Hennemann, M.C., Petrucio, M.M., 2010. Seasonal phytoplankton response to increased temperature and phosphorus inputs in a freshwater coastal lagoon, Southern Brazil: a microcosm bioassay. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 22, 295-305.
- Hennemann, M.C., Petrucio, M.M., 2011. Spatial and temporal dynamic of trophic relevant parameters in a subtropical coastal lagoon in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*. 181, 347-361.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*. 35, 403-424
- Istvaánovics, V., Shafik, H.M., Présing, M., Juhos, S., 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology*. 43, 257-275.
- Kana, T.M., Glibert, P.M., 1987. Effect of irradiances up to 2000  $\text{mEm}^{-2}\text{s}^{-1}$  on marine *Synechococcus* WH7803-I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep-Sea Research*. 34, 479-495.
- Komárek, J., Komárková, J., 2003. Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales); review 2002. *Czech Phycology*. 3, 1 - 30
- Komárková, J., Laudares-Silva, R., Senna, P.A.C., 1999. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. *Algalogical Studies*. 94, 207-222.

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

Laudares-Silva, R., 1999. Aspectos limnológicos, variabilidade espacial e temporal na estrutura da comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, Santa Catarina, Brasil. PhD Thesis, Universidade Federal de São Carlos, Brazil.

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

Neilan, B.A., Jacobs, D., Dot, T.D., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T., Goodman, A.E., 1997. rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 693-697.

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

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

Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941-7942.

Padisák, J., Reynolds, C.S., 1998. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. *Hydrobiologia*. 384, 41-53.

Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archives of Hydrobiology Supplement*. 107, 563-593.

- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., Gonzáles-Piana, M., Giand, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S., 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*. 10, 644–653.
- Pierangelini, M., Stojkovic, S., Orr, P.T., Beardall, J., 2014. Photosynthetic characteristics of two *Cylindrospermopsis raciborskii* strains differing in their toxicity. *Journal of Phycology*. 50, 292–302.
- Pierangelini, M., Stojkovic, S., Orr, P.T., Beardall, J., 2015. Photo-acclimation to low light—Changes from growth to antenna size in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*. 46, 11–17.
- Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G., 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*. 38, 687–701.
- Pomati, F., Neilan, B.A., Suzuki, T., Manarolla, G., Rossetti, C., 2003. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *Journal of Phycology*. 39, 535–542.
- Rangel, L.M., Ger, K.A., Silva, L.H.S., Soares, M.C.S., Faassen, E.J., Lüring, M., 2016. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Microbiology of Aquatic Systems*. 71, 835–844.
- Recknagel, F., Orr, P.T., Cao, H., 2014. Inductive reasoning and forecasting of population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* in three sub-tropical reservoirs by evolutionary computation. *Harmful Algae*. 31, 26–34.
- Reynolds, C.S., 2006. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Rourke, W.A., Murphy, C.J., Pitcher, G., Van de Riet, J.M., Burns, B.G., Thomas, K.M., Quilliam, M.A., 2008. *JAOAC Int*. 91, 589–597.
- Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2001. Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju from a north Queensland domestic water supply. *Marine and Freshwater Research*. 52, 907–915.

Saker, M.L., Neilan, B.A., Griffiths, D.J., 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *Journal of Phycology*. 35, 599-606.

Shafik, H.M., Herodek, M., Présing, M., Vörös, L., 2001. Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju. *Archiv fuer Hydrobiologie Supplement band. Algological Studies*. 103, 75-94.

Silveira, M.H., 2013. Estrutura e dinâmica do fitoplâncton e fatores direcionadores da dominância anual de cianobactérias em uma lagoa rasa subtropical (lagoa do Peri, SC). Msc Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.

Soares, M.C., Lürling, M., Panosso, R., Huszar, V., 2009. Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life-history characteristics of the grazer *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 1183-1189.

Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Miranda, M.N., Mello, M.M., Roland, F., Lürling, M., 2013a. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*. 717, 1-12.

Soares, M.C.S., Lürling, M., Huszar, V.L.M., 2013b. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Phycological Research*. 61, 61-67.

Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A., Vásquez, M. 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon*. 56, 1350-1361.

Stevens, M., Peigneur, S., Tytgat, J., 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology*. 2, 1-12.

Tonetta, D., Hennemann, M.C., Brentano, D.M., Petrucio, M.M., 2015. Considerations regarding the dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* under low light availability in a low phosphorus lake. *Acta Botanica Brasílica*. 29, 448-451.

- Tonetta, D., Petrucio, M.M, Laudares-Silva, R., 2013. Temporal variation in phytoplankton community in a freshwater coastal lake of southern Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 25, 99-110.
- Tucci, A., Sant'anna, C., 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & SubbaRaju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira Botanica*. 26, 97-112.
- Vidal, L., Kruk, C., 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 3, 142-151.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs*. 8, 2185-2211.
- Wojciechowski, J., Fernandes, L.F., Fonseca, F.V.B., 2016. Morpho-physiological responses of a subtropical strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) to different light intensities. *Acta Botanica Brasilica*. 30, 232-23.
- Wu, Z., Shi, J., Li, R., 2009. Comparative studies on photosynthesis and phosphate metabolism of *Cylindrospermopsis raciborskii* with *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenonflos-aquae*. *Harmful Algae*. 8, 910-915.
- Yunes, J.S., Cunha, N.T., Barros, L.P., Proença, L.A.O., Monserrat, J.M., 2003. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. *Comments on Toxicology*. 9, 103-115.

## Capítulo II - Relação filogenética, expressão gênica e concentração de toxinas em duas cepas produtoras de saxitoxina isoladas da Lagoa do Peri, Florianópolis, Brasil.

### 1. Introdução

*Cylindrospermopsis raciborskii* é uma cianobactéria de água doce, que tem recebido grande atenção de pesquisadores devido ao aumento no número de ocorrências, na última década, em ecossistemas continentais de regiões tropicais, subtropicais e temperadas, e, principalmente pelo seu potencial em produzir toxinas e formar florações (Padisák, 1997).

Esta cianobactéria é uma produtora conhecida de cilindrospermopsina (CYN) e saxitoxina (STX), com o tipo de toxina produzida aparentemente relacionada, em parte, à distribuição geográfica (Sinha et al., 2014). Até o momento, cepas produtoras de CYN foram descritas na Austrália, Ásia e Nova Zelândia (Antunes et al., 2015), e as cepas isoladas da América do Sul, Brasil (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002) e Uruguai (Piccini et al., 2011) foram descritas como produtoras de STX.

A saxitoxina (STX) e seus análogos são uma classe de alcalóides neurotóxicos, que atuam bloqueando os canais de sódio-voltagem dependentes em células excitáveis, resultando em paralisia muscular (Stevens et al., 2011). A STX é uma das neurotoxinas naturais mais potentes conhecidas e, desde a sua descoberta inicial, já foram identificados 57 análogos, que ocorrem naturalmente. Com base na variação das porções dos grupos laterais, as STXs podem ser classificadas como não-sulfatadas (STX, neoSTX), mono-sulfatadas (GTX1-6), di-sulfatadas (C1-4), decarbamoiladas (dcSTX, dcneoSTX, dcGTXs1-4) e deoxi-decarbamoiladas (doSTX, doGTXs1-3) (Wiese et al. 2010).

