

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Efeitos de radiação ultravioleta (UV-B) sobre a fisiologia, morfologia e produção de microcistinas em *Microcystis aeruginosa* - BCCUSP232 e *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* - BCCUSP55 (Cianobactérias)**

Eliane Christina Mota

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

**Piracicaba, 2017**

**Eliane Christina Mota**

**Efeitos de radiação ultravioleta (UV-B) sobre a fisiologia, morfologia e produção de  
microcistinas em *Microcystis aeruginosa* - BCCUSP232 e *Sphaerospermopsis  
aphanizomenoides* - BCCUSP55 (Cyanobacterias)**

Orientador:

Profa. Dra. **MARIA DO CARMO BITTENCOURT-OLIVEIRA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas

**Piracicaba, 2017**



## **Agradecimentos**

À Deus por tudo e por sempre me fortalecer e direcionar meus caminhos

À minha família, principalmente meus pais Benedito e Neuza, por todo apoio, amor e compreensão, por estarem sempre ao meu lado, e por serem meu esteio, meu porto seguro. E ao meu irmão Everton, pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado João Henrique por estar sempre presente, me ajudando a enfrentar as dificuldades e a supera-las, por toda compreensão, amor e dedicação.

À minha amiga Débora, por todo apoio, amizade e companheirismo

À minha orientadora Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, pela confiança, incentivo, pelos treinos antes das apresentações e por todo aprendizado.

À Micheline por todo aprendizado, pela paciência e apoio na elaboração deste trabalho e pela amizade. E também à Adriana pela amizade e incentivos durante a jornada de estágio.

Ao Luis Lucatti “Cometa”, pelo apoio nos experimentos, e por deixar a rotina de trabalho mais leve e descontraída.

Aos grupos de oração GOU e ABU, por levarem até mim as palavras amorosas de Deus.

Por todos os meus amigos e professores que estiveram presentes e me apoiaram ao longo destes anos do bacharelado.

Ao órgão financiador deste projeto, Fapesp e ao Cnpq pela bolsa de Iniciação Científica

A todos minha sincera gratidão!



“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e  
os seus planos serão bem-sucedidos”

Provérbios 16:3



## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 Culturas e condições de cultivo.....	15
2.2 Desenho experimental.....	15
2.3 Crescimento.....	15
2.4 Determinação do teor de clorofila.....	16
2.5 Alterações morfológicas, biovolume e biomassa.....	16
2.6 Espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes.....	17
2.7 Determinação das concentrações de microcistina.....	17
2.8 Análise estatística dos dados.....	18
3 RESULTADOS.....	18
3.1 Densidade celular.....	18
3.2 Análise morfométrica, biovolume e biomassa.....	19
3.3 Teor de clorofila <i>a</i> .....	22
3.4 Espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes.....	23
3.5 Concentrações de microcistina.....	25
4 DISCUSSÃO.....	25
5 CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS.....	29





**Efeitos de Radiação Ultravioleta (UV-B) sobre a fisiologia, morfologia e produção de  
microcistinas em *Microcystis aeruginosa* - BCCUSP232 e *Sphaerospermopsis  
aphanizomenoides* - BCCUSP55 (Cianobactérias)**

Eliane Christina Mota <sup>1</sup>, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira<sup>1\*</sup>, Micheline Kézia Cordeiro-  
Araújo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,  
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP,  
Brasil.

\*Autor correspondente: mbitt@usp.br

Trabalho a ser submetido para: Ecotoxicology and Environmental Safety

## 23    **Resumo**

24    Alterações morfológicas e fisiológicas, em decorrência de fatores de mudanças climáticas  
25    como intensidade luminosa e radiação ultravioleta (UV-B), são cada vez mais frequentes em  
26    cianobactérias. Estas alterações demonstram relação direta com o aumento da formação de  
27    florações e produção de cianotoxinas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da  
28    exposição diária à radiação UV-B sobre o estresse fisiológico em *Microcystis aeruginosa*  
29    (BCCUSP232) e *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (BCCUSP55) através da análise de  
30    atividade de enzimas antioxidantes (POD e SOD), produção de espécies reativas de oxigênio  
31    ( $H_2O_2$ ), teor de clorofila, alterações morfométricas, biovolume e crescimento. As espécies *M.*  
32    *aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* foram cultivadas sob condições controladas e submetidas à  
33    exposição diária de radiação UV-B por 4 e 8 horas, além do controle. Amostras foram  
34    coletadas a cada 2 dias para análise do crescimento, biovolume, alterações morfométricas e  
35    teor de clorofila. Ao final do experimento (12º dia), amostras de cada tratamento foram  
36    coletadas para a análise de  $H_2O_2$ , POD e SOD. As respostas de *M. aeruginosa* e *S.*  
37    *aphanizomenoides* variaram nos diferentes tratamentos. Enquanto que para *M. aeruginosa*  
38    apresentou um efeito inibitório do crescimento e um aumento na concentração de  $H_2O_2$  no  
39    tratamento de 8 h, em *S. aphanizomenoides* o oposto foi observado, indicando um efeito  
40    estimulante do crescimento e uma redução na concentração de  $H_2O_2$  em ambos os tratamentos  
41    (4 e 8 h). A exposição à UV-B por 4 e 8 h provocou um aumento no teor de clorofila *a* de *M.*  
42    *aeruginosa* no 12º dia em relação ao controle, enquanto que a biomassa não apresentou  
43    diferenças significativas. Já em *S. aphanizomenoides*, embora o teor de clorofila *a* não tenha  
44    apresentado diferenças significativas, ambos os tratamentos (4 e 8 h) provocaram um aumento  
45    na biomassa a partir do 6º dia, o que pode estar relacionado com o efeito estimulatório que a  
46    UV-B provocou nesta linhagem. A intensidade de UV-B utilizada nesse estudo não promoveu  
47    variações significativas na morfometria e nas enzimas antioxidantes de *M. aeruginosa* e *S.*  
48    *aphanizomenoides*. As concentrações de microcistinas em *M. aeruginosa* não apresentaram  
49    variações significativas enquanto que em *S. aphanizomenoides* a microcistina não foi  
50    detectada pelo método. Em cianobactérias, o efeito de altas doses de UV-B é danoso,  
51    causando, muitas vezes, estresse fisiológico e danos ao DNA e outras estruturas, porém o  
52    efeito diferenciado observado em *S. aphanizomenoides*, deve ser melhor investigado para  
53    entender sua possível relação com mecanismos de proteção contra radiação UV-B.

54    **Palavras-chave:** Alterações climáticas; Cianobactérias; Cianotoxinas; Estresse fisiológico;  
55    Radiação ultravioleta

**Effects of Ultraviolet Radiation on the Physiology, Morphology and Microcystin  
Production in *Microcystis aeruginosa* - BCCUSP232 and *Sphaerospermopsis  
aphanizomenoides* - BCCUSP55 (Cyanobacteria)**

Eliane Christina Mota<sup>1</sup>, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira<sup>1\*</sup>, Micheline Kézia Cordeiro-  
Araújo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,  
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP,  
Brasil.

