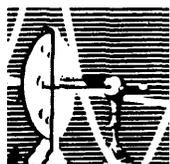


**MARIA ELISÂNGELA
VENÂNCIO DOS SANTOS**

**EFEITO DO EXUDATO NA AUTOREGULAÇÃO
FISIOLÓGICA DE *MICROCYSTIS SP.***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maria Elisângela Venâncio dos Santos

EFEITO DO EXUDATO NA AUTOREGULAÇÃO
FISIOLÓGICA DE *MICROCYSTIS SP.*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Biofísica)

Orientadora: Dra. Sandra M. F. O. Azevedo

Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Maria Elisângela Venâncio.

Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de *Microcystis sp.*

/ Maria Elisângela Venâncio dos Santos. Rio de Janeiro, 2009.

IX, 86 p.: 19 figuras e 05 tabelas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientadora: Dra. Sandra M. F. O. Azevedo

1. *Microcystis*. 2. *Starvation*. 3. Fisiologia.
4. Microcistinas. 5. Exudato. 6. Crescimento.

I. Azevedo, Sandra M. F. O. II. Universidade Federal do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Biofísica) III. Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de
Microcystis sp.

Maria Elisângela Venâncio dos Santos

EFEITO DO EXUDATO NA AUTOREGULAÇÃO
FISIOLÓGICA DE *MICROCYSTIS SP.*

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2009

Orientadora:

(Dr^a. Sandra M. F. de Oliveira e Azevedo, IBCCF - UFRJ)

Avaliadores:

(Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage , IBCCF - UFRJ)

(Dr^a.Eliane de Oliveira Ferreira, Microbiologia – UFRJ)

(Dr. Jean Remy Davée Guimarães - IBCCF - UFRJ)

Revisora:

(Dra. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco - UFRJ)

Agradecimentos

- A Deus por me dar força para enfrentar os meus impossíveis e principalmente por me dar a oportunidade da experiência da vida, infinitamente mais importante que as realizadas *in vitro*.
- Aos meus pais Décio e Dora por estarem ao meu lado em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, colaborando em todas as minhas escolhas.
- Ao Daniel, por compartilhar o mesmo desejo de felicidade, amor e união e por realizar comigo minha maior experiência: a de formar e conduzir uma família.
- À toda minha família (irmãos, cunhadas e sobrinhos), que tem dado o apoio necessário ao cuidado dos meus pequenos, contribuindo de forma indireta, mas com igual importância na realização deste trabalho.
- A Daniel, Fillipe e Miguel, meus presentes divinos, concretizados na forma de filhos por toda alegria que trazem ao meu coração.
- À professora Sandra Azevedo, por ter acreditado em mim antes que eu mesma acreditasse, pelo carinho, pela confiança, e por saber adequar sua orientação de acordo com a realidade particular de cada aluno.
- À professora Valéria Magalhães, pela atenção dedicada na “fase lag” deste trabalho (fase grávida). Pelos pepinos, alfaces americanas e por todo afeto contido neles. Eu e o Miguel agradecemos, por isso, e muito mais.
- À Priscila por dividir comigo, as mesmas angústias e incertezas, multiplicando na mesma proporção, o apoio e a amizade.
- À Lua, pela gentil ajuda com as análises por ELISA.
- À Andréia, pela ajuda com as análises no HPLC e pelo empréstimo da potência contida embaixo dos seus cachinhos.
- A todos os amigos: alunos, professores e colaboradores do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF: Bel, Rodrigo, Roberta, Ronaldo, Ramon, Beta, Bárbara, Pedro, Vítor, Bobby, Daniel, Raquel, Simone, Gilmar, Carol, Levi, Bil, prof. Luis Otávio, prof.^a Ana Lúcia e prof.^a Ana Cláudia.
- À prof. Ana Beatriz pela dedicação e pelo cuidado na revisão deste trabalho.
- Ao CNPQ e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Efeito do exudado na autoregulação fisiológica de *Microcystis sp.*

