

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 superá-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)

4

5 Eliane Christina Mota¹, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira^{1*}, Micheline Kézia Cordeiro-
6 Araújo¹

7

11

*Autor correspondente: mbitt@usp.br

12

13 Trabalho a ser submetido para: Ecotoxicology and Environmental Safety

14

15

16

17

18

19

20

21

22

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 antioxidantas (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 antioxidantas 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

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

59

60 Eliane Christina Mota¹, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira^{1*}, Micheline Kézia Cordeiro-
61 Araújo¹

62

63 ¹Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
64 Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP,
65 Brasil.

66 *Corresponding author: mbitt@usp.br

67

68 Paper to be submitted to: Ecotoxicology and Environmental Safety

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

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 (H₂O₂), 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 H₂O₂,
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 H₂O₂ concentration at 8 hours treatment, in *S. aphanizomenoides* the opposite
95 was observed, indicating a growth stimulating effect and a reduction in H₂O₂ 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.

112 1. INTRODUÇÃO

113 Cianobactérias são organismos procariotos, fotossintetizantes de ocorrência natural em
114 ecossistemas aquáticos de todo o mundo, constituindo uma parte importante da comunidade
115 fitoplanctônica (Sivonen e Jones, 1999). Algumas condições ambientais como intensidade e
116 radiação luminosa, temperatura e concentrações de nutrientes podem favorecer a dominância
117 de cianobactérias dentro do fitoplâncton e ocasionar a formação de florações ou "Blooms",
118 que é o aumento excessivo na densidade populacional desses organismos (Stewart et al.,
119 2006; Heisler et al., 2008; Bittencourt-Oliveira et al., 2014). Tais organismos são capazes de
120 produzir diversos compostos secundários, dentre eles várias toxinas chamadas de cianotoxinas
121 (Carmichael, 1990). O potencial de produção de cianotoxinas pelas cianobactérias demonstra
122 que a ocorrência de florações é um grave problema para os ecossistemas aquáticos e também
123 para a saúde humana. Dessa forma, os estudos sobre fatores como intensidade luminosa e
124 radiação ultravioleta envolvidos no desenvolvimento e resposta de cianobactérias produtoras
125 de cianotoxinas são de suma importância, pois podem alertar sobre os riscos de acidentes de
126 intoxicação e até mesmo contribuir com manejo dos ecossistemas aquáticos.

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

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

141 Os efeitos mais nocivos da radiação UV em células vivas são geralmente atribuídas à
142 radiação solar ultravioleta UV-B (Moon et al., 2012), a qual pode afetar vários processos
143 fisiológicos e bioquímicos em cianobactérias e, consequentemente, alterar a estrutura e função
144 da comunidade de todo um ecossistema (Häder, 2011). Em adição a isso, tem sido relatado
145 que a radiação UV-B pode inibir a atividade fotossintética em cianobactérias (Rastogi et al.,
146 2014; Yang et al., 2015).

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

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

161

162 2. MATERIAIS E MÉTODOS

163 2.1 *Culturas e condições de cultivo*

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

172

173 2.2. *Desenho experimental*

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

183

184 2.3 *Crescimento*

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

187 *aeruginosa* e $y = 1E-07x - 0,0006$ para *S. aphanizomenoides*) e contagem em microscopia
188 celular com aliquotas retiradas das culturas a cada 2 dias. Para a contagem celular por
189 microscopia, as amostras foram preservadas com solução de lugol acético 10%. A
190 confirmação da densidade celular (cel mL^{-1}) por contagem em câmaras Fuchs-Rosenthal em
191 microscópio binocular (Nikon E200, USA) foi realizada de acordo com Chorus e Bartram
192 (1999).