\*Corresponding author: mbitt@usp.br

Paper to be submitted to: Ecotoxicology and Environmental Safety

## 79 Abstract

80 Morphological and physiological changes due to climate change factors such as light intensity  
81 and ultraviolet radiation (UV-B) are increasingly frequent in cyanobacteria. These changes  
82 demonstrate a direct relationship with the increase of blooms formation and cyanotoxin  
83 production. The objective of this study was to evaluate the effects of daily exposure to UV-B  
84 radiation on physiological stress in *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP232) and  
85 *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (BCCUSP55) by analyzing the activity of antioxidant  
86 enzymes (POD and SOD), reactive oxygen species production ( $H_2O_2$ ), chlorophyll content,  
87 morphometric changes, biovolume and growth. The species *M. aeruginosa* and *S.*  
88 *aphanizomenoides* were cultivated under controlled conditions and submitted to UV-B  
89 radiation daily exposure for 4 and 8 hours, in addition to the control. Samples were collected  
90 every 2 days for growth, biovolume, morphometric changes and chlorophyll content analysis.  
91 At the end of the experiment (day 12), samples of each treatment were collected for  $H_2O_2$ ,  
92 POD and SOD analysis. The responses of *M. aeruginosa* and *S. aphanizomenoides* varied in  
93 the different treatments. While for *M. aeruginosa* it presented a growth inhibitory effect and  
94 an increase in  $H_2O_2$  concentration at 8 hours treatment, in *S. aphanizomenoides* the opposite  
95 was observed, indicating a growth stimulating effect and a reduction in  $H_2O_2$  concentration in  
96 both treatments (4 and 8 h). Exposure to UV-B for 4 and 8 h caused an increase in chlorophyll  
97 *a* content of the *M. aeruginosa* on the 12th day in relation to the control, while biomass did  
98 not present significant differences. In *S. aphanizomenoides*, although the chlorophyll *a*  
99 content did not present significant differences, both treatments (4 and 8 h) caused an increase  
100 in biomass from the 6 th day, which may be related to the stimulatory effect that the UV -B  
101 promoted in this strain. The intensity of UV-B used in this study did not promote significant  
102 variations in the morphometry and antioxidant enzymes of *M. aeruginosa* and *S.*  
103 *aphanizomenoides*. The microcystins concentrations in *M. aeruginosa* did not show  
104 significant variations whereas in *S. aphanizomenoides* microcystin was not detected by the  
105 method. In cyanobacteria, the effect of high doses of UV-B is harmful, causing in general  
106 physiological stress and damage to DNA and other structures, but the differentiated effect  
107 observed in *S. aphanizomenoides* should be better investigated to understand its possible  
108 relation with protection mechanisms against UV-B radiation.

109 **Keywords:** Climate change; Cyanobacteria; Cyanotoxins; Physiological stress; Ultraviolet  
110 radiation.

## 1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias são organismos procariotos, fotossintetizantes de ocorrência natural em ecossistemas aquáticos de todo o mundo, constituindo uma parte importante da comunidade fitoplanctônica (Sivonen e Jones, 1999). Algumas condições ambientais como intensidade e radiação luminosa, temperatura e concentrações de nutrientes podem favorecer a dominância de cianobactérias dentro do fitoplâncton e ocasionar a formação de florações ou "Blooms", que é o aumento excessivo na densidade populacional desses organismos (Stewart et al., 2006; Heisler et al., 2008; Bittencourt-Oliveira et al., 2014). Tais organismos são capazes de produzir diversos compostos secundários, dentre eles várias toxinas chamadas de cianotoxinas (Carmichael, 1990). O potencial de produção de cianotoxinas pelas cianobactérias demonstra que a ocorrência de florações é um grave problema para os ecossistemas aquáticos e também para a saúde humana. Dessa forma, os estudos sobre fatores como intensidade luminosa e radiação ultravioleta envolvidos no desenvolvimento e resposta de cianobactérias produtoras de cianotoxinas são de suma importância, pois podem alertar sobre os riscos de acidentes de intoxicação e até mesmo contribuir com manejo dos ecossistemas aquáticos.

Florações de cianobactérias como as dos gêneros *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann e *Sphaerospermopsis* Zapomelová, Jezberová, Hrouzek, Hisem, Reháková & Komárková são comuns em ambientes eutróficos, tais como lagos e reservatórios, podendo causar sérios problemas ambientais e econômicos, incluindo a diminuição de atividades recreativas, aumento no custo do tratamento das águas, entre outros (Dokulil e Teubner, 2000; Yang et al., 2012). Associado a isso, eventos de mudanças climáticas podem ser relatados como um dos responsáveis pelo aumento na formação de florações tóxicas e, consequentemente, pelo aumento na produção de cianotoxinas (Paerl e Huisman, 2008; O'Neil et al., 2012; Paerl e Paul, 2012). Isso acontece porque tais eventos estão relacionados a aumentos na intensidade luminosa e radiação ultravioleta (UV) nos ambientes aquáticos.

Além disso, o aumento da radiação solar ultravioleta (UV-B) na superfície da Terra devido ao esgotamento da camada de ozônio (Manney et al., 2011; Rastogi et al., 2014) pode ser um fator de estresse importante para todos os organismos fotossintizantes que vivem em ecossistemas aquáticos e terrestres (Häder et al., 2011).

Os efeitos mais nocivos da radiação UV em células vivas são geralmente atribuídas à radiação solar ultravioleta UV-B (Moon et al., 2012), a qual pode afetar vários processos fisiológicos e bioquímicos em cianobactérias e, conseqüentemente, alterar a estrutura e função da comunidade de todo um ecossistema (Häder, 2011). Em adição a isso, tem sido relatado que a radiação UV-B pode inibir a atividade fotossintética em cianobactérias (Rastogi et al., 2014; Yang et al., 2015).

Para resistir aos efeitos da radiação ultravioleta, as cianobactérias apresentam algumas estratégias de defesa, que incluem a produção ROS e resposta antioxidativa através da atividade de enzimas como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) entre outras (Singh et al., 2010).

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da exposição diária à radiação ultravioleta (UV-B) sobre o estresse fisiológico e morfológico em *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP232) e *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (BCCUSP55), através da análise de atividade de enzimas antioxidantes (POD e SOD), produção de espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ ), teor de clorofila, alterações morfométricas, biovolume, crescimento e produção de microcistinas. A hipótese desse estudo é de que os efeitos ocasionados pela exposição diária a UV-B podem alterar a produção de microcistinas e a fisiologia dessas cianobactérias. Respostas a essas implicações podem demonstrar os possíveis impactos gerados pelas mudanças climáticas sobre os ecossistemas aquáticos contribuindo para ações de manejo nesses ambientes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Culturas e condições de cultivo

As linhagens estudadas pertencem ao Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo (BCCUSP) do Laboratório de Cianobactérias da ESALQ/USP, as quais foram isoladas de diversos reservatórios de água do Brasil. Para o inóculo inicial foi estipulado uma densidade celular inicial de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por  $\text{mL}^{-1}$  para *M. aeruginosa* e  $2 \times 10^5$  células por  $\text{mL}^{-1}$  para *S. aphanizomenoides*. As linhagens de cianobactérias foram cultivadas em 700 mL de meio ASM-1, pH 7.4 (GUILLARD, 1973) e mantidas em câmaras climáticas durante 12 dias a  $23 \pm 1$  °C, com fotoperíodo de 12:12 h claro:escuro.