Quorum sensing é um processo de comunicação celular que desempenha uma função central na fisiologia de microrganismos. Muitas bactérias utilizam este sistema e coordenam suas atividades de forma semelhante a organismos multicelulares. O presente estudo visou investigar se cianobactérias utilizam moléculas sinalizadoras de quorum sensing, para regular sua fisiologia, bem como a entrada da população na fase estacionária de crescimento, como já constatado em outras bactérias. Para a realização deste estudo, uma cepa de *Microcystis sp.*(MILJ-48) foi cultivada em meios previamente condicionados por ela própria (exudatos), obtidos a partir de diferentes estágios de crescimento. Para avaliar o efeito de maiores concentrações do exudato, foi realizado também um experimento com a adição de exudatos concentrados em 100 e 50x aos cultivos. Os efeitos produzidos pelos exudatos foi verificado através de avaliações: do crescimento celular, por meio de contagem de células; da variação da concentração de clorofila a e da variação das concentrações de microcistinas, utilizando-se o método de imunoensaio enzimático (ELISA) para detecção das microcistinas totais e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), para detecção da microcistina intracelular. Foi demonstrada uma inibição do crescimento celular com todos os exudatos testados, em relação ao controle. O efeito mais acentuado foi obtido com exudato do 6º dia de crescimento (fase esponencial). Não foi verificado aumento do efeito através da concentração deste exudato. Os cultivos não apresentaram inibição na produção de clorofila a. A adição de exudado ao cultivo resultou em agregação celular e clorose, fenômenos típicos de culturas em fase estacionária ou em limitação de nutrientes. Uma correlação positiva entre produção de toxina e inibição do crescimento é aparente. É sugerido que a cepa de *Microcystis sp.*(MILJ-48) promove a liberação de um sinal ainda desconhecido que interfere na sua própria divisão celular; levantamos a hipótese da participação da microcistina nesta sinalização.

ABSTRACT

Effect of exudates on the physiological self *Microcystis* sp.

Quorum sensing is a process of cell communication that plays a central role in the physiology of microorganisms. Many bacteria use this system and coordinate their activities in a manner similar to multicellular organisms. This study aimed to investigate whether cyanobacteria use signaling molecules of quorum sensing to regulate their physiology, and the entry of the population in stationary phase of growth, as already observed in other bacteria. For this study, a strain of *Microcystis* sp. (Milj-48) was grown in media previously conditioned by itself (exudatos), obtained from different stages of growth. To evaluate the effect of higher concentrations of exudato, was also an experiment with the addition of exudatos focused on 100 and 50x for crops. The effects produced by exudatos was verified by assessment: cell growth, by counting the cells, the variation of the concentration of chlorophyll a and varying the concentrations of microcystins, using the method of enzyme immunoassay (ELISA) for detection of total microcystins and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for detection of intracellular microcystin. It demonstrated an inhibition of cell growth with all exudatos tested on the control. The most pronounced effect was obtained with exudato the 6th day of growth (phase exponencial). There was no effect by increasing the concentration of this exudato. The cultures showed no inhibition in the production of chlorophyll a. The addition of the exudato cultivation resulted in cell aggregation and chlorosis, phenomena typical of cultures in stationary phase or in limitation of nutrients. A positive correlation between production of toxin and inhibition of growth is apparent. It is suggested that the strain of *Microcystis* sp. (Milj-48) promotes the release of a yet unknown signal that interferes with their own cell division, we raise the possibility of involvement of this signaling microcystin.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1- <u>INTRODUÇÃO</u> | 01 |
| 1.1- <i>Quorum-sensing</i> | 01 |
| 1.1.1- Modelos de <i>quorum sensing</i> | 05 |
| 1.1.1.1- Em bactérias gram-negativas: acil-homoserinas lactonas..... | 05 |
| 1.1.1.2- Em bactérias gram-positivas: peptídeos curtos..... | 06 |
| 1.1.2- <i>Quorum-sensing</i> e Limitação de Nutrientes..... | 08 |
| 1.2- Cianobactérias..... | 10 |
| 1.3- Microcistinas..... | 11 |
| 1.4- Cianobactérias e limitação de nutrientes..... | 12 |
| 1.5- <i>Quorum-sensing</i> em cianobactéria..... | 14 |
| 1.6- Microcistinas e limitação de nutrientes..... | 16 |
| 1.7- Microcistinas: função ecológica ou fisiológica?..... | 18 |
| 1.8- Justificativa do estudo..... | 21 |
| | |
| 2-<u>OBJETIVOS</u> | 22 |
| 2.1-Objetivo geral..... | 22 |
| 2.2- Objetivos específicos..... | 22 |
| | |
| 3- <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> | 23 |
| 3.1- Cepa utilizada..... | 23 |
| 3.2- Condições de cultivo..... | 24 |
| 3.3- Avaliação do efeito dos exudatos de diferentes fases de crescimento sobre a fisiologia de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48)..... | 24 |
| 3.4- Avaliação do efeito de concentrados do exudato do 6 ^o dia sobre a fisiologia de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48)..... | 26 |
| 3.5- Parâmetros fisiológicos analisados..... | 30 |
| 3.5.1- Contagem de células para a determinação da taxa de crescimento, tempo médio de duplicação, razão máxima de crescimento e rendimento máximo das culturas..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.2- Determinação da concentração de clorofila <u>a</u> | 31 |
| 3.6– Análises da produção de microcistinas..... | 32 |
| 3.6.1- Método de imunoenensaio enzimático- ELISA..... | 32 |
| 3.6.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)..... | 32 |
| 3.7- Tratamento estatístico dos dados..... | 35 |
| 4- <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>..... | 36 |
| 4.1- Avaliação do efeito dos exudatos de diferentes fases de crescimento sobre a fisiologia de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48)..... | 36 |
| 4.1.1-Crescimento Celular..... | 36 |
| 4.1.2- Produção de microcistina total..... | 40 |
| 4.2- Avaliação do efeito de concentrados do exudato do 6 ^o dia sobre a fisiologia de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48)..... | 45 |
| 4.2.1- Crescimento celular..... | 45 |
| 4.2.2- Agregação celular..... | 49 |
| 4.2.3- Variação na concentração de Clorofila <u>a</u> | 51 |
| 4.2.4-Concentração de microcistina intracelular..... | 53 |
| 4.3- Análise da concentração de microcistina no meio extracelular..... | 56 |
| 4.4- Microcistina como sinalizador de densidade populacional..... | 60 |
| 5- <u>CONCLUSÕES</u>..... | 67 |
| 6- <u>PERSPECTIVAS FUTURAS</u>..... | 69 |
| 6.1- Experimento com adição de microcistina às culturas de <i>Microcystis</i> sp..... | 69 |
| 6.2- Experimento utilizando os exudatos de uma cepa de <i>Microcystis</i> sp. não produtora de microcistina..... | 70 |
| 6.3- Investigação da possível via de sinalização da microcistina..... | 71 |
| 7- <u>BIBLIOGRAFIA</u>..... | 73 |