A via de biossíntese da STX foi primeiramente elucidada na cepa *C. raciborskii* T3. O agrupamento de genes abrange 35 kb, codificando 31 quadros de leitura aberta (ORFs) e é atribuído a 26 proteínas (Kellmann et al., 2008). Embora os perfis dos genes diferem entre as diversas espécies de cianobactérias capazes de produzir a STX, todos os agrupamentos contêm um grupo de genes principais, relacionados com a biossíntese da STX. Oito genes (*sxtA*, *sxtG*, *sxtB*, *sxtD*, *sxtS*, *sxtU*, *sxtH/T* and *sxtI*) estão diretamente envolvidos na biossíntese da

molécula de STX e três genes adicionais (*sxtL*, *sxtN* and *sxtX*), estão envolvidos com a codificação de proteínas relacionadas com a modificação da molécula de STX em seus análogos (Kellmann et al., 2008).

Para este trabalho, os genes analisados foram selecionados de acordo com o seu papel na via biossintética da STX. O gene *sxtA*, descrito como o gene que provavelmente inicia a biossíntese da STX, sendo sua presença relacionada em espécies e cepas produtoras de saxitoxina, e ausente em não produtoras (Stüeken et al. 2011), os genes *sxtB* e *sxtS*, por estarem relacionados com a formação de heterociclos na estrutura da molécula (Kellmann et al., 2008) e o gene *sxtI*, o qual aparentemente está relacionado na formação da molécula de saxitoxina. Segundo Wang et al. (2016), o gene *sxtI* codifica umas das enzimas chave na biossíntese da STX.

A Lagoa do Peri é um lago costeiro subtropical, localizado no sudeste da Ilha de Santa Catarina, compreendendo o maior reservatório de água da costa Catarinense, fornecendo água potável para cerca de 100.000 habitantes. Desde 1994, tem sido registrada a presença de *C. raciborskii* na Lagoa, sendo evidenciado o aumento na sua densidade e períodos de dominância (Kormárkova et al. 1999; Grellmann, 2006; Hennemann & Petrucio, 2011; Tonetta et al., 2013). De acordo com Tonetta et al. (2013) e Silveira (2013) *C. raciborskii* é a espécie mais importante da comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, e foi dominante em todas as amostragens durante o período de estudo.

Em pesquisas recentes, foram observadas diferenças no perfil de toxinas e na ecofisiologia de duas cepas de *C. raciborskii* isoladas do Lago Peri, sugerindo a existência de diferentes ecótipos. Atualmente, os dados obtidos em estudos laboratoriais de cepas isoladas da Lagoa são escassos e novas informações sobre a produção de toxinas e os possíveis fatores ambientais que influenciam sua biossíntese são de extrema importância.

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de genes envolvidos na biossíntese da STX, bem como o conteúdo de toxinas e o nível relativo de transcritos por qPCR em duas cepas de *C. raciborskii* isoladas do Lagoa do Peri, Florianópolis, SC. Análises filogenéticas, utilizando três marcadores moleculares também foram realizadas, a fim de se avaliar sua relação com cepas isoladas de outras regiões brasileiras, bem como de outras regiões do mundo.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Cepas e condições de cultivo

As duas cepas de *C. raciborskii* utilizadas neste estudo foram isoladas da Lagoa do Peri, e denominadas de LP1 e LP2. Como controle, uma terceira cepa foi utilizada, *C. raciborskii* T3 (Kellmann et al., 2008), a qual tem sido amplamente estudada. Ambas as cepas foram cultivadas em triplicatas em meio de cultura ASM-1 (Gorham et al., 1964), temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro em uma intensidade luminosa de 60  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Após 15 dias em cultivo, alíquotas foram coletadas para a quantificação celular, análises de toxinas e expressão gênica.

### 2.2. Concentração celular e biovolume

A concentração celular foi calculada através da contagem de células em câmaras de Sedgwick - Rafter de acordo com a metodologia descrita por LeGresley & McDermott (2010) e o biovolume foi determinado segundo Hillebrand et al. (1999).

### 2.3. Extração e quantificação de toxinas

Para a determinação qualitativa e quantitativa de saxitoxinas, uma alíquota de 100 mL foi retirada de cada cepa após 15 dias de cultivo. As alíquotas foram filtradas em filtros de fibra de vidro GF/C (Whatmann, UK), e colocadas em ampolas de vidro para extração das toxinas durante, pelo menos, 12 horas à 5° C em 10 ml de HCL 0,05 M.

Após 12 horas, as alíquotas foram sonicadas a 20 kHz (Hielscher-UP100H- Alemanha) em banho de gelo durante 3 minutos. Essas alíquotas foram, então, filtradas em filtros de Ester celulose de 45  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Santorius Stedim Biotech, Alemanha). A presença de saxitoxinas foi analisada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência (Rourke et al., 2008).

A cromatografia foi realizada em um sistema HPLC (Shimadzu, Japan), que consiste em uma controladora CBM 20A, um detector de Fluorescência RF-10Axl (excitação 330 nm e emissão 390 nm), duas bombas binárias LC-20AD e um forno de coluna CTO-20A controlados através do software Labsolution 5.41.240. Para as reações de pós

derivatização foi utilizada uma bomba quaternária LC-10AD controlada manualmente e um sistema de banho (Novatecnica, modelo NT 245), com temperatura controlada a 80°C, em que ficam imersas as mangueiras de teflon. A coluna analítica utilizada para as análises foi Zorbax Bonus-RP C8 (150 x 4,60 mm, 5 µm) marca Agilent®.

As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 1. Para as análises de saxitoxina totais, padrões dos análogos das Goniautoxinas (GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4 e GTX-5) e três saxitoxinas, neosaxitoxina (NeoSTX), decarbamoilsaxitoxina (DcSTX), além do padrão da saxitoxina (STX) foram utilizados. Todas as análises, os padrões, assim como o controle (fase móvel e ácido clorídrico 0,05 N), foram realizadas em triplicatas.

**Tabela 1. Especificações e condições de análise segundo o método Rourke et al. (2008) para Saxtoxinas.**

<b>Condições cromatográficas</b>		
<b>GTX1-5 (Eluente A)</b>	Heptanosulfonato de sódio 11 mM Ácido fosfórico 5,5 mM Ajuste a pH 7,1 com Hidróxido de amônio Fluxo 1 mL/min	
<b>Neo-STX, dc-STX, STX (Eluente B)</b>	Heptanosulfonato de sódio 11 mM Ácido fosfórico 16,5 mM Acetonitrila 11,5 % (v/v) em água Ajuste a pH 7,1 com Hidróxido de amônio 1 M Fluxo 1 mL/min	
<b>Pós Derivatização 80 °C</b>	Oxidante: Ácido periódico 7 mM Hidrogeno di-potássio trihidratado 10 mM Ajuste a pH 9,0 com Hidróxido de potássio 1M Fluxo 0,4 mL/min Ácido: Ácido acético (0,05 mM) Fluxo 0,4 mL/min	
<b>Tempo</b>	<b>Eluente A (%)</b>	<b>Eluente B (%)</b>
0 min	100	0
14,9 min	100	0
<b>15 min</b>	0	100
24,9 min	0	100
<b>25 min</b>	100	0
35 min	100	0
<b>Fase estacionária utilizada:</b> Coluna analítica Zorbax Bonus RP C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), da Agilent®		
<b>Temperatura do forno de coluna:</b> 35 °C.		
<b>Gradiente de eluição:</b> 15 minutos.		

A concentração final de cada amostra foi determinada pelo total de cada variante, levando em conta sua toxicidade relativa, obtendo-se, então a concentração total de STX equivalentes. Os padrões, material de referência certificados, foram obtidos da *National Research Council Canadá (NRC)*.

#### **2.4. Desenho e validação dos iniciadores**

Foram desenhados iniciadores para a amplificação dos genes do agrupamento *sxt*, responsável da biossíntese da STX, e dos genes *16S rRNA*, *secA*, *mpA* e *petB*, sendo estes utilizados como genes de referência nas análises de expressão gênica (Tabela 2).