### 2.2. Desenho experimental

Os experimentos foram realizados em tréplicas, (n=3) utilizando a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de  $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e radiação ultravioleta (UV-B), fornecida aos cultivos através de lâmpada UV-B USHIO G8T5E, em intensidade luminosa geralmente encontrada nos ambientes naturais ( $0,45 \text{ Wm}^{-2}$ ) durante 0, 4 e 8 horas de exposição diária contínua, iniciando-se às 10 h da manhã. Os horários de exposição diária à radiação UV foram baseados nas previsões do Painel Intergovernamental em Mudanças Climáticas (IPCC, 2014). Como controles, as cepas foram mantidas apenas nas condições de PAR citadas acima, sem exposição à radiação UV-B. A radiação UV-B foi aplicada a partir do 5º dia de cultivo.

### 2.3 Crescimento

O crescimento populacional foi avaliado através da densidade celular, determinada a partir da combinação entre densidade ótica a 750 nm ( $y = 3\text{E-}08x + 0,0058$  para *M.*



*aeruginosa* e  $y = 1\text{E-}07x - 0,0006$  para *S. aphanizomenoides*) e contagem em microscopia celular com aliquotas retiradas das culturas a cada 2 dias. Para a contagem celular por microscopia, as amostras foram preservadas com solução de lugol acético 10%. A confirmação da densidade celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ) por contagem em câmaras Fuchs-Rosenthal em microscópio binocular (Nikon E200, USA) foi realizada de acordo com Chorus e Bartram (1999).

#### 2.4. Determinação do teor de clorofila

Para a determinação do teor de clorofila, 10 mL de cada tratamento foram coletadas a cada 2 dias e centrifugados em baixa rotação ( $2200 \times g$ ) em temperatura ambiente por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (biomassa) ressuspensionado em 3 mL de acetona P.A.. Para a extração da clorofila, a mistura foi acondicionada em escuro a  $-20^\circ\text{C}$  por 2h. Após esta etapa, a solução de extração foi centrifugada a  $2200 \times g$  por 5 min e o sobrenadante lido em absorvâncias de 663 e 647 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Biospectro SP-22). A concentração de clorofila foi calculada de acordo com Ritchie (2006).

#### 2.5 Alterações morfológicas, biovolume e biomassa

Para a determinação de alterações morfológicas, foram fotografadas células e tricomas de cada tratamento utilizando-se o programa ImageLab (Softium, São Paulo, Brazil) acoplado ao microscópio óptico (Nikon E200, Melville, NY, USA) com câmera digital acoplada (Samsung SCC833, Tokyo, Japan). Medidas morfométricas foram realizadas a cada 2 dias utilizando microscópio óptico (Nikon YS100, Melville, NY, EUA), com auxílio de uma ocular micrometrada. Para a determinação do biovolume e alterações morfométricas, foram realizadas 30 medidas (por tratamento) do diâmetro celular *M. aeruginosa* e de *S. aphanizomenoides*, além do diâmetro celular (células encontradas isoladas ou em tricomas)

foram realizadas medidas do comprimento celular, tais medidas se basearam em modelos geométricos propostos por Hillebrand (1999) para cada espécie. A biomassa foi calculada a partir dos dados de biovolume.

## 2.6. Espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes

Para as análises de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes, foram coletados 40 mL de amostra de cada tratamento no 12º dia do experimento. Para determinação da formação intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* foi utilizado o método proposto por Jana e Choudhuri (1982) com algumas modificações. Um minuto após a incubação, uma cor vermelha-alaranjada da mistura foi medida em 410 nm. A concentração de peróxido de hidrogênio foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 0,28 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

A extração de proteínas totais para os ensaios de atividade enzimática foi realizada utilizando tampão fosfato 0,1 M (pH=6,5) contendo 1% de polivinil pirrolidona (PVP) (w/v). A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA).

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com Reddy et al. (1995) e apresentada em nkat mg<sup>-1</sup> proteínas. Sendo mudança na absorbância por minuto proporcional à atividade da enzima. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Misra e Fridovich (1972) e foi apresentada em nkat mg<sup>-1</sup> proteínas.

## 2.7. Determinação da concentração de microcistinas

As concentrações de microcistinas foram determinadas através da técnica imunoenzimática ELISA ("Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay"), com utilização do kit

Abraxis placa, para quantificação de microcistinas em água (Abraxis, LCC, USA), de acordo com instruções do fabricante. As análises foram realizadas com auxílio de uma leitora de microplaca (ASYS Hitech GmbH, Nordstrasse 4, modelo A – 5301 Eugendorf, Áustria). A faixa de detecção dos ensaios foi de 0,15 a 5,0 partes por bilhão (PPB).

## 2.8. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram analisados com o software R versão 3.0 onde foram submetidos a teste de normalidade (Teste Shapiro-Wilk), teste de análise de variância (ANOVA um critério), empregado para determinar os efeitos da exposição diária à UV-B em *M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* e teste de Tukey HSD para separação das médias significativamente diferentes. Todas as análises foram realizadas com significância a 5% ( $n=3$ ).

## 3. RESULTADOS

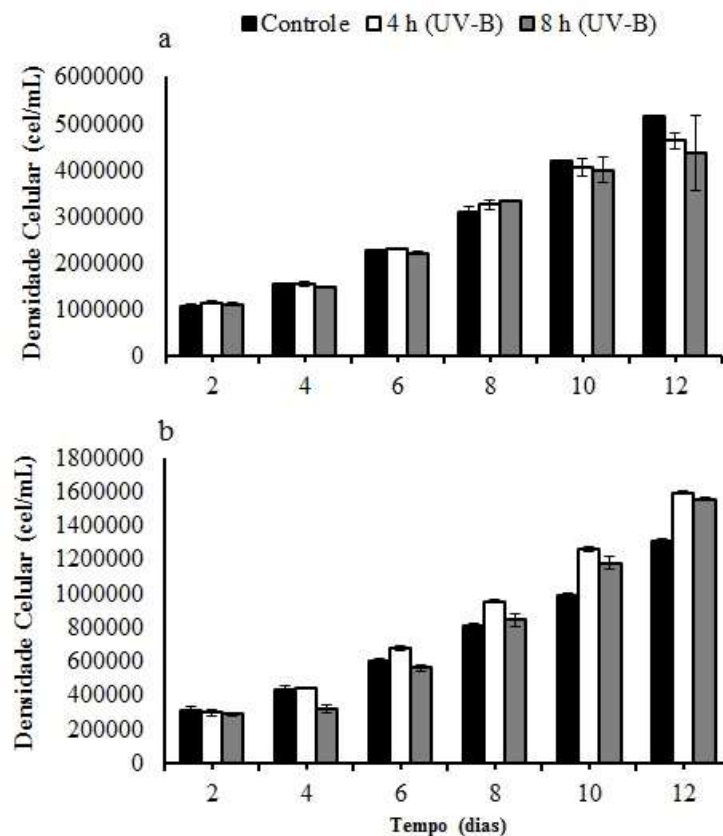
### 3.1. Densidade celular

A densidade celular das linhagens de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) e *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) expostas diariamente à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 horas apresentaram respostas diferenciadas entre as espécies (Figura 1a-b). Para *M. aeruginosa* o tratamento com 8 h de exposição promoveu uma redução na densidade celular em relação ao controle, apresentando significância no 12º dia de cultivo (Figura 1a). Entretanto, para *S. aphanizomenoides* o oposto foi observado, ou seja, houve um aumento gradativo na densidade celular observada a partir do 6º dia de cultivo para o tratamento de exposição de 4 h, e a partir do 10º dia de cultivo para o tratamento de 8 h, indicando que nessa linhagem os tratamentos estimularam o crescimento (Figura 1b).