ÍNDICE DE FIGURAS.....pág.

| | |
|--|----|
| <u>Figura1-</u> Representantes de autoindutores bacterianos | 04 |
| <u>Figura 2-</u> Estratégias de autoindução..... | 07 |
| <u>Figura 3-</u> Estrutura química geral da microcistina | 12 |
| <u>Figura 4-</u> Foto da Cepa de <i>Microcystis sp</i> (MIJAC -1) | 23 |
| <u>Figura 5-</u> Esquema representativo do experimento 1- Avaliação do efeito dos exudatos de diferentes fases de crescimento sobre a fisiologia de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48). | 26 |
| <u>Figura 6-</u> Esquema representativo do experimento 2- Avaliação do efeito de concentrados do exudato do 6 ^o dia sobre a fisiologia de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48)..... | 29 |
| <u>Figura 7-</u> Gráfico: curvas de crescimento dos cultivos de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) do experimento 1..... | 37 |
| <u>Figura 8</u> – Gráfico: variação do rendimento máximo de células em cultivos de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) no experimento 1..... | 39 |
| <u>Figura 9</u> – Gráfico: variação da taxa de crescimento celular em cultivos de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) no experimento 1..... | 39 |
| <u>Figura 10(A)-</u> Gráfico: variação temporal da concentração de microcistina total (ng/10 ⁵ células) em culturas de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) no experimento1..... | 41 |
| <u>Figura 10(B)-</u> Gráfico: concentração de microcistina total (ng/10 ⁵ células) em culturas de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) no experimento 1, de acordo com os dias amostrais | 42 |
| <u>Figura 11-</u> Gráfico: porcentagem de microcistina: ng/10 ⁵ células detectada nos cultivos de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) no experimento1, em relação à condição controle..... | 43 |
| <u>Figura 12-</u> Gráfico: curvas de crescimento de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) da condição controle e dos cultivos em exudatos do 6 ^o dia concentrados em 100x e 50x..... | 46 |
| <u>Figura 13-</u> Gráfico: variação do rendimento máximo de células dos cultivos de <i>Microcystis sp.</i> (MILJ-48) no experimento 2..... | 48 |

| | |
|---|----|
| <u>Figura 14</u> - Gráfico: variação da taxa de crescimento celular dos cultivos de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48) no experimento 2..... | 48 |
| <u>Figura 15</u> - Foto: Efeito de agregação celular observado no experimento 2, nos cultivos em exudatos do 6º dia (A) e a condição controle (B)..... | 49 |
| <u>Figura 16</u> - Gráfico: variação da concentração de Clorofila <u>a</u> em cultivos de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48) no experimento 2..... | 52 |
| <u>Figura 17(A)</u> - Gráfico: produção de microcistina intracelular- $\mu\text{g}/10^5$ células em cultivos de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48), de acordo com os dias amostrais do experimento 2..... | 54 |
| <u>Figura 17(B)</u> - Gráfico: variação da concentração de microcistina intracelular- $\mu\text{g}/10^5$ células em cultivos de <i>Microcystis</i> sp. (MILJ-48), de acordo com as condições experimentais do experimento 2..... | 55 |
| <u>Figura 18</u> - Gráfico: porcentagem da concentração de microcistina intracelular- $\mu\text{g}/10^5$ células detectada nos cultivos crescidos em exudatos do experimento 2, em relação à condição controle..... | 56 |
| <u>Figura 19(A)</u> - Gráfico: variação da concentração de microcistina extracelular- ng/mL da cepa MILJ-48 crescida em meio ASM-1..... | 57 |
| <u>Figura 19(B)</u> - Gráfico: variação da concentração de microcistina extracelular- $\text{ng}/10^5$ células da cepa MILJ-48 crescida em meio ASM-1..... | 57 |