193

194 2.4. Determinação do teor de clorofila

195 Para a determinação do teor de clorofila, 10 mL de cada tratamento foram coletadas a
196 cada 2 dias e centrifugados em baixa rotação (2200 x g) em temperatura ambiente por 5 min.
197 O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (biomassa) ressuspensionado em 3 mL de acetona P.A..
198 Para a extração da clorofila, a mistura foi acondicionada em escuro a -20 °C por 2h. Após esta
199 etapa, a solução de extração foi centrifugada a 2200 x g por 5 min e o sobrenadante lido em
200 absorbâncias de 663 e 647 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Biospectro SP-22). A
201 concentração de clorofila foi calculada de acordo com Ritchie (2006).

202

203 2.5 Alterações morfológicas, biovolume e biomassa

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

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

215

216 *2.6. Espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes*

217 Para as análises de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes,
218 foram coletados 40 mL de amostra de cada tratamento no 12º dia do experimento. Para
219 determinação da formação intracelular de H₂O₂ por *M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* foi
220 utilizado o método proposto por Jana e Choudhuri (1982) com algumas modificações. Um
221 minuto após a incubação, uma cor vermelha-alaranjada da mistura foi medida em 410 nm. A
222 concentração de peróxido de hidrogênio foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de
223 0,28 L mmol⁻¹ cm⁻¹.

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

228 A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com Reddy et al. (1995) e
229 apresentada em nkat mg⁻¹ proteínas. Sendo mudança na absorbância por minuto proporcional
230 à atividade da enzima. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada
231 espectrofotometricamente de acordo com Misra e Fridovich (1972) e foi apresentada em nkat
232 mg⁻¹ proteínas.

233

234 *2.7. Determinação da concentração de microcistinas*

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

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

241

242 *2.8. Análise estatística dos dados*

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

249

250 **3. RESULTADOS**

251 *3.1. Densidade celular*

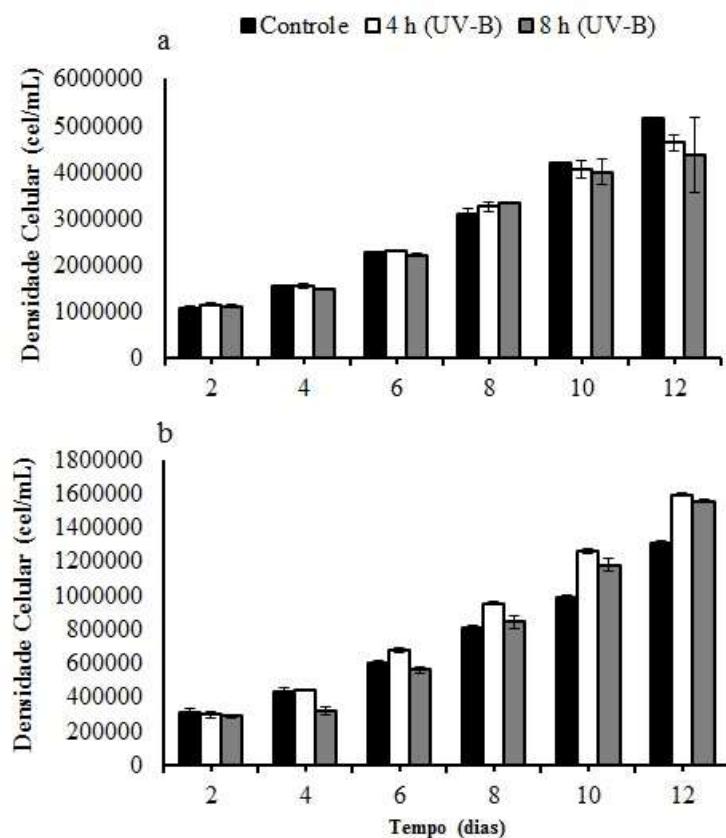
252 A densidade celular das linhagens de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) e *S.*
253 *aphanizomenoides* (BCCUSP55) expostas diariamente à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e
254 8 horas apresentaram respostas diferenciadas entre as espécies (Figura 1a-b). Para *M.*
255 *aeruginosa* o tratamento com 8 h de exposição promoveu uma redução na densidade celular
256 em relação ao controle, apresentando significância no 12º dia de cultivo (Figura 1a).
257 Entretanto, para *S. aphanizomenoides* o oposto foi observado, ou seja, houve um aumento
258 gradativo na densidade celular observada a partir do 6º dia de cultivo para o tratamento de
259 exposição de 4 h, e a partir do 10º dia de cultivo para o tratamento de 8 h, indicando que nessa
260 linhagem os tratamentos estimularam o crescimento (Figura 1b).