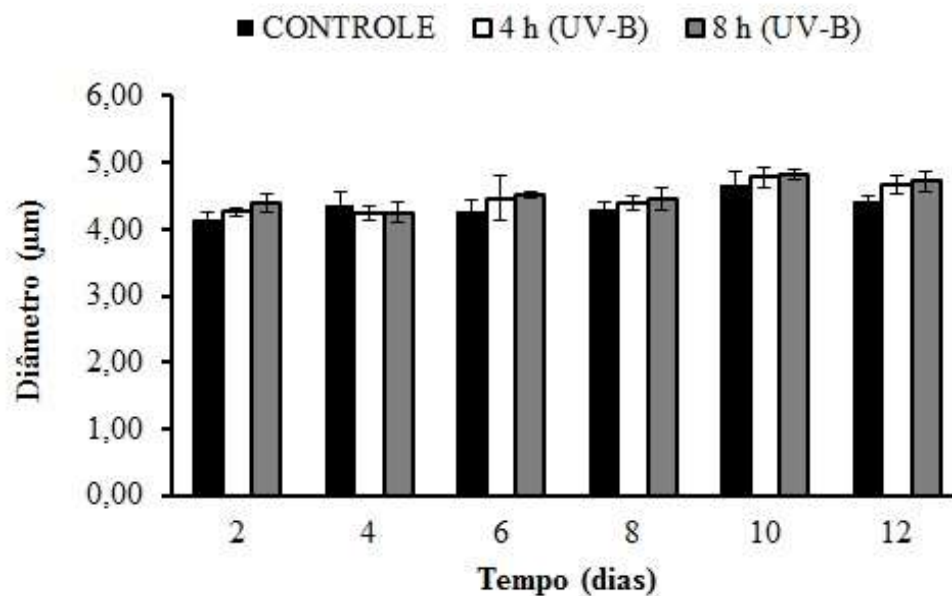
### 3.2. Análise morfométrica, biovolume e biomassa

A partir das medidas celulares de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (figura 2) e *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) (figura 3) expostas diariamente à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 horas, obteve-se os dados de biovolume celular, que também foram utilizados para a obtenção dos dados biomassa.

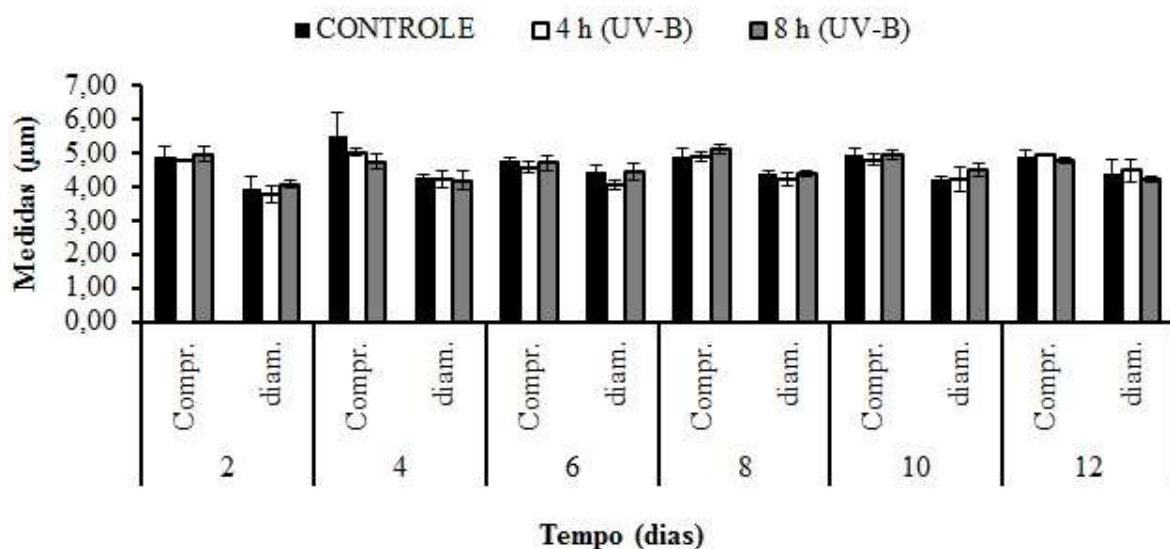
Os dados morfométricos de *M. aeruginosa* não apresentaram variações significativas entre os tratamentos ( $p>0.05$ ), entretanto observou-se um ligeiro aumento no biovolume celular dos tratamentos (4 e 8 h) a partir do 6º dia (Figura 4a). Já em *S. aphanizomenoides* não houve variações significativas ao longo dos dias nem entre os tratamentos (Figura 4b). Não foram encontradas alterações morfológicas evidentes para ambas as linhagens.