ÍNDICE DE TABELAS.....pág.

Tabela 1- Exemplos de sistemas de comunicação célula-célula em bactérias.....03

Tabela 2- Descrição dos componentes do sistema HPLC utilizado (Shimadzu)...34

Tabela 3- Descrição das condições de cromatografia analítica utilizadas.....34

Tabela 4- Taxas fisiológicas obtidas a partir da curva de crescimento do experimento1.....38

Tabela 5- Taxas fisiológicas obtidas a partir da curva de crescimento do experimento2.....47

Não se preocupe com as respostas, pois elas são muitas.

Preocupe-se com a tua pergunta porque ela é única.

Mário Quintana

*Dedico àquela que está sempre ao meu lado, torcendo, aconselhando,
confortando, animando, trabalhando, ajudando, abraçando, rezando,
amando...*

Sua vida tem me ensinado muito mais que as teses e trabalhos que li.

Meu maior exemplo de amizade

Minha melhor medida de amar

Minha mãe.

1-INTRODUÇÃO

1.1- *Quorum sensing*

Muitos conceitos relacionados à vida bacteriana foram modificados nas últimas décadas. Anteriormente, as bactérias eram consideradas como populações de células que agiam independentemente. Atualmente, sabe-se que existem diversas interações e comunicação entre as células, gerando um comportamento coordenado. (Reading & Sperandio, 2006; Waters & Bassler, 2005).

Quorum sensing é um processo de comunicação celular que desempenha uma função central na fisiologia e no desenvolvimento de microrganismos. As bactérias, mesmo sendo unicelulares, coordenam suas atividades de forma semelhante a organismos multicelulares. Essa coordenação ocorre por meio da produção e liberação de moléculas sinalizadoras e o acúmulo extracelular desses sinais ocorre com o aumento da densidade populacional (Reading & Sperandio, 2006; Federle & Bassler, 2003; Waters & Bassler, 2005).

O primeiro relato do sistema *quorum sensing* foi reportado na bactéria *Vibrio fischeri* (Eberherd *et al.*, 1981). Quando esta bactéria se desenvolve livremente na água do mar, não se observa a formação de luz (bioluminescência). No entanto, quando crescida até altas concentrações celulares, *V. Fischeri* produz bioluminescência com luz azul-esverdeada. Normalmente, este microrganismo é encontrado em interações simbióticas com peixes e moluscos, especialmente com a espécie *Euprymna scolopes*,

na qual a bactéria se desenvolve até altas concentrações celulares, o que leva à formação de luz.

Quorum sensing é um fenômeno que favorece também o acesso a nutrientes ou a nichos ambientais mais favoráveis, permitindo que as bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos, além de aumentar a sua capacidade de se diferenciarem em formas mais adaptadas a sobreviverem em ambientes hostis, onde as condições de crescimento são restritivas (Waters & Bassler, 2005).

O sistema de *quorum sensing* regula uma série de características fenotípicas (tab.1), incluindo a produção de antibióticos, formação de biofilme, diferenciação celular, competência genética, crescimento celular, produção de pigmento, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade, produção de toxina e expressão de fatores de virulência (Waters & Bassler, 2005).

De acordo com Waters & Bassler (2005) dentre as moléculas sinalizadoras três classes estão bem definidas (Fig.1): a) Derivadas de ácidos graxos, N-acil homoserinas lactonas (AHLs), utilizadas por bactérias gram-negativas para a comunicação intraespecífica; b) Pequenos peptídeos utilizados por bactérias gram-positivas; c) Furanonas (AI-2), produzidas por bactérias gram-negativas e gram-positivas, utilizadas para comunicação intra e interespecífica, sendo consideradas moléculas sinalizadoras universais. Outros sistemas de sinalização também existem como no caso de estreptomicetos que utilizam γ -butirolactonas como autoindutores. Além das moléculas sinalizadoras citadas, dipeptídeos cíclicos, como dicetopiperazinas (DKPs) (Degrassi *et*

al., 2002) e 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), podem estar envolvidos em processos de sinalização celular como é o caso em *Pseudomonas* (Pesci et al.,1999).