261

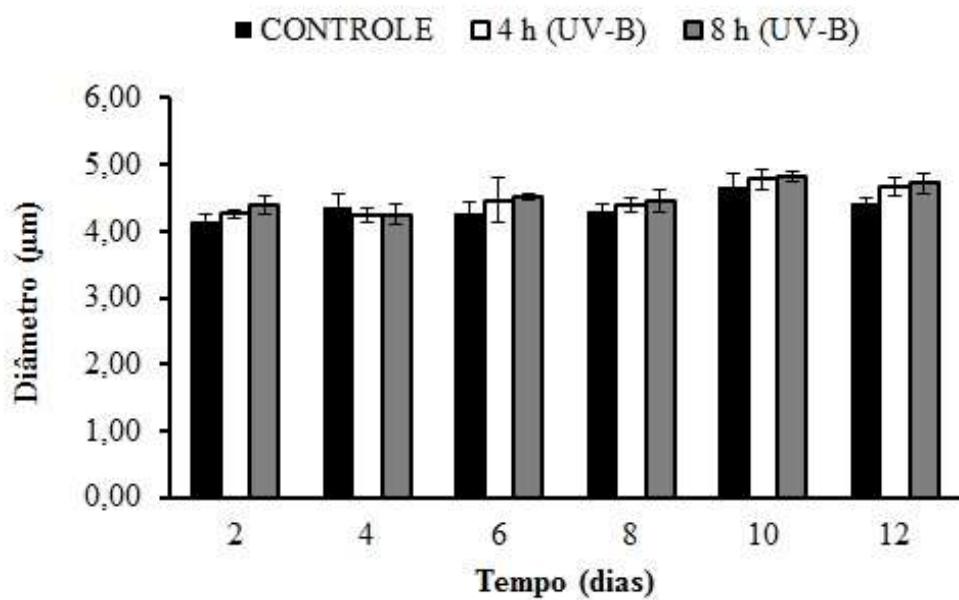
262 3.2. Análise morfométrica, biovolume e biomassa