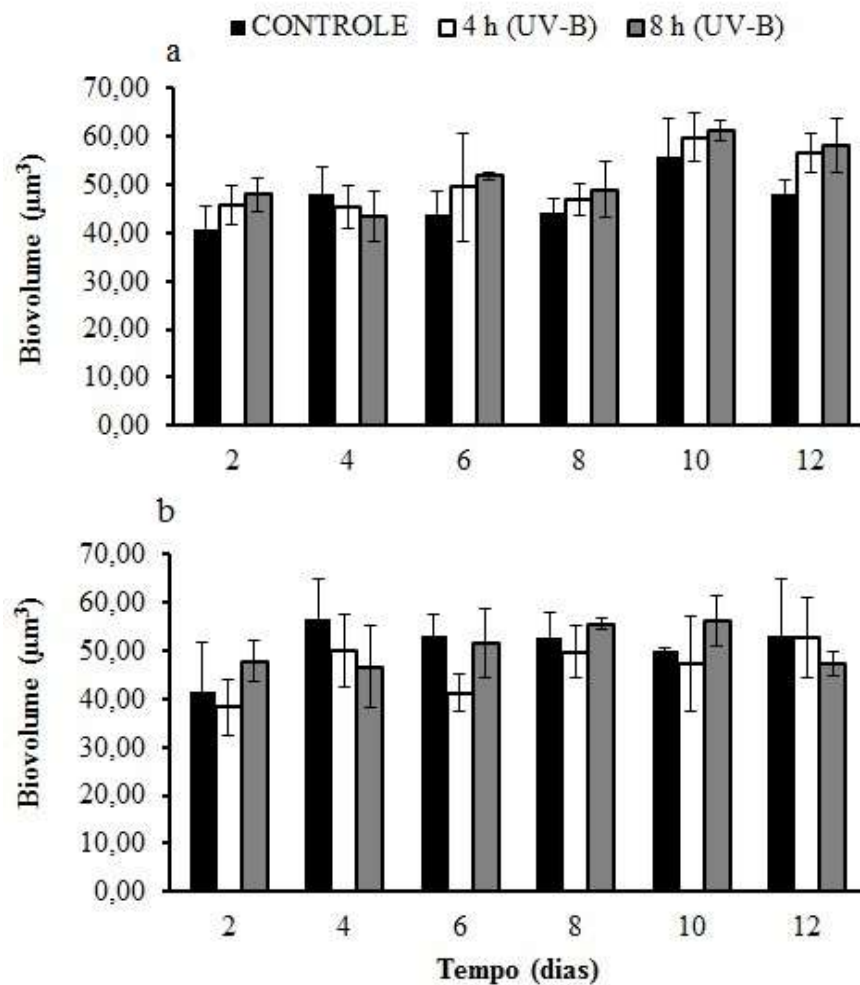
**Figura 1.** Densidade celular (cel/mL) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), expostas à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).



275 **Figura 2.** Diâmetro celular de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) durante experimento de  
 276 exposição à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$   
 277 desvio padrão ( $n=30$ ).

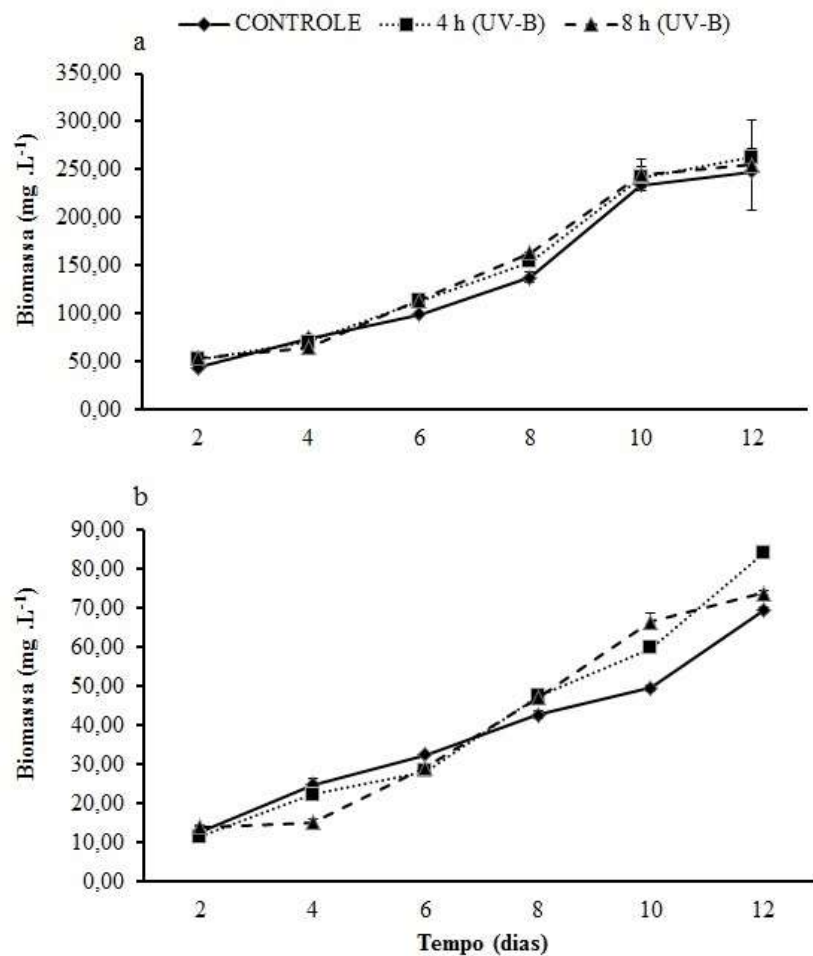


279 **Figura 3.** Dados morfométricos de *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) durante experimento  
 280 de exposição à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. Comprimento celular (compr.);  
 281 diâmetro celular (diâm.). As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=30$ ).



**Figura 4.** Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), expostas à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=30$ ).

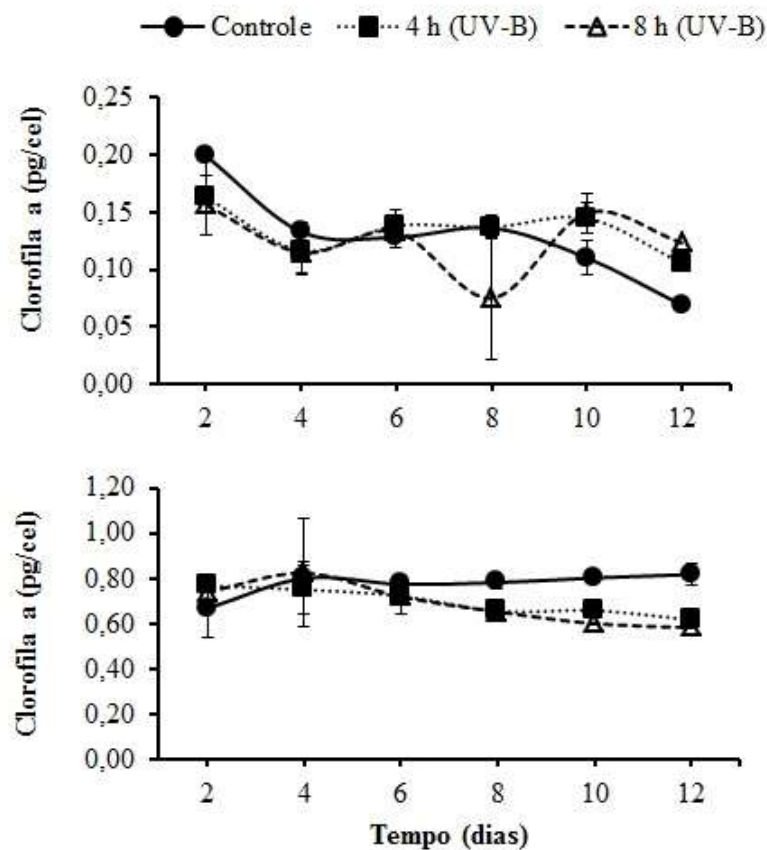
Os dados de biomassa para *M. aeruginosa* não apresentaram diferenças significativas (Figura 5a). Já em *S. aphanizomenoides* houve aumento na biomassa com diferenças significativas para ambos os tratamentos (4 e 8 h) a partir do 6º dia, sendo que o tratamento de 4 h foi o que promoveu o maior aumento na biomassa (Figura 5b). Isso demonstra que neste tempo de exposição a biomassa da espécie foi influenciada positivamente pela combinação de UV-B.