Entretanto, os tipos de moléculas sinalizadoras que as bactérias produzem e às quais respondem para se adaptarem em seu ambiente, ainda estão sendo explorados (Keller e Surette,2006).

Tabela1- Exemplos de sistemas de comunicação célula-célula em bactérias

| Gênero | Fenótipo | Sinal molecular |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Formação de biofilme | C4-HSL |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Conjugação | 3-oxo-C8-HSL |
| <i>Bacillus sp.</i> | Competência genética | Peptídeos |
| <i>Erwinia caratovora</i> | Produção de antibiótico | 3-oxo-C6-HSL |
| <i>Escherichia coli</i> | Divisão celular | ? |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | Emergência da fase lag | 3-oxo-C12-HSL |
| <i>Streptomyces</i> | Produção de antibióticos | γ -Butirolactona |
| <i>Streptococcus</i> | Virulência | peptídeos |
| <i>Vibrio fischeri</i> | Bioluminescência | 3-oxo-C10-HSL |

(Gera & Srivastava, 2006).

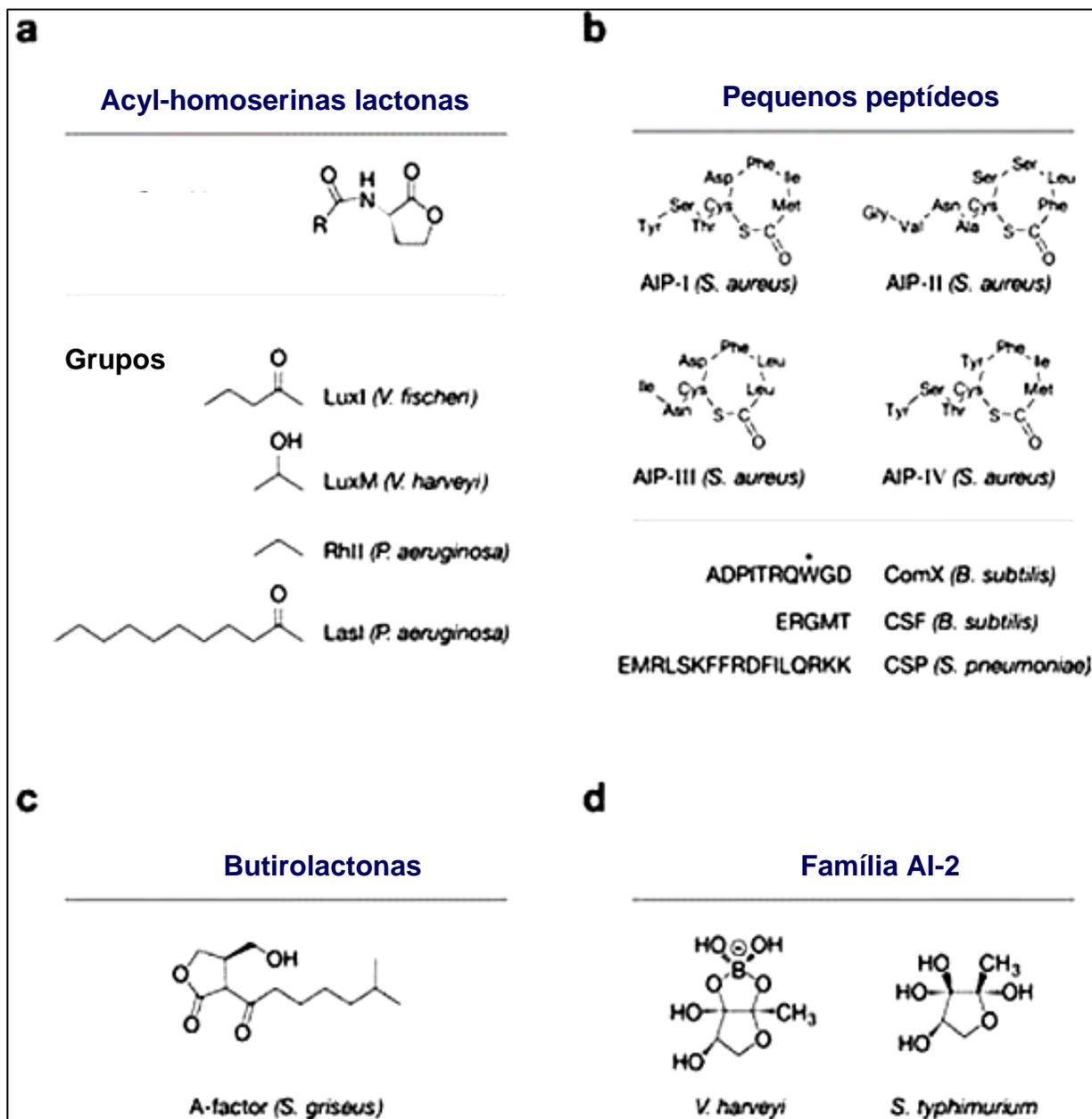


Figura 1: Representantes de autoindutores bacterianos. a) N-acil homoserinas lactonas (AHLs), utilizadas por bactérias gram-negativas; b) Pequenos peptídeos utilizados por bactérias gram-positivas; c) γ -butirolactonas utilizadas por estreptomicetos d) Furanonas (AI-2), produzidas por bactérias gram-negativas e gram-positivas. (Waters & Bassler, 2005).

1.1.1.- Modelos de *Quorum sensing*

1.1.1.1- Em bactérias gram-negativas: acil-homoserinas lactonas

Os mecanismos de *quorum sensing* (QS) mais estudados são os encontrados nas bactérias gram-negativas, que usam os autoindutores conhecidos como homoserinas lactonas aciladas como moléculas sinalizadoras. As proteínas que sintetizam esses autoindutores constituem uma família de homólogos conhecidos como sintetases de autoindutores LuxI. As proteínas receptoras do sinal formam uma outra família conhecida como reguladores transcricionais LuxR (Federle & Bassler, 2003)