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

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

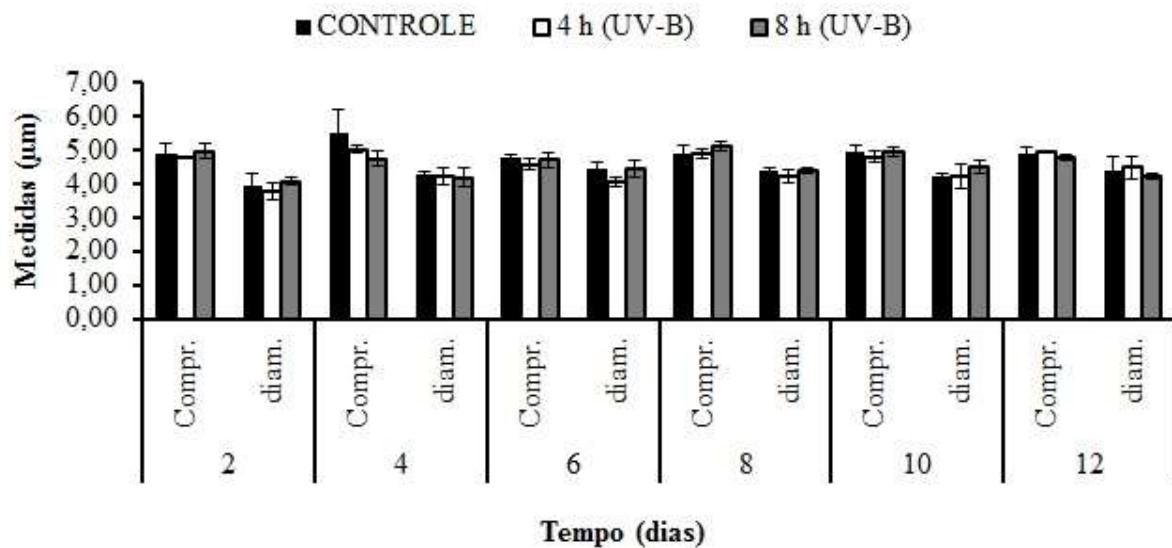


272 **Figura 1.** Densidade celular (cel/mL) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S.*
 273 *aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), expostas à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As
 274 barras de erro representam a média ± desvio padrão ($n=3$).



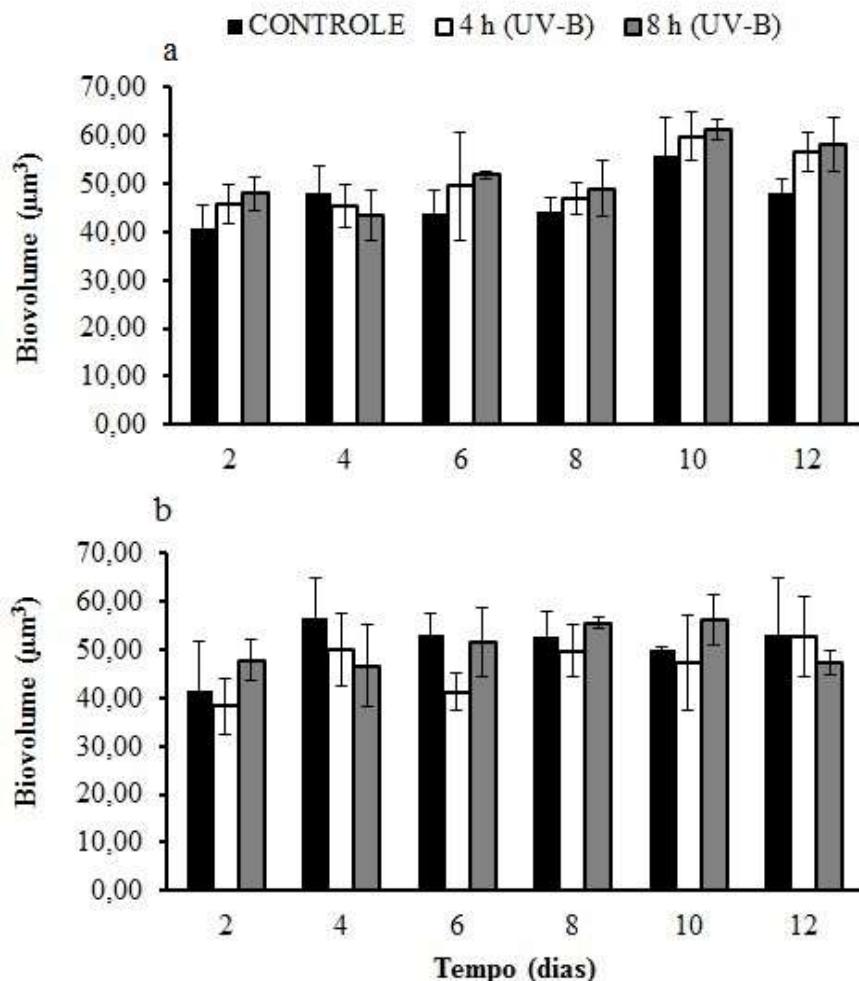
275 **Figura 2.** Diâmetro celular de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) durante experimento de
 276 exposição à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As barras de erro representam a média ±
 277 desvio padrão ($n=30$).