Os iniciadores foram desenhados com base na sequência do agrupamento *sxt* da cepa *C. raciborskii* T3 (número de acesso DQ787200.1), nas sequências parciais dos genes *16S rRNA* (número de acesso EU439566.1), *secA*, *mpA* e *petB* (Pinto et al., 2012). Para o desenho dos iniciadores foi utilizando o navegador IDT PrimerQuest, a especificidade foi verificada contra toda a base de dados do GenBank, e a formação de estruturas secundárias através da ferramenta Primer-BLAST (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

A validação dos iniciadores foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de a 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s e 72 °C por 90 s, com extensão final a 72 °C por 7 min. Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µl contendo 14 µl de PCR Master Mix (Promega), 5µl de água Mili-Q, 0,5 µl de cada iniciador e 5 µl de DNA.

Como controle, ainda foram amplificados quatro pares de iniciadores, utilizados no trabalho de Hoff-Rissetti et al. 2013, seguindo as condições descritas no mesmo. Os produtos das amplificações foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1% e sob transiluminação UV para confirmar a presença dos fragmentos de genes.

**Tabela 2. Sequências dos iniciadores desenhados para este trabalho, e os iniciadores utilizados como controle.**

Gene		Sequência (5'-3')	Amplicon (bp)	Referência
<i>sxtA</i>	F	CCACTCCCGATCACGTTAAG	110	Este trabalho
	R	TCCTATGTTGTCCCGCATT		
<i>sxtB</i>	F	TTGATFGGCAGCGGATAGAG	116	Este trabalho
	R	CATTTGGACCAGCGGATCT		
<i>sxtS</i>	F	GTA CTGGTCCCATCACAGTTG	96	Este trabalho
	R	GAGTATTGGCGGGTGA CTATG		
<i>sxtI</i>	F	AGTCTCTCAATTGCCTCCTC	149	Este trabalho
	R	CCACTCTCCTACACCATCTA		
<i>16S rRNA</i>	F	GTCGAACGGGATGCTTAGG	112	Este trabalho
	R	CTCGGCACATCCGGTATTAG		
<i>secA</i>	F	GCTGCGGTTGGAACATAAAC	91	Pinto et al., 2012
	R	TACAAGAGCGAGGGATACGA		
<i>rnpA</i>	F	AGTGGTTCGCAACCGTATC	118	Pinto et al., 2012
	R	CTCCCATTCTCCTGTCTTTGG		
<i>sxtA4</i>	F	GGACTCGGCTTGTTGCTTC	200	Hoff-Risseti et al., 2013
	R	CCAGACAGCACGCTTCATAA		
<i>sxtI</i>	F	TGCCGTTTTGTGCTTAGATG	923	Hoff-Risseti et al., 2013
	R	GGACGGAAGGACTCACGATA		
<i>sxtB</i>	F	ATCATCGGTATCATCGGTAG	400	Hoff-Risseti et al., 2013
	R	TTGTAGGRCAGGCACTT		

## 2.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 50 ml de cultivo, os quais foram centrifugados a 5.000 g por 5 min. As células foram maceradas com pilões em microtubos com 300 µL de tampão RLT (RNeasy Mini Kit, Qiagen) e, em seguida, as extrações continuaram de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada em 260 nm, sendo a pureza analisada nas razões 260/280 (>1.8) e 260/230, utilizando um Nanodrop 1000 (Thermo).

Em seguida, o cDNA foi sintetizado com o kit Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Antes da transcrição reversa, 1 µg do RNA total foi tratado com o tampão, fornecido no kit, gDNA wipeout buffer, por 2 min a 42°C a fim de eliminar qualquer contaminação com gDNA. A concentração e a pureza do cDNA foram então verificadas em um Nanodrop, como descrito anteriormente.

## 2.6. qPCR

Todas as reações de qPCR foram realizadas utilizando 100 ng de cDNA em um volume total de reação de 20  $\mu$ L, em duplicata. As amostras foram amplificadas utilizando o kit QuantiFast® SYBR® Green PCR kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um Real-Time Cycler Rotor Gene Q® (Qiagen) e o software Rotor Gene 6000 Series (Qiagen). As condições de PCR foram as seguintes: ativação inicial por calor (95 °C por 5 min); desnaturação (95 °C por 10 s); e combinação de anelamento/ extensão (60 °C por 30 s) repetidos por 35 ciclos. Após a fase de amplificação, os amplicons foram submetidos a uma análise de curva de melt (rampa de 72 °C a 95 °C, com 1 °C aumento/fase) para assegurar que não houve anelamento inespecífico. Em cada corrida, foram incluídos, em duplicata, controles negativos (no gDNA buffer wipeout treatment) e controles branco (água destilada grau biologia molecular). Todos os controles não apresentaram amplificação após 35 ciclos.

Em cada corrida, a eficiência da qPCR ( $E$ ) foi verificada para cada par de iniciadores, através de uma curva padrão com as seguintes diluições em série (1:1) com 300, 150, 75, 37.5 e 18.75 ng (em duplicatas) de um conjunto de todas as amostras de cDNA (24). Apenas as curvas com eficiência que variaram entre 99 % e 101 % foram utilizadas, e o valor de  $E$  foi automaticamente calculado pelo software Rotor Gene 6000 Series, após a definição do threshold. As curvas padrão de cada par de iniciadores foram feitas utilizando diferentes concentrações de cDNA, e os níveis relativos de transcritos foram normalizados pelos genes de referência.

A diferença nos níveis relativos de transcrição para cada gene foram avaliados através do método do  $\Delta\Delta C_T$  para a quantificação relativa, como descrito por Schmittgen & Livak (2008). Dentre os genes testados para normalização, foram selecionados os genes *16S rRNA*, *rnpA* e *secA*, devido a menor variação entre os valores de  $C_q$  intra- e intergrupo. E, como condição calibradora, foram utilizados os valores de  $C_q$  da cepa T3.

## 2.7. Análises Filogenéticas

Para a extração do DNA das cepas de *C. raciborskii* LP1, LP2 e T3, células na fase exponencial de crescimento foram coletadas e concentradas por centrifugação durante 10 min a 5.000 x g. O DNA genômico total foi extraído de cada cepa utilizando o kit de extração

Fast DNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedical, Illkirsh, France) de acordo com as instruções do fabricante.

Os conjuntos de iniciadores utilizados para as análises filogenéticas estão listados na Tabela 3. Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 15,5 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL 5x Hi-Fi Buffer, 3,1 µL dNTPs, 0,5 µL de cada iniciador, 0,25 µL Velocity DNA polymerase (Bioline) e 0,5 µl do DNA extraído. A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR system 2400 (PerkinElmer, Norwalk, USA) utilizando as seguintes condições: para o gene 16S rRNA desnaturação inicial a 92 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 20 s, anelamento a 50 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 7 min. E para os genes *rpoC1* e ITS-1, desnaturação inicial a 98 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento a 55 °C por 15 s, extensão a 72 °C por 20 seg, e extensão final a 72 °C for 10 min. Os produtos da PCR foram então purificados através de precipitação com etanol e enviados para o sequenciamento.