A molécula de AHL sintetizada se difunde livremente pela membrana da célula. Assim, a concentração de AHL no meio intra e extracelular torna-se equivalente, sendo que essa concentração aumenta proporcionalmente com o aumento da densidade celular. Ao atingir uma concentração crítica, o autoindutor liga-se à proteína LuxR. Após a interação com a AHL específica, a proteína LuxR liga-se a promotores específicos do DNA e ativa a transcrição dos genes alvo (fig.2) (Federle & Bassler, 2003).

Existem dois tipos de enzimas capazes de inativar a sinalização mediada por AHL: AHL lactonases que hidrolizam uma das ligações do anel de lactona e inativam a AHL e lactona acilases que clivam o anel de lactona a partir do grupamento acil (Federle & Bassler, 2003).

1.1.1.2- Em bactérias gram-positivas: peptídeos curtos

As bactérias Gram-positivas não fazem uso de AHLs para se comunicar, mas produzem e transportam oligopeptídeos autoindutores (AIPs) para o meio extracelular. Além disso, a membrana plasmática não é permeável a AIPs, sendo necessária a existência de transportadores na superfície celular para que ocorra sua liberação no meio externo (Federle & Bassler, 2003).

A detecção de AIPs é mediada por sistemas de dois componentes, que existem em uma ampla variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Esses circuitos são responsáveis por detectar flutuações no ambiente externo e transferir a informação para o interior da célula (Federle & Bassler, 2003).

O sistema funciona por meio de uma cascata de fosforilação e envolve um sensor quinase e uma proteína regulatória de resposta a qual pode ligar-se ao DNA e regular a transcrição dos genes alvo. Os AIPs são os ligantes para os sensores quinases e a cascata de fosforilação transmite informação em cadeia para a célula sobre a densidade populacional (fig.2). Como na sinalização regulada por AHL, as diferenças entre os ligantes e, nesse caso, a diferença entre as seqüências dos AIPs, conferem especificidade a esse sistema de comunicação (Federle & Bassler, 2003).