278



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 ± desvio padrão ($n=30$).

282



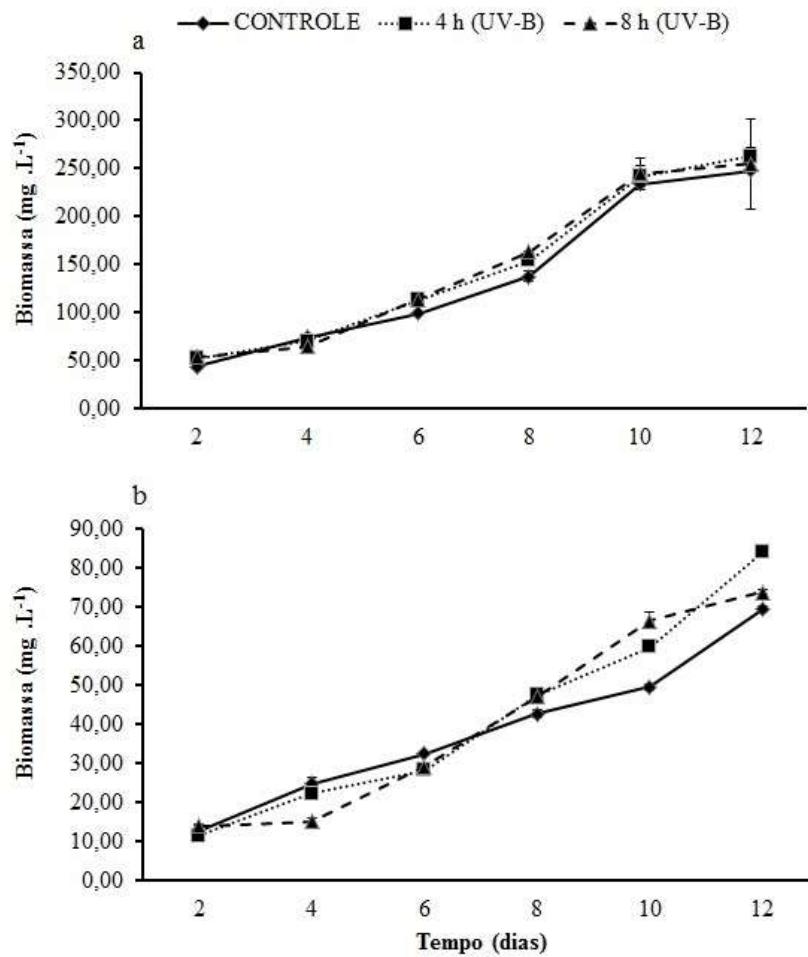
283

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

287

288 Os dados de biomassa para *M. aeruginosa* não apresentaram diferenças significativas
 289 (Figura 5a). Já em *S. aphanizomenoides* houve aumento na biomassa com diferenças
 290 significativas para ambos os tratamentos (4 e 8 h) a partir do 6º dia, sendo que o tratamento de
 291 4 h foi o que promoveu o maior aumento na biomassa (Figura 5b). Isso demonstra que neste
 292 tempo de exposição a biomassa da espécie foi influenciada positivamente pela combinação de
 293 UV-B.