**Figura 5.** Biomassa (mg L<sup>-1</sup>) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), expostas à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

### 3.3 Teor de clorofila a:

As análises de clorofila *a* de *M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* expostas à UV-B mostraram que a partir do 10º dia, o teor de clorofila *a* em *M. aeruginosa* foi maior que o controle em ambos os tratamentos (4 e 8 h) (Figura 6a). Enquanto que em *S. aphanizomenoides* o teor de clorofila *a* não apresentou diferenças significativas ao longo dos dias nem entre os tratamentos ( $p>0,05$ ), apresentando um padrão contínuo ao longo de todo o experimento (Figura 6b).



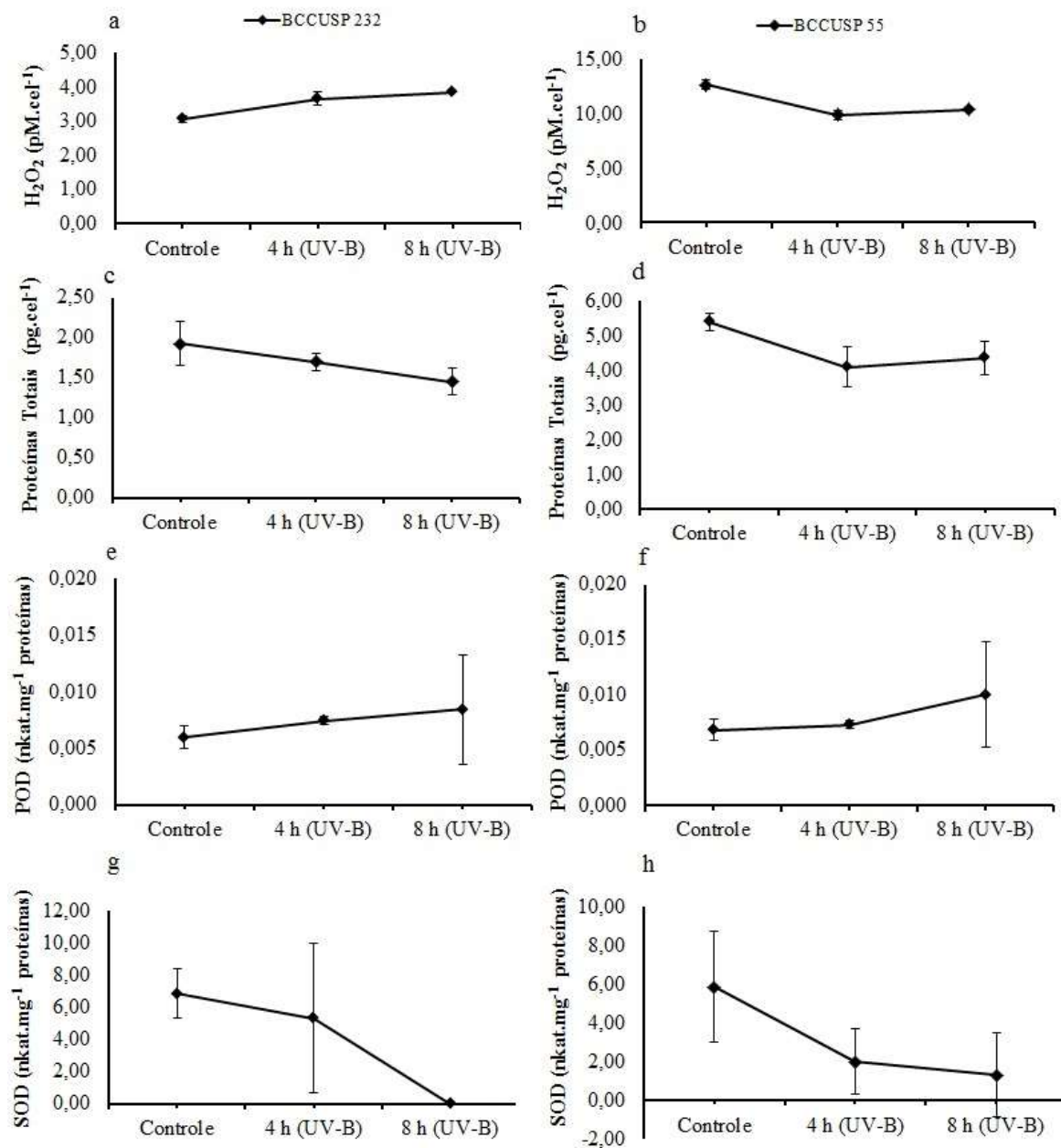
**Figura 6.** Teor de clorofila a (pg/cel) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S. aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), expostas à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

#### 3.4 Espécies reativas de oxigênio, proteínas totais e atividade de enzimas antioxidantes:

A concentração interna de  $H_2O_2$  em *M. aeruginosa* aumentou com o tratamento de 8 h (Figura 7a), enquanto que para *S. aphanizomenoides* essa concentração reduziu nos tratamentos de 4 e 8 h (Figura 7b). A concentração interna de proteínas totais não apresentou diferenças significativas para *M. aeruginosa* (Figura 7c), enquanto que em *S. aphanizomenoides* houve uma redução nessa concentração no tratamento de 4 h de exposição (Figura 7d). A atividade das enzimas antioxidantes peroxidase - POD (Figura 7e-f) e



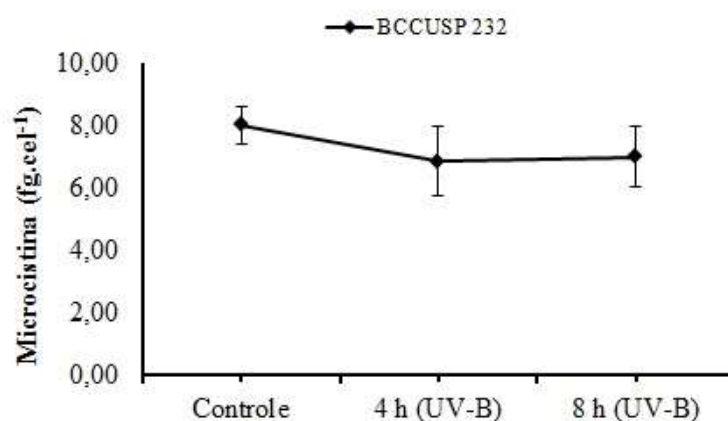
319 superóxido dismutase - SOD (Figura 7g-h) não apresentaram diferenças significativas para  
 320 ambas as linhagens.



321 **Figura 7.** Concentração interna de  $H_2O_2$  (pM cel<sup>-1</sup>) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S.*  
 322 *aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), proteínas totais (pg cel<sup>-1</sup>) de *M. aeruginosa* (c) e *S.*  
 323 *aphanizomenoides* (d), atividade da enzima peroxidase - POD (nkat mg<sup>-1</sup> proteínas) de *M.*  
 324 *aeruginosa* (e) e *S. aphanizomenoides* (f), atividade da enzima superóxido dismutase - SOD  
 325 (nkat mg<sup>-1</sup> proteínas) de *M. aeruginosa* (g) e *S. aphanizomenoides* (h) expostas à radiação  
 326 ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

### 3.5 Concentrações de microcistina:

As concentrações de microcistinas em *M. aeruginosa* não apresentaram variações significativas ( $p>0.05$ ) (Figura 8). Para *S. aphanizomenoides* a microcistina não foi detectada pelo método.