**Tabela 3. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises filogenéticas.**

Gene		Sequência (5'-3')	Amplicon (bp)	Referência
<i>16S rRNA</i>	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1400	Neilan et al., 1997
	R	CTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA		
<i>rpoC1</i>	F	ACCATTA ACTACCGCACCT	519	Gugger et al., 2005
	R	TTGTCAATTACCCGAGACG		
<i>ITS-S1</i>	F	GTTGGTACGCCCCGAAGTCATTA	277	Wu et al., 2011
	R	TTTCAAGGTTCTGGCTGGTTCTC		

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando o software de alinhamento de sequencias multiplas, Geneous 6.1.8 (Biomatters). Os caracteres ambíguos, nos quais uma deleção ou inserção foi registrada em qualquer uma das cepas, foram removidos dos dados alinhados. A sequência final contendo bases de alta qualidade ( $\geq 20$ ) foi utilizada para identificar, comparando com a base de dados do

*National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 7.0, e as árvores foram construídas utilizando o método da Máxima Verossimilhança (ML). As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. Como grupos externos foram utilizados os gêneros *Aphanizomenon*, *Anabaenopsis* e *Anabaena*.

## 2.8. Análises estatísticas

Para as comparações entre as respostas paramétricas das cepas, foi utilizado o teste-*t*, a fim de se avaliar as diferenças entre as concentrações das variantes GTX-1, GTX-4 e STX. Para a análise das diferenças entre os níveis relativos de transcritos dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*, nas três cepas, foi utilizada ANOVA bi-fatorial seguido do teste de Tukey HSD, quando necessário ( $p < 0,05$ ).

## 3. Resultados

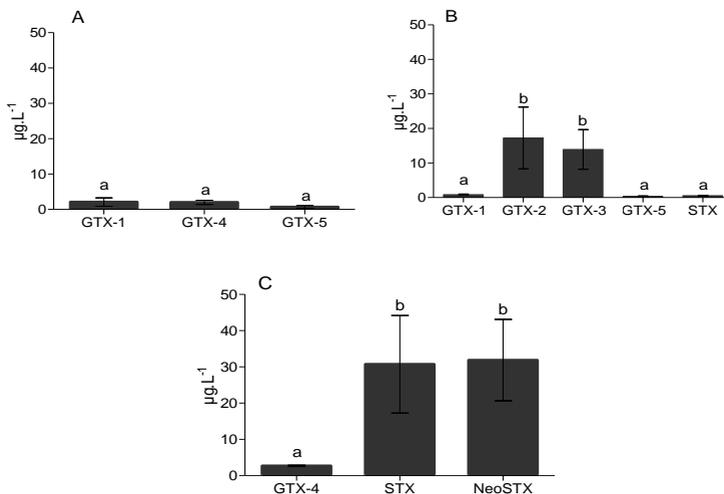
### 3.1. Concentração celular e Análise de toxinas

As concentrações celulares foram calculadas após 15 dias de cultivo, sendo que na cepa LP1 a concentração foi de  $0,24 \pm 0,02 \mu\text{m}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ , para a cepa LP2 foi de  $0,31 \pm 0,18 \mu\text{m}^3 \cdot \text{L}^{-1}$  e na cepa T3 foi de  $0,35 \pm 0,05 \mu\text{m}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ .

Quanto à produção de toxinas, as três cepas foram positivas para a produção de saxitoxinas, entretanto, as variantes detectadas em cada cepa, bem como suas concentrações, foram distintas (Figura 1).

Na cepa LP1 foram identificadas as variantes GTX-1 ( $2,09 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), GTX-4 ( $2,01 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e GTX-5 ( $0,69 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Na cepa LP2 foram detectadas as variantes GTX-1 ( $0,87 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), GTX-2 ( $17,24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), GTX-3 ( $13,93 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), GTX-5 ( $0,32 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), e STX ( $0,54 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Já na cepa T3, foram detectados GTX-4 ( $2,68 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), STX ( $37,30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e NeoSTX ( $31,87 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Só foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações de STX ( $p = 0,001$ ) produzida pelas cepas LP2 e T3. Com relação às outras variantes, GTX-1 ( $p = 0,055$ ) observadas nas cepas LP1 e LP2 e GTX-4 ( $p = 0,223$ ) nas cepas LP1 e T3, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações.



**Figura 1.** Concentração, em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , das variantes da saxitoxina (médias  $\pm$  desvio padrão,  $n = 5$ ) detectadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das três cepas de *C. raciborskii* LP1(A), LP2(B) e T3(C). Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas, segundo teste de Bonferroni.

### 3.2. Presença dos genes *sxt*

As três cepas, LP1, LP2 e T3, foram avaliadas quanto a presença dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*. Os conjuntos de iniciadores específicos desenhados neste trabalho para amplificar os genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese da saxitoxina, amplificaram satisfatoriamente os quatro genes analisados nas cepas LP2 e T3. Entretanto, na cepa LP1, nenhum dos genes foi amplificado (Figura 2). Como controle, foram testados os iniciadores desenhados por Hoff-Risetti et al. (2013), aonde foi observado o mesmo padrão de amplificação nas três cepas (dados não apresentados). A presença e as sequências desses genes na cepa T3 já foram previamente identificadas por Kellmann et al. (2008).



**Figura 2.** Gel eletroforese dos produtos da PCR dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS* nas três cepas LP1, LP2 e T3. (L= marcador de peso molecular)

### 3.3. qPCR

Os níveis relativos de transcritos variaram somente em relação ao fator cepa. Os maiores níveis relativos de transcritos foram observados na cepa T3 nos quatro genes testados, *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS* (Figura 3). Entretanto, só houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos níveis de transcritos do gene *sxtA*, sendo este, 3,06 vezes maiores que os valores observados na cepa LP2.

A cepa LP1 não apresentou transcrição dos genes *sxtA*, *sxtI* e *sxtS*. Só foi observada a transcrição do gene *sxtB*, que foi 7,3 vezes menor que os níveis relativos de transcritos da cepa T3 e 3,2 vezes menor que os níveis relativos de transcritos da cepa LP2. Porém, este valor, pode ser justificado por uma amplificação inespecífica do gene *sxtB* observada na figura 2 .

Com relação aos níveis relativos de transcritos dos genes *sxtI* e *sxtS*, não houve diferença significativa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) nos valores de transcrição.

Com relação ao fator gene, não houve diferença significativa entre os níveis de transcritos relativos dos quatro genes analisados dentro de uma mesma cepa, sugerindo que os mesmos são expressos de forma semelhante em cada indivíduo.

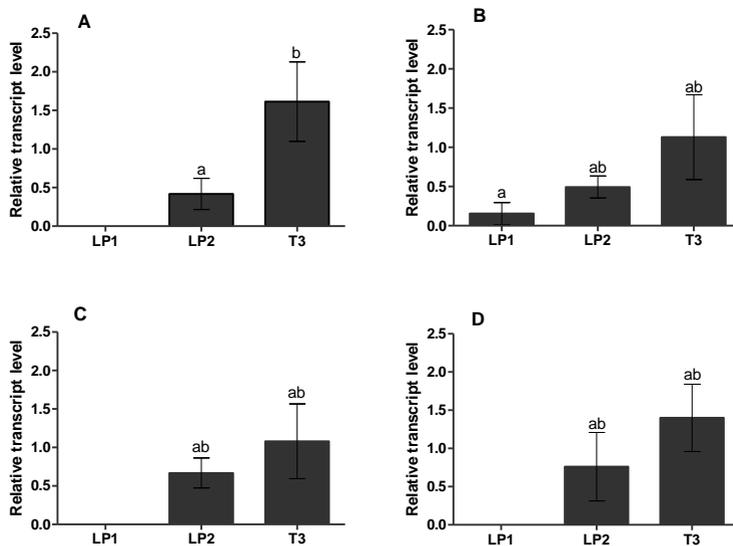


Figura 3. Expressão relativa dos genes *sxtA* (A), *sxtB* (B), *sxtI* (C), e *sxtS* (D), usando os genes *secA*, *rnpA* e *16S rRNA* como genes de referência, nas cepas de *C. raciborskii* LP1, LP2 e T3. Barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão.  $n=4$ . Letras diferentes correspondem às diferenças estatísticas, segundo teste de Tukey.