294



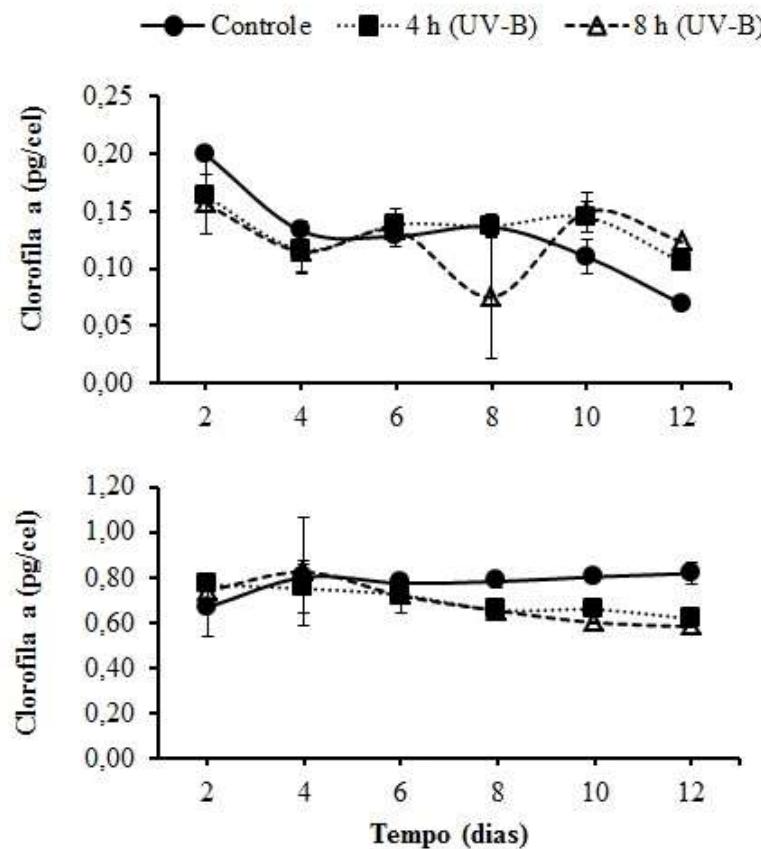
295

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

299

300 3.3 Teor de clorofila a:

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



307

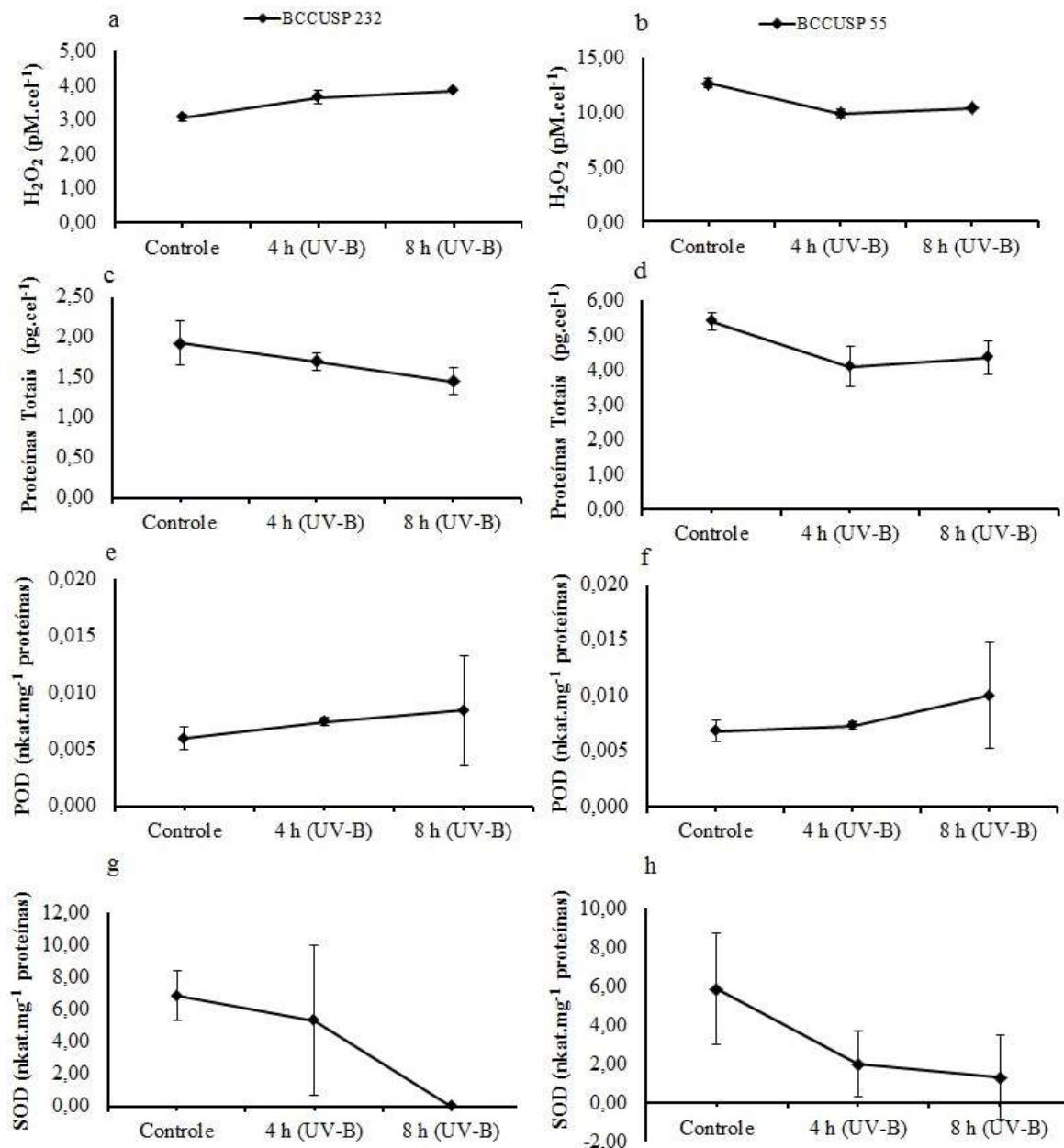
308 **Figura 6.** Teor de clorofila a (pg/cel) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S.*
 309 *aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), expostas à radiação ultravioleta (UV-B) por 4 e 8 h. As
 310 barras de erro representam a média ± desvio padrão ($n=3$).