**Figura 8.** Concentração de microcistina (fg.cel<sup>-1</sup>) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) exposta à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisados os efeitos da radiação UV-B sobre o estresse fisiológico de *M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides*.

O resultado de densidade celular para *M. aeruginosa*, pode indicar que a radiação UV-B durante maior tempo de exposição possui efeito inibitório sobre o crescimento populacional desta linhagem. Babel et al. (2017) observaram que altas doses de radiação UV-B afeta o crescimento e vários processos metabólicos, uma exposição de 4 h de UV-B com uma intensidade de (2 Wm<sup>-2</sup>) combinada com luz fluorescente ocasionou um declínio de 50% na sobrevivência desses organismos. Haibo e Qiu (2005), em estudo realizado com a mesma espécie, observaram durante um curto período de exposição (3 h durante 9 dias) um efeito inibitório no crescimento e teor de clorofila, reduzindo a eficiência fotossintética. Porém após

uma exposição prolongada à UV-B (14 dias), *M. aeruginosa* apresentou estratégias adaptativas através do aumento da síntese de carotenóides para neutralizar oxidantes reativos causados pela exposição aos raios UV-B.

Para *S. aphanizomenoides* o oposto foi observado, a exposição à UV-B para ambos os tratamentos estimulou o crescimento populacional, sendo que no tratamento de 8 h, esse estímulo foi mais tardio (10º dia de cultivo). A literatura carece de estudos que avaliem o efeito da radiação UV-B nesta espécie, porém estudos com outras espécies filamentosas mostram efeitos distintos, como em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, que a exposição à altas doses de radiação UV-B, provocou morte celular, danos nas estruturas fotossintéticas e consequente redução do crescimento (Noyma et. al 2015).

O ligeiro aumento de volume observado nas análises morfométricas de *M. aeruginosa* condiz com resultado encontrado em experimento realizado por De lange e Lüring (2003) no qual a exposição a radiação UV-B aumentou significativamente o volume celular de *M. aeruginosa* e também reduziu as taxas de crescimento.

Altas doses de UV-B possuem efeito danoso sobre algas e cianobactérias, um dos efeitos é a redução da fotossíntese através de efeitos diretos sobre o fotossistema, e indiretos, através da redução dos pigmentos fotossintetizantes, por consequência a redução na fotossíntese também resulta em menor biomassa (Xue et al., 2005). Embora muitos estudos envolvendo radiação UV-B e cianobactérias, apontem como resultado uma redução dos pigmentos fotossintetizantes (Babele et al. 2017; Xue et al., 2005), neste estudo os tratamento promoveram um aumento no teor de clorofila *a* de *M. aeruginosa* ao final do experimento, e não houve variações significativas na biomassa.

A ausência de variações significativas para morfometria e teor de clorofila *a* em *S. aphanizomenoides*, pode indicar que a intensidade UV-B utilizada nesse estudo não é capaz

de promover tais alterações. Já o resultado obtido para biomassa, pode estar relacionado ao efeito estimulatório que os tratamentos com UV-B provocaram nesta linhagem. Kumar et al. (2016), em estudos com cianobactérias filamentosas observaram que o tratamento com UV-B a uma intensidade de  $0,045 \text{ Wm}^{-2}$ , teve efeito estimulante na acumulação de biomassa.

*M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* apresentaram padrões distintos quanto à concentração interna de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , os resultados obtidos para ambas as linhagem se relacionam com os dados de densidade encontrados no presente estudo. O aumento na concentração interna de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em *M. aeruginosa* demonstra que a radiação UV-B utilizada provocou um estresse oxidativo que refletiu em seu crescimento, enquanto que *S. aphanizomenoides* apresentou uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ainda menor que o controle, demonstrando um efeito estimulatório quando exposta à radiação UV-B. As espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), são produzidas em situações de estresse, sendo responsáveis por danos oxidativos (Latifi et. al., 2009), porém atua como molécula sinal para a regulação de genes fotossintéticos e indução de enzimas antioxidantes, possibilitando assim uma aclimação das cianobactérias (He e Häder, 2002).

Não houve diferenças significativas no teor de proteínas totais para *M. aeruginosa*, já o decréscimo das proteínas totais observado em *S. aphanizomenoides* condiz com resultados obtidos com *Anabaena* sp., também filamentosa, no qual a exposição à UV-B demonstrou um decréscimo no perfil de proteínas totais (Sinha et al., 1995).

Enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) estão envolvidas no sistema de defesa atuando na eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Beardall et al., 2009; Rastogi et al., 2014), assim, atuam de forma mais expressiva quando há um fator de estresse, porém no presente estudo não houve diferenças significativas para estas enzimas em ambas as linhagens.

Alguns fatores ambientais podem afetar as concentrações de microcistina, já é relatado que a radiação UV-B, por exemplo, reduz a concentração de microcistina em *M. aeruginosa* (Yang e Kong, 2015; Yang et. al. 2015). Entretanto os resultados demonstraram que a intensidade de UV-B utilizada nesse estudo não promoveu diferenças significativas nas concentrações de microcistina entre os tratamentos nessa linhagem.

## 5. CONCLUSÕES

Espécies diferentes apresentam padrões de resposta distintos frente ao estresse causado pela exposição à radiação UV-B. Apesar do efeito inibitório observado nos tratamentos em *M. aeruginosa*, a maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representa um dos diversos mecanismos de defesa já relatados para essa espécie. Os efeitos diferenciados observados em *S. aphanizomenoides*, também podem estar relacionados com mecanismos de proteção contra radiação UV-B. Cianobactérias datam o pré-cambriano, quando a intensidade de UV-B era extremamente elevada, portanto é natural que esses organismos tenham desenvolvido mecanismos rápidos de defesas, que foram cruciais para a sua sobrevivência. O aumento da radiação ultravioleta pode alterar a dinâmica desses organismos nos ecossistemas aquáticos podendo ocasionar um desequilíbrio nesses ambientes, com consequências até mesmo para a saúde pública. Nesse sentido, estudos com mais espécies e linhagens são necessários para melhor conhecimento da diversidade fisiológica e das respostas à radiação (UV-B), bem como as interações entre esses organismos, visto que nos ecossistemas naturais eles não estão isolados, propiciando assim uma melhor compreensão dos efeitos das mudanças climáticas nesses ambientes e suas implicações para a saúde pública.

## Conflito de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

## 421    **Agradecimentos**

422    Este estudo foi apoiado por bolsas da Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP -  
423    2014/01934-0 e 2015/17397-6).