Tabela 4. Resumo dos resultados da ANOVA dos níveis relativos de transcritos das três cepas de *C. raciborskii*, LP1, LP2 e T3. Os fatores cepa e gene foram fontes de variação. Respostas significativas estão marcadas em negrito.  $N=4$

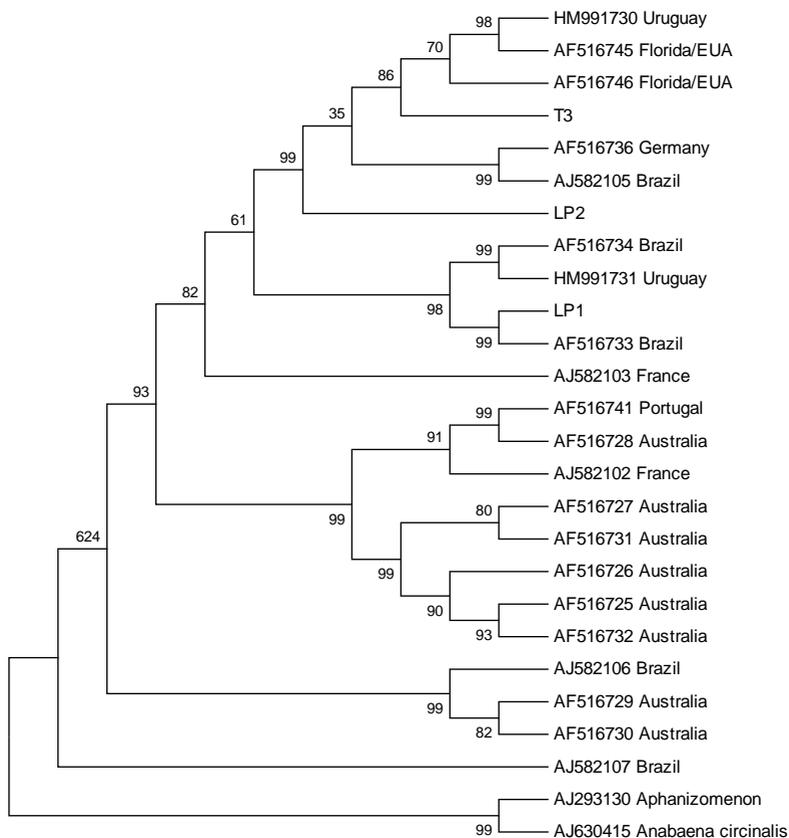
Fonte de variação	Níveis Relativos de Transcritos		
	df	F	P
Cepa (1)	1	<b>21,32</b>	<b>0,000</b>
Gene (2)	3	0,127	0,943
(1)*(2)	3	0,698	0,556
Residuo	5		

### 3.1. Análises Filogenéticas

As duas cepas isoladas da Lagoa do Peri, LP1 e LP2, juntamente com a cepa T3, usada como controle, foram 100% idênticas na análise conjunta dos 1307 pares de base dos marcadores *16S rRNA* (716 bp), ITS-1 (211 bp) e *rpoC1* (380 bp).

Nas árvores filogenéticas das regiões ITS-1, *rpoC1*, construídas pelo método da Máxima Verossimilhança, incluindo as cepas sequenciadas neste trabalho e as sequências obtidas do Genbank, agruparam as três cepas, LP1, LP2 e T3 no mesmo cluster, com valores de suporte de bootstrap moderados a altos (BP: 99-79).

A árvore construída a partir da região parcial do gene *16S rRNA*, mostrou que ambas as cepas isoladas da Lagoa do Peri, são fortemente relacionadas com outras cepas isoladas do Brasil, Uruguai e Estados Unidos, formando clusters com valores de suporte de bootstrap alto (BP: 99-98) (Figura 4). Entretanto, não foi possível observar uma separação das cepas pela região geográfica. Também foi possível observar uma tendência de separação das cepas originárias da Austrália e da Europa, entretanto, a posição de algumas cepas destes países, incluindo duas cepas brasileiras, não ficaram bem resolvidas.

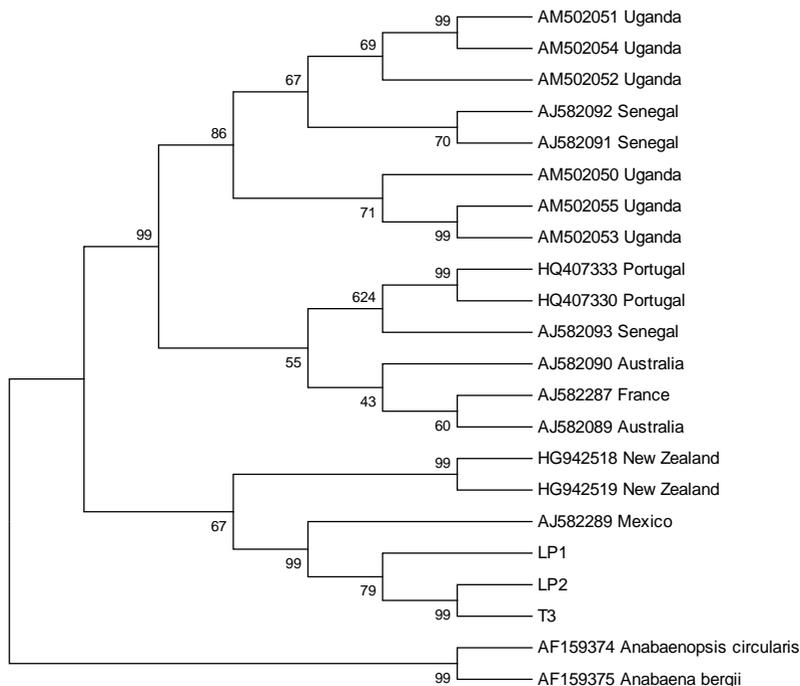


**Figura 4.** Árvore filogenética obtida através do método da Máxima Verossimilhança baseada nas sequências do gene 16S rRNA originários de diferentes regiões geográficas. Números nos nós indicam a porcentagem de confiança com base nos valores de bootstrap (n=1000).

Com relação à árvore construída a partir da região do gene ITS-1, houve uma grande separação das cepas isoladas neste trabalho, das demais sequências obtidas do Genbank (Figura 5). As demais cepas originárias do Brasil, Uruguai e México ficaram agrupadas em um segundo cluster. A partir desta árvore, foi possível visualizar uma grande separação das cepas por região geográfica, as cepas originárias da África (Uganda e Senegal) formaram um cluster com valores de bootstrap moderados a altos (BP: 68-99), e apresentaram maior similaridade com os isolados da Austrália, os quais formaram um segundo cluster, com valores de bootstrap moderados (BP: 70). Foi



A árvore construída a partir do gene *rpoC1* (Figura 6), também mostrou uma separação das cepas de acordo com a região geográfica. As cepas LP1, LP2 e T3, juntamente com a cepa originária do México, formaram um cluster com valor de suporte de bootstrap alto (BP: 99), apresentando maior semelhança com as cepas da Nova Zelândia. Novamente, as cepas isoladas da África formaram um cluster com valores de bootstrap elevado (BP: 86), e as cepas Australianas e Européias formaram um segundo cluster com valores de suporte de bootstrap moderado (BP: 55).