311

312 *3.4 Espécies reativas de oxigênio, proteínas totais e atividade de enzimas antioxidantes:*

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

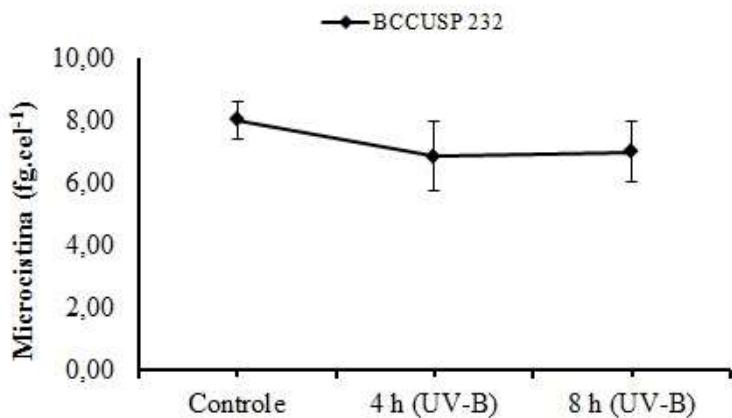
319 superóxido dismutase - SOD (Figura 7g-h) não apresentaram diferenças significativas para
 320 ambas as linhagens.



321 **Figura 7.** Concentração interna de H_2O_2 (pM cel^{-1}) de *M. aeruginosa* (BCCUSP232) (a) e *S.*
 322 *aphanizomenoides* (BCCUSP55) (b), proteínas totais (pg cel^{-1}) de *M. aeruginosa* (c) e *S.*
 323 *aphanizomenoides* (d), atividade da enzima peroxidase - POD (nkat mg^{-1} proteínas) de *M.*
 324 *aeruginosa* (e) e *S. aphanizomenoides* (f), atividade da enzima superóxido dismutase - SOD
 325 (nkat mg^{-1} 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 ± desvio padrão ($n=3$).