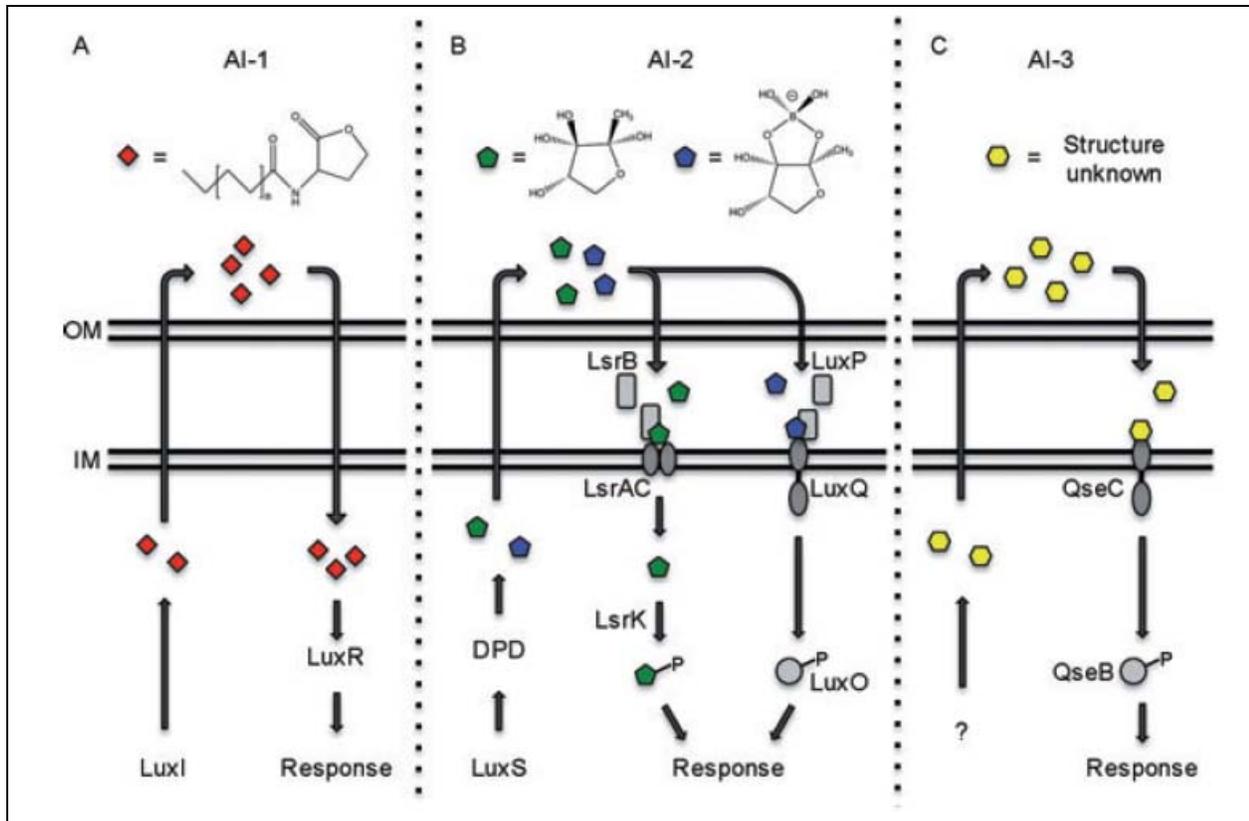


Figura 2: Estratégias de autoindução em células gram-negativas. A) Estratégia baseada em AI-1 utilizando homoserinas lactonas (losângulo vermelho). AI-1 é sintetizado por LuxI e liberado para o ambiente e ao se difundir para o interior da célula, interage com LuxR e resulta na resposta celular. B) Estratégia baseada em AI-2 utilizando R-THMF (pentágono verde) ou furanosil borato diéster (pentágono azul). Em *Vibrio* sp., furanosil borato diéster interage com LuxP no periplasma e inicia a cascata de fosforilação, mas em outros organismos R-THMF é importado para a célula e fosforilado pelo sistema LSR. C) Estratégia baseada em AI-3 utilizando um autoindutor de estrutura desconhecida (hexágonos amarelos). O autoindutor é liberado para o ambiente e percebido por QseC ao retornar ao periplasma. QseC então fosforila o regulador de resposta QseB. IM, membrana interna. OM, membrana externa. (Parker & Sperandio, 2009).

1.1.2- *Quorum sensing* e Limitação de Nutrientes

Uma curva de crescimento bacteriano em sistema fechado inclui quatro fases: a fase de adaptação das células (fase lag), a fase em que ocorre um crescimento exponencial (fase log), a fase estacionária, onde o número de células que morrem é equivalente às que são viáveis, e a fase de senescência, que se manifesta com o declínio populacional. No período que antecede a fase estacionária, ocorre um declínio da taxa máxima de crescimento, resultante da diminuição da concentração de um ou mais nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou do aumento da concentração de produtos tóxicos resultantes do metabolismo (Foog & Take, 1987).

Na natureza, as bactérias podem sobreviver por longos períodos em estado estacionário de crescimento. Algumas espécies sobrevivem pela formação de esporos, mas bactérias que não esporulam sobrevivem entrando na fase estacionária. A entrada da população nesta fase resulta em mudanças na fisiologia e morfologia que lhe conferem um aumento na resistência a estresses ambientais (Ishihama *et al.* 1997).

A transição para a fase estacionária é direcionada por fatores transcricionais, cuja atividade ou produção é estimulada pela limitação de nutrientes. Em muitas bactérias gram-negativas o principal fator de regulação transcricional é o sigma S, uma subunidade alternativa de reconhecimento de promotores da RNA polimerase. Em *Bacillus subtilis*, dois fatores principais são Spo0A e sigma H, responsáveis pela transcrição de genes de esporulação, entre outros (Haldenwang, 1995).