**Figura 6.** Árvore filogenética obtida através do método da Máxima Verossimilhança baseada nas sequências do gene *rpoC1*, originários de diferentes regiões geográficas. Números nos nós indicam a porcentagem de confiança com base nos valores de bootstrap (n=1000).

#### 4. Discussão

De acordo com os resultados obtidos, as duas cepas isoladas da Lagoa do Peri, LP1 e LP2, apresentaram diferenças no perfil de toxinas e nos níveis relativos de transcritos dos genes relacionados com a biossíntese da saxitoxina analisados. A cepa LP2 apresenta um perfil de toxinas mais complexo, quando comparados com as cepas LP1 e T3, sendo caracterizado pela presença da STX e das toxinas mono-sulfatadas GTX-1, GTX-2, GTX-3 e GTX-5, enquanto a cepa LP1 é caracterizada pela presença das toxinas mono-sulfatadas GTX-1, GTX-4 e GTX-5. Já na cepa T3, foram detectadas a toxina mono-sulfatada GTX-4 e as não sulfatadas STX e NeoSTX., caracterizando a cepa T3 como a mais tóxica, de acordo com a toxicidade relativa de cada variante.

Vários trabalhos já analisaram o perfil de toxinas da cepa T3, sendo esta, referência nas análises de perfil e biossíntese das toxinas PSP (Lagos et al., 1999; Kellmann et al., 2008; Soto-Liebe et al., 2010; Hoff-Risetti et al., 2013). Entretanto, devido aos diferentes métodos analíticos empregados por diferentes grupos de pesquisas, o perfil atual de toxinas da cepa T3 permanece confuso. Soto-Liebe et al. (2010) e Hoff-Risetti et al. (2013) identificaram as variantes NeoSTX, STX, dcSTX e dcNeo, enquanto, Lagos et al. (1999) e Kellmann et al. (2008) detectaram a presença das toxinas mono-sulfatadas GTX2/3 e GTX-5, assim como as variantes anteriormente citadas.

Embora a cepa T3 tenha sido descrita por esses autores como produtora de NeoSTX, STX, dcSTX e dcNeo, apenas as variantes STX e NeoSTX foram detectadas no presente estudo, assim como a GTX-4, não descrita no perfil de toxinas da cepa T3, até o momento. Essas diferenças podem estar relacionadas à sensibilidade do método utilizado, uma vez que algumas variantes como a dcSTX e dcNeo foram apenas detectadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (LC-MS/MS), com menor limite de detecção.

Com relação ao perfil de toxinas das cepas LP1 e LP2, até então, apenas os dados obtidos com as análises do capítulo anterior foram gerados. Ainda assim, foram observadas algumas diferenças no perfil das variantes detectadas. Na cepa LP1 foi detectada mais uma variante, GTX-1, e na cepa LP2, além de ser detectada a variante GTX-1, não foram detectadas as variantes GTX-4 e dcSTX, anteriormente observadas.

Um aspecto importante a ser observado, é que as variantes GTX1 e GTX4, assim como, as variantes GTX2 e GTX3, são epímeros, ou

seja, diferenciam-se apenas pela posição absoluta (estequiométrica) do dos substituintes R2 e R3 (Oshima, 1995), podendo ocorrer processo de epimerização e modificação da molécula em função de tempo e acidez da solução, por exemplo.

De acordo com Soto-Liebe et al. (2010), a interpretação dos perfil de toxinas em cianobactérias, baseia-se no pressuposto de que a composição de toxinas é geneticamente determinada e, por isso, os perfis de toxinas não são sensíveis a grandes variações ao longo do tempo ou em resposta à diferentes condições de cultivo. Portanto, enquanto os níveis de toxina celular podem variar ao longo do tempo, e podem ser afetados pelo contexto ecofisiológico que a cianobactéria se encontra, o perfil de toxinas permanece estável.

A cepa LP1 não amplificou nenhum dos genes selecionados (*sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*) da via de biossíntese da saxitoxina, entretanto, apesar da baixa concentração, foi detectada a produção de toxinas.

Tanto nos dinoflagelados, como nas cianobactérias, o gene *sxtA* possui quatro domínios catalíticos, com atividades preditas semelhantes a metiltransferase SAM dependente (*sxtA1*), N-acetiltransferase relacionada a GCN-5 (*sxtA2*), proteína carreadora de acila (*sxtA3*) e uma aminotransferase classe II (*sxtA4*) (Kelmann et al., 2008). Essas atividades são as mesmas das enzimas necessárias para os passos iniciais da via proposta para a biossíntese da saxitoxina. Os outros análogos da saxitoxinas, incluindo as goniautoxinas e a neosaxitoxina, é pressuposto que são formados na fase final da via, através de modificações da molécula de saxitoxina (Kelmann et al., 2008).

Trabalhos realizados até o momento, indicam que o domínio *sxtA4* parece estar presente em espécies de dinoflagelados e cianobactérias confirmadas como produtoras de saxitoxina (Stüken et al., 2011; Murray et al., 2011, 2012; Hackett et al., 2013; Orr et al., 2013; Suikkanen et al., 2013), e ausente em espécies que não produzem, assim como, outros genes da via da biossíntese da saxitoxina, como o gene *sxtG*, parece estar presente também em algumas espécies de *Alexandrium* não produtoras de toxinas (Orr et al., 2013).

O gene *sxtB* codifica a enzima citidina deaminase, e é responsável pela formação do primeiro heterociclo da molécula, e o gene *sxtS*, codifica uma  $\alpha$ -cetogluturato dioxigenase-dependente, cataliza a formação de mais dois heterociclos. Já o gene *sxtI*, que codifica uma enzima O-carbamoiltransferase, está relacionado com a formação da molécula de STX, pela transferência do grupo carbamoil, sendo portanto, uma das enzimas chave na biossíntese da saxitoxina (Wang et al., 2016).

Ainda são poucos os trabalhos que analisaram a expressão relativa de genes do agrupamento da biossíntese da saxitoxina em cianobactérias, a maioria dos trabalhos até então realizados, abordam espécies de dinoflagelados marinhos. Beamud et al. (2016) observou um aumento na concentração de saxitoxina e na expressão do gene *sxtU* na cepa *C. raciborskii* MVCC19, quando submetida ao efeito da radiação UV-B, sugerindo que a produção de saxitoxina pode estar relacionada ao estresse pela radiação UV-B. Ongley et al. (2016) observaram uma regulação positiva no gene *sxtA*, e nos genes relacionados com o transporte da saxitoxina, *sxtF* e *sxtM*, quando submeteu a cepa *C. raciborskii* T3 ao estresse iônico. Além disso, também observou que os níveis de toxinas e sua localização (intra/extracelular) mostraram variação significativa. No trabalho realizado por Vico et al. (2016), foi avaliado o efeito da concentração de nitrogênio do meio na expressão relativa dos genes *sxtU* e *sxtI*. Segundo os autores, a expressão relativa destes genes não estaria relacionada a disponibilidade de nitrogênio no meio, e sim a taxa de crescimento da cepa.

Entretanto, em um trabalho realizado por Perini et al. (2014), não foi observada nenhuma correlação entre a expressão dos genes *sxtA* e *sxtG* e a concentração de toxinas intracelular em cepas do dinoflagelado *Alexandrium minutum*. Mesmo sem correlação, tanto a expressão dos genes quanto a concentração de toxinas apresentaram os maiores e menores valores nas fases exponencial e estacionária, respectivamente. Segundo Wiese et al. (2014) e Perini et al. (2014) a ausência de correlação entre a expressão gênica e o conteúdo de toxina pode ser explicada pelo fato de que as enzimas de biossíntese da saxitoxina são enzimas de longa duração com um turn-over lento e podem ser reguladas por mecanismos pós-translacionais.