327 3.5 Concentrações de microcistina:

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



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

334

335 **4. DISCUSSÃO**

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

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

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

349 Para *S. aphanizomenoides* o oposto foi observado, a exposição à UV-B para ambos os
350 tratamentos estimulou o crescimento populacional, sendo que no tratamento de 8 h, esse
351 estímulo foi mais tardio (10º dia de cultivo). A literatura carece de estudos que avaliem o
352 efeito da radiação UV-B nesta espécie, porém estudos com outras espécies filamentosas
353 mostram efeitos distintos, como em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya
354 & Subba Raju, que a exposição à altas doses de radiação UV-B, provocou morte celular,
355 danos nas estruturas fotossintéticas e consequente redução do crescimento (Noyma et. al
356 2015).

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

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

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

371 de promover tais alterações. Já o resultado obtido para biomassa, pode estar relacionado ao
372 efeito estimulatório que os tratamentos com UV-B provocaram nesta linhagem. Kumar et al.
373 (2016), em estudos com cianobactérias filamentosas observaram que o tratamento com UV-B
374 a uma intensidade de $0,045 \text{ Wm}^{-2}$, teve efeito estimulante na acumulação de biomassa.

375 *M. aeruginosa* e *S. aphanizomenoides* apresentaram padrões distintos quanto à
376 concentração interna de H_2O_2 , os resultados obtidos para ambas as linhagem se relacionam
377 com os dados de densidade encontrados no presente estudo. O aumento na concentração
378 interna de H_2O_2 em *M. aeruginosa* demonstra que a radiação UV-B utilizada provocou um
379 estresse oxidativo que refletiu em seu crescimento, enquanto que *S. aphanizomenoides*
380 apresentou uma concentração de H_2O_2 ainda menor que o controle, demonstrando um efeito
381 estimulatório quando exposta à radiação UV-B. As espécies reativas de oxigênio (ROS), tais
382 como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produzidas em situações de estresse, sendo
383 responsáveis por danos oxidativos (Latifi et. al., 2009), porém atua como molécula sinal para
384 a regulação de genes fotossintéticos e indução de enzimas antioxidantes, possibilitando assim
385 uma aclimatação das cianobactérias (He e Häder, 2002).

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

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

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

400

401 5. CONCLUSÕES

402 Espécies diferentes apresentam padrões de resposta distintos frente ao estresse causado
403 pela exposição à radiação UV-B. Apesar do efeito inibitório observado nos tratamentos em *M.*
404 *aeruginosa*, a maior concentração de H₂O₂ representa um dos diversos mecanismos de defesa
405 já relatados para essa espécie. Os efeitos diferenciados observados em *S. aphanizomenoides*,
406 também podem estar relacionados com mecanismos de proteção contra radiação UV-B.
407 Cianobactérias datam o pré-cambriano, quando a intensidade de UV-B era extremamente
408 elevada, portanto é natural que esses organismos tenham desenvolvido mecanismos rápidos
409 de defesas, que foram cruciais para a sua sobrevivência. O aumento da radiação ultravioleta
410 pode alterar a dinâmica desses organismos nos ecossistemas aquáticos podendo ocasionar um
411 desequilíbrio nesses ambientes, com consequências até mesmo para a saúde pública. Nesse
412 sentido, estudos com mais espécies e linhagens são necessários para melhor conhecimento da
413 diversidade fisiológica e das respostas à radiação (UV-B), bem como as interações entre esses
414 organismos, visto que nos ecossistemas naturais eles não estão isolados, propiciando assim
415 uma melhor compreensão dos efeitos das mudanças climáticas nesses ambientes e suas
416 implicações para a saúde pública.

417

418 **Conflito de interesse**

419 Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

420

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 CO₂, 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*. Cambrige University Press,
451 Cambrige, 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., Pollingher, 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 ultravioleta 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 nitrogenconcentration on the growth and polysaccharide contente 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.