424

## 425    **REFERÊNCIAS**

426    Babele, P. K., Singh, G., Singh, A., Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2017). UV-B  
427    radiation and temperature stress-induced alterations in metabolic events and defense  
428    mechanisms in a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Acta*  
429    *Physiologiae Plantarum*, 39: 248.

430    Beardall, J., Sobrino, C., & Stojkovic, S. (2009). Interactions between the impacts of  
431    ultraviolet radiation, elevated CO<sub>2</sub>, and nutrient limitation on marine primary producers.  
432    *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8: 1257-1265.

433    Bittencourt-Oliveira, M.C., Piccin-Santos, V., Moura, A.N., Aragão-tavares, N.K.C.,  
434    Cordeiro-Araújo, M.K. (2014). Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in  
435    public drinking supply reservoirs of Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 86: 297-309.

436    Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
437    quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:  
438    243-254.

439    Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G. (1990). Natural toxins from cyanobacteria  
440    (blue-green algae). In: Hall, S., Strichartz, G. (Eds.), *Marine Toxins, Origin, Structure*  
441    *and Molecular Pharmacology*. American Chemical Society, Washington, pp. 87

442    Chorus, I., Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water—a guide to their public health*  
443    *consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. Published on behalf of World  
444    Health Organization, London, pp. 416

- 445 De Lange, H. J., Lürling, M. (2003). Effects of UV-B irradiated algae on zooplankton  
446 grazing. *Hydrobiologia*, 491: 133-144.
- 447 Dokulil, M.T., Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438:  
448 1–12.
- 449 Guillard, R.R.L. (1973). Division rates. In: Stein, J. (ED). *Handbook of Phycological*  
450 *Methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press,  
451 Cambridge, pp. 472
- 452 Häder, D-P. (2011). Does enhanced solar UV-B radiation affect marine primary producers in  
453 their natural habitats. *Photochem. Photobiol.* 87: 263–266.
- 454 Häder, D-P., Helbling, E.W., Williamson, C.E., Worrest, R.C. (2011). Effects of UV radiation  
455 on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*  
456 10: 242-260.
- 457 Haibo, J., Qiu, B., (2005). Photosynthetic Adaptation of a bloom- forming cyanobacterium  
458 *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) To Prolonged UV-B Exposure, *Jornal of*  
459 *Phycology*, 41: 983-992.
- 460 He, Y-Y., Häder, D-P. (2002). Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria.  
461 *Photochem Photobiol Sci* 1: 729-736.
- 462 Heisler, J.P., Gilbert, J., Burkholder, J., et al. (2008). Eutrophication and harmful algal  
463 blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae* 8: 3–13.
- 464 Hillebrand, H., Dürselen, C-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T. (1999). Biovolume  
465 calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35: 403-424.
- 466 Intergovernmental Painel On Climate Change (IPCC) (2014). *Climate Change 2014: Impacts,*  
467 *Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of*  
468 *Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on*

- 469 Climate. [FIELD C.B., BARROS V.R., DOKKEN D.J. et al. (eds.)]. Cambridge  
 470 University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1132
- 471 Jana, S., Choudhuri, M.A. (1982). Glycolate metabolism of three submerged aquatic  
 472 angiosperms during aging. *Aquat. Bot.* 12: 345-354.
- 473 Kumar, J., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2016). UV-B induces biomass  
 474 production and nonenzymatic antioxidant compounds in three cyanobacteria. *J. Appl.*  
 475 *Phycol.* 28: 131-140.
- 476 Latifi, A., Ruiz, M., Zhang, C. C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS*  
 477 *microbiology reviews*, 33: 258-278
- 478 Manney, G.L., Santee, M.L., Rex, M., Livesey, N.J., Pitts, M.C., Veefkind, P., et al. (2011).  
 479 Unprecedented Arctic ozone loss in 2011. *Nature* 478: 469-475.
- 480 Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical antioxidation of  
 481 haemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247: 6960-6962.
- 482 Moon, Y-J., Kim S.I., Chung, Y-H. (2012). Sensing and Responding to UV-A in  
 483 Cyanobacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 16303-16332.
- 484 Noyma, N. P., Silva, T.P., Chiarini-garcia, H., Amado, A. M., Roland, F., Melo, R.C.N.,  
 485 (2015). Potential effects of UV radiation on photosynthetic structures of the bloom-  
 486 forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* CYRF-01, *Frontiers in*  
 487 *Microbiology*, 6: 1202.
- 488 O'neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J. (2012). The rise of harmful  
 489 cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful*  
 490 *Algae* 14: 313–334.
- 491 Paerl, H.W., Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science* 320: 57–58
- 492 Paerl, H.W., Paul, V.J. (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful  
 493 Cyanobacteria. *Water Research* 46: 1349 -1363.



- 494 Rastogi, [R.P.](#), Singh, [S.P.](#), Incharoensakdi, [A.I.](#), Häder, [D.-P.](#), Sinha, [R.P.](#) (2014). Ultraviolet  
495 radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of  
496 UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4. [S. Afr. J. Bot.](#)  
497 90: 163-169.
- 498 Reddy, J.K., Suga T., Mannaerts, G.P., Lazarow, P.B., Subramani, S. (1995). Peroxisomes:  
499 Biology and role in toxicology and disease. New York: Annals of the New York  
500 Academy of Sciences. 5: 840.
- 501 Ritchie, R.J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone,  
502 methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89: 27-41.
- 503 Singh, S.P., Häder, D.-P., Sinha, R.P. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR)  
504 stress: Mitigation strategies. *Ageing Res. Rev.* 9: 79–90.
- 505 Sinha, R. P., Kumar, H. D., Kumar, A., Häder, D. P. (1995). Effects of UV-B irradiation on  
506 growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria. *Acta*  
507 *Protozoologica*, 34: 187-187.
- 508 Sivonen, K., Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: CHORUS I., BARTRAM J. (Eds).  
509 Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences,  
510 Monitoring and Management. E & FN SPON, London, pp. 41-91.
- 511 Stewart, I., Webb, P.M., Schluter, P.J., Shaw, G.R. (2006). Recreational and occupational  
512 field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports,  
513 epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ.*  
514 *Health*, 5: 1-13.
- 515 Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L., Wang, X. (2005). Effects of enhanced ultraviolet-B  
516 radiation on algae and cyanobacteria, *Critical Reviews in Microbiology*, 31:79–89.
- 517 Yang, Z., Geng, L., Wang, W., Zhang, J. (2012). Combined effects of temperature, light  
518 intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of

- 519        *Microcystis aeruginosa* in batch culture. Biochemical Systematics and Ecology 41: 130-  
520        135.
- 521    Yang, Z., Kong, F., Shi, X., Yu, Y., Zhang, M. (2015). Effects of UV-B radiation on  
522        microcystin production of a toxic strain of *Microcystis aeruginosa* and its  
523        competitiveness against a non-toxic strain. Journal of Hazardous Materials 283: 447-453.
- 524    Yang, Z., Kong, F. (2015). UV-B exposure affects the biosynthesis of microcystin in toxic  
525        *Microcystis aeruginosa* cells and its degradation in the extracellular space. Toxins, 7(10),  
526        4238-4252.