Os dados de expressão relativa dos genes analisados levam a sugerir que as diferenças nos níveis relativos dos transcritos dos quatro genes analisados nas cepas LP2 e T3, podem estar relacionadas com a concentração das toxinas detectadas, uma vez que a cepa T3, a qual apresentou os maiores valores nos níveis relativos de transcritos dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*, apresentou também maior concentração de toxinas que a cepa LP2, 65,28 [total] STX eq. ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 32,91 [total] STX eq. ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) respectivamente. Entretanto, não é possível afirmar, tendo em vista que novas análises para verificar a direção destes genes no agrupamento, bem como sua região promotora são necessárias.

Cavaliere (2008) sugere que agrupamento está dividido em três principais operons, onde se encontra a maioria dos genes, e mais dois genes sozinhos. Dois dos principais grupos são transcritos pelo mesmo

promotor bidirecional. Segundo o mesmo autor, os genes *sxtA*, *sxtB* e *sxtI* são regulados pelo mesmo promotor, enquanto o gene *sxtS* é regulado por região promotora diferente.

De acordo com os resultados das análises filogenéticas, as árvores construídas a partir das regiões *16S rRNA*, *ITS-1* e *rpoCI*, agruparam as cepas de acordo com sua região geográfica, embora na árvore do gene *16S rRNA*, esta separação não tenha ficado tão evidente. O mesmo padrão de agrupamento foi observado em trabalhos anteriores realizados por Neitan et al. (2003), Gugger et al. (2005), Haande et al. (2008), Piccini et al. (2011) and Moreira et al. (2015).

As cepas LP1 e LP2 juntamente com a cepa T3, formaram um cluster com valores de suporte de bootstrap moderados a altos nas áreas correspondentes às sequências *ITS-1* e *rpoCI*, e apresentaram maior similaridade com outras cepas isoladas do Brasil e do Uruguai.

O gene *16S rRNA* é um gene amplamente usado em análises de relações filogenéticas intraespecíficas entre cianobactérias (Fox et al., 1992). Apesar das diferenças na morfologia e condições de cultivo, toxicidade e distribuição geográfica, a sequência do gene *16S rRNA* de cepas de *C. raciborskii* são homogêneas (Stucken et al., 2009), e os altos níveis de similaridade obtidos de cepas de diferentes regiões geográficas indicam que a espécie *C. raciborskii* é uma espécie geneticamente bem definida (Neilan et al., 2003). Deste modo, de acordo com alguns autores, uma vez que é um gene bem conservado, e apresenta baixa variabilidade intraespecífica e uma baixa taxa de evolução, o gene *16S rRNA* não é o gene mais adequado para se estudar a relação no nível de espécie (Neilan et al., 1997), como foi possível observar.

Segundo Haandel et al. (2008), a região *ITS-1* é a ferramenta mais adequada para análises filogenéticas em *C. raciborskii*. As análises realizadas por Gugger et al. (2005), Stucken et al. (2009) e Piccini et al. (2011) utilizando a região *ITS-1*, mostraram três clusters sólidos formados por populações Africanas-Australianas, Europeias e Americanas. Além disso, em um estudo recente realizado por Moreira et al. (2015), o gene *rpoCI* mostrou ter um melhor poder discriminatório quando comparado com o *16S rRNA*.

Como observado em vários trabalhos, clusters bem definidos formados pelas populações Americanas, Europeias e Australianas, formam distintos grupos os quais podem ser relacionados com a produção de cilindrospermopsina e saxitoxina em *C. raciborskii* (Gugger et al., 2005; Haande et al., 2008; Stucken et al., 2009; Moreira et al., 2015). Moreira et al. (2015) levantou a hipótese de que esse

agrupamento pode explicar os diferentes padrões de expressão de toxina que as espécies apresentam ao redor do mundo.

Entretanto, como sugerido por Gugger et al. (2005) e Stucken et al. (2009), os altos valores de suporte de bootstrap que separam as cepas Australianas e Brasileiras é suportado, principalmente, na região geográfica. Embora essas populações sejam conhecidas por produzirem toxinas diferentes, análises obtidas a partir de diferentes abordagens metodológicas por Stucken et al. (2009) utilizando diferentes linhagens produtoras e não produtoras de cilindrospermopsina, não foi observada nenhuma correlação entre associação filogenética e fenótipos tóxicos em *C. raciborskii*.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que as duas cepas LP1 e LP2, isoladas da lagoa do Peri, estão mais fortemente relacionadas entre si do que com as cepas originárias de outros continentes, sendo as cepas brasileiras e americanas, apresentaram a maior similaridade. Podemos sugerir que a produção de saxitoxinas nas cepas isoladas da Lagoa do Peri pode estar relacionada com os níveis relativos de transcritos dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtI* e *sxtS*, entretanto, é necessário confirmar a ausência desses genes na cepa LP1, além de se verificar a amplificação de outras regiões do agrupamento *sxt*. Sugerem-se novos estudos para verificar a eficiência dos iniciadores utilizados, e o padrão de expressão desses genes quando submetidos a variações nas condições de cultivo.

## Referências

- Antunes, J.T., Leão, P.N., & Vasconcelos, V.M. 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*, 6, 473.
- Beamud, G., Vico, P., Haakonsson, S., et al. 2016. Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia* 763: 161-172.
- Cavaliere, C. 2008. The regulation of saxitoxin production in cyanobacteria. 144p. Austrália: Universidade de New South Wales. [Tese de doutorado].
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P.Jr. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 258-266.
- Gorham, P.R., McLachlan, R.W., Hammer, U.T., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae*. *Breb. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.* 19, 796–804.
- Grellmann, C. 2006. Aspectos da Morfologia e da Ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya Et SubbaRaju e da Produção de Cianotoxinas na Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 76 p. [Dissertação de Mestrado].
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., Humbert, J.F., 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1097–1100.
- Haande, S.; Rohrlack, T.; Ballot, A.; Røberg, K.; Skulberg, R.; Beck, M.; Wiedner, C. 2008. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7:692–701.
- Hackett, J.D., Wisecaver, J.H., Brosnahan, M.L., Kulis, D.M., Anderson, D.M., Bhattacharya, D., Plumley, F.G., Erdner, D.L., 2013. Evolution of saxitoxin synthesis in cyanobacteria and dinoflagellates. *Mol. Biol. Evol.* 30, 70e78.

- Hennemann, M.C., Petrucio, M.M., 2011. Spatial and temporal dynamic of trophic relevant parameters in a subtropical coastal lagoon in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*. 181, 347-361.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, D., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403-424.
- Hoff-Rissetti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D.C., Pinto, E., Werner, V.R., et al. (2013) *Cylindrospermopsis* and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. *PLoS ONE* 8(8), e74238.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4044e4053.
- Komárková, J., Laudares-Silva, R., Senna, P.A.C. 1999. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lake, Santa Catarina, Brazil. *Algological Studies*, 94: 207-222.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q. and Oshima, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359-1373.
- Laudares-Silva, R. 1999. Aspectos limnológicos, variabilidade especial e temporal na estrutura da comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, Santa Catarina, Brasil. 216 p. [Tese de Doutorado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.
- LeGresley, M., McDermott, G., 2010. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E. (Eds.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Paris, pp. 25-30.
- Molica, R. J. R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Merguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S. M. F. O., Lagos, N. (2002). Toxins in freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru,

- Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, 41, 606-611.
- Moreira, C., Fathalli, A., Vasconcelos, V., Antunes, A. 2015. Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch. Microbiol.* 197:47-52
- Murray, S.A., Mihali, T. K., and Neilan, B. A. 2011. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Mol. Biol. Evol.* 28: 1173–1182.
- Murray, S.A., Wiese, M., Neilan, B.A., Orr, R.J.S., de Salas, M., Brett, S., Hallegraeff, G., 2012. A reinvestigation of saxitoxin production and *sxtA* in the “non-toxic” *Alexandrium tamarense* Group V clade. *Harmful Algae* 18, 96e104.
- Neilan BA, Pearson LA, Muenchhoff J, Moffitt MC & Dittmann E. 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol.* 15: 1239-53.
- Ongley, S.E., Pengelly, J.J.L., Neilan, B.A., 2016. Elevated Na<sup>+</sup> and pH influence the production and transport of saxitoxin in the cyanobacteria *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Environ. Microbiol.* 18, 427–438.
- Orr, R.J.S., Stüken, A., Murray, S.A., Jakobsen, K.S., 2013. Evolution and distribution of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates. *Mar. Drugs* 11, 2814-2828.
- Padisak J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et SubbaRaju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch Hydrobiol* , 107:563–593.
- Perini, F., Galluzzi, L., Dell’Aversano, C., Iacovo, E.D., Tartaglione, L., Ricci, F., Forino, M., Ciminiello, P., Penna, A. 2014. SxtA and *sxtG* Gene Expression and Toxin Production in the Mediterranean *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Marine Drugs* 12: 5258-5276.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10: 644–653

- Pinto, F., Pacheco, C.C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P. & Tamagnini, P. 2012. Selection of Suitable Reference Genes for RT-qPCR Analyses in Cyanobacteria. *PLoS ONE* 7(4): e34983.
- Rourke, W.A., Murphy, C.J., Pitcher, G., Van de Riet, J.M., Burns, B.G., Thomas, K.M., Quilliam, M.A., 2008. *JAOAC Int.* 9, 589–597.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101-1108.
- Silveira MH. 2013. Estrutura e dinâmica do fitoplâncton e fatores direcionadores da dominância anual de cianobactérias em uma lagoa rasa subtropical (lagoa do Peri, SC). MscThesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.
- Sinha, R., Pearson, L.A., Davis, T.W., Muenchhoff, J., Pratama, R., Jex, A., Burford, M.A. & Neilan, B.A. 2014. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics*, 15:83.
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A., Vásquez, M., 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon*. 56, 1350–1361
- Stevens, M., Peigneur, S., Tytgat, J. 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage gated sodium channels, *Front. Pharmacol.* 2, 71.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdvas, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., Vassquez, M., Glockner, G. 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE*, 5(2):e9235.
- Stüken, A., Orr, R.J.S., Kellmann, R., Murray, S.A., Neilan, B.A., Jakobsen, K.S., 2011. Discovery of nuclear-encoded genes for the neurotoxin saxitoxin in dinoflagellates. *PLoS One* 6, e20096.
- Suikkanen, S., Kremp, A., Hautala, H., Krock, B., 2013. Paralytic shellfish toxins or spirolides? The role of environmental and genetic factors in toxin production of the *Alexandrium ostenfeldii* complex. *Harmful Algae* 26, 52e59.

- Tonetta, D., Petrucio, M.M., Laudares-Silva, R. 2013. Temporal variation in phytoplankton community in a freshwater coastal lake of southern Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia* 25: 99-110.
- Vico, P., Aubriot, L., Martigani, F., Rigamonti, N., Bonilla, S., Piccini, C. 2016. Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 56: 37-43.
- Wang DZ, Zhang SF, Zhang Y, Lin L. 2016. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview. *Journal of Proteomics* 135: 132–140
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A. 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs, *Mar. Drugs* 8:2185–2211.
- Wiese, M., Murray, S.A., Alvin, A., Neilan, B.A. 2014. Gene expression and molecular evolution of sxtA4 in a saxitoxin producing dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Toxicon* 92: 102-112.

## Conclusão Geral

Neste estudo, as cepas LP1 e LP2, isoladas da Lagoa do Peri apresentaram diferenças quanto à sua morfologia, ecofisiologia e potencial tóxico. Quanto à forma dos tricomas, a cepa LP1 apresentou tricomas retos, enquanto a cepa LP2 tricomas ligeiramente curvados, e com comprimento e volume significativamente maiores que a cepa LP1.

Foi confirmada a produção de toxinas PSP em ambas as cepas, sendo este, o primeiro dado de perfil de toxinas de cepas isoladas da Lagoa do Peri. A cepa LP2 apresentou uma maior variedade de análogos, bem como, a produção da STX, sendo, portanto, considerada mais tóxica de acordo com a toxicidade relativa de cada variante.

Ambas as cepas apresentaram baixo requerimento de luz, corroborando com dados existentes sobre a espécie, assim como, foi observado que ambas as cepas tiveram melhor crescimento em temperaturas mais altas e em razão N:P mais baixa, sendo as maiores taxas de crescimento ( $\mu \cdot d^{-1}$ ) observadas na temperatura de 28 °C e razão N:P 4,5:1. Entretanto, foi possível observar uma tendência a maiores taxas de crescimento na cepa LP2, comparada com a cepa LP1.

A cepa LP2 também apresentou maiores concentrações de clorofila-a que a cepa LP1, sendo os maiores valores observados quando mantidas em baixas intensidades luminosas, além de maior dissipação de energia não-fotoquímica (NPQ).

As duas cepas, LP1 e LP2, foram confirmadas, através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, como sendo a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska 1912) Seenayya and Subba Raju (1972). As cepas apresentaram 100% de identidade na análise conjunta dos 1307 pares de base dos marcadores *16S rRNA* (716 bp), ITS-1 (211 bp) e *rpoC1* (380 bp). As análises filogenéticas mostraram que as cepas estão fortemente relacionadas entre si, formando clusters com valores de suporte de bootstrap moderados a altos, quando comparadas as regiões ITS-1 e *rpoC1*.

Apesar da cepa LP1 não apresentar a amplificação de nenhum dos genes analisados, houve a confirmação da produção de saxitoxinas pela mesma, sendo detectadas somente as variantes GTX-1, GTX-4 e GTX-5, estando de acordo com outros trabalhos que relatam uma correlação de espécies produtoras de STX com a presença do gene *sxtA*. Na cepa LP2, assim como na cepa T3, referência na biossíntese da saxitoxina, todos os iniciadores testados amplificaram satisfatoriamente os quatro genes selecionados. A cepa T3 apresentou maiores concentrações de toxinas, sendo também observados os maiores níveis

relativos de transcritos nos quatro genes analisados, sugerindo uma provável relação entre a produção de toxinas e a expressão dos genes relacionados com a biossíntese de saxitoxina nas cepas LP2 e T3.

Com relação à cepa LP1, sugere-se a realização de novas análises, visando eficiência dos iniciadores utilizados, bem como, a amplificação de outros genes da via de biossíntese.

Nossos resultados sugerem que as diferenças observadas nas duas cepas, LP1 e LP2, isoladas da Lagoa do Peri, são resultados da seleção de ecótipos, com adaptações ecofisiológicas decorrentes das variações ambientais existentes na Lagoa, que colaboram para o sucesso ecológico desta espécie, como proposto por Chonudomkul et al. (2004) e Piccini et al. (2011).

Em suma, este trabalho adicionou informações sobre a ecofisiologia e o potencial tóxico da espécie *C. raciborskii*, em especial, as cepas LP1 e LP2, contribuindo para um melhor entendimento dos fatores que levam a sua dominância na comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, importante manancial de água potável da Ilha de Santa Catarina.