A limitação de nutrientes é o principal sinal que regula a entrada em fase estacionária. Este estado favorece a sobrevivência das células em escassez de nutrientes. A sobrevivência na fase estacionária também pode ser controlada por moléculas sinalizadoras e assim, as bactérias são capazes de integrar os sinais para QS e limitação de nutrientes, como mostram os exemplos a seguir.

Em *B. subtilis* a produção do peptídeo autoindutor CSF é regulada por limitação de nutrientes. Isto ocorre porque a sua transcrição é controlada pelo fator sigma H, cujos níveis e atividade são estimulados por limitação de nutrientes (Harris *et al.*, 1998). Em *Ralstonia solanacearum*, a produção de uma molécula sinalizadora AHL precisa de um fator sigma S, maximamente ativo sob limitação de nutrientes (Flavier *et al.*, 1998).

Por outro lado, moléculas sinalizadoras podem controlar a produção de fatores transcricionais que percebem a limitação de nutrientes e regulam a entrada na fase estacionária (Lazassera, 2000). Em *Bacillus subtilis* a atividade do fator SpoOA, que ativa genes de esporulação, é estimulada por peptídeos sinalizadores, como CSF (Ireton *et al.*, 1993).

Em *Rhizobium leguminosarum*, a sobrevivência em fase estacionária se mostrou dependente da densidade celular na qual as células sofreram limitação de nutrientes, sendo favorecidas aquelas que perceberam a limitação de nutrientes em alta densidade celular (Thorne & Williams, 1999). Lazassera (2000) levanta a possibilidade de que este tipo de resposta integrada regula a transição para a fase estacionária. Para uma população numerosa que sofre escassez de nutrientes é interessante antecipar a entrada na fase estacionária (ou esporular). Quando os nutrientes voltarem a aparecer,

em uma densidade celular baixa é maior a chance de poder utilizá-los com menor competição (Lazassera, 2000).

Portanto QS converge com a percepção de limitação de nutrientes regulando a entrada na fase estacionária em diversas bactérias. É possível que outras bactérias, possam monitorar sua densidade celular como uma medida de adaptação à limitação de nutrientes, regulando alguns genes envolvidos na transição do início da fase estacionária.

1.2- Cianobactérias

Cianobactérias são microrganismos procarióticos, uni ou pluricelulares, aeróbios, fotoautotróficos, com reprodução assexuada. A grande flexibilidade fisiológica, genética e reprodutiva, permite a sobrevivência destes microrganismos em diversos ecossistemas (Carmichael, 1994).

Cianobactérias constituem um grupo muito antigo de microrganismos e sua atividade metabólica foi responsável pela depleção de dióxido de carbono da atmosfera durante o curso da evolução, e o concomitante acúmulo de oxigênio resultante do processo fotossintético realizado por esses microrganismos. (Chorus & Bartram, 1999).

Ecossistemas eutrofizados fornecem condições ao aumento excessivo do número de células de cianobactérias, fenômeno denominado de floração. Esse fenômeno constitui um sério problema para a qualidade de água, podendo trazer conseqüências à saúde pública. (Chorus & Bartram, 1999).

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias é a capacidade desses microrganismos produzirem toxinas (cianotoxinas). Estas substâncias são classificadas, de acordo com o seu mecanismo de ação, como: hepatotóxicas (microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsina), neurotóxicas (anatoxina-as, saxitoxinas) e dermatotóxicas (Chorus & Bartram, 1999).

1.3.- Microcistinas

As microcistinas são hepatotoxinas produzidas por alguns gêneros de cianobactéria incluindo *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Radiocystis*, *Phormidium* e *Synechocystis* (Metcalf *et al.*, 2006).

A estrutura química das microcistinas (Fig.3), que são heptapeptídios cíclicos, é constituída por três D-aminoácidos: β -eritro- β -metil ácido aspártico, alanina e γ -ácido glutâmico (D- β MeAsp, D-Ala e D-Glu) na porção invariável da molécula, dois L-aminoácidos variáveis e dois aminoácidos raros (Mdha e Adda). O Mdha é o N-metildehidroalanina e o Adda (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8,trimetildeca-4,6-ácido dienólico), ao qual se atribui a hepatotoxicidade das microcistinas (Chorus & Bartram, 1999). Já foram caracterizados mais de 100 análogos de microcistinas, diferenciados pela constituição dos L-aminoácidos nas posições 2 e 4 e pela presença ou ausência de grupamentos metilados. Dentre os análogos mais frequentes e mais tóxicos, destacam-se a microcistina-LR, com os aminoácidos leucina (L) e arginina (R), como L-

aminoácidos, seguida da Microcistina-RR (arginina;arginina) e Microcistina-YR (tirosina;arginina) (Falconer & Humpage, 2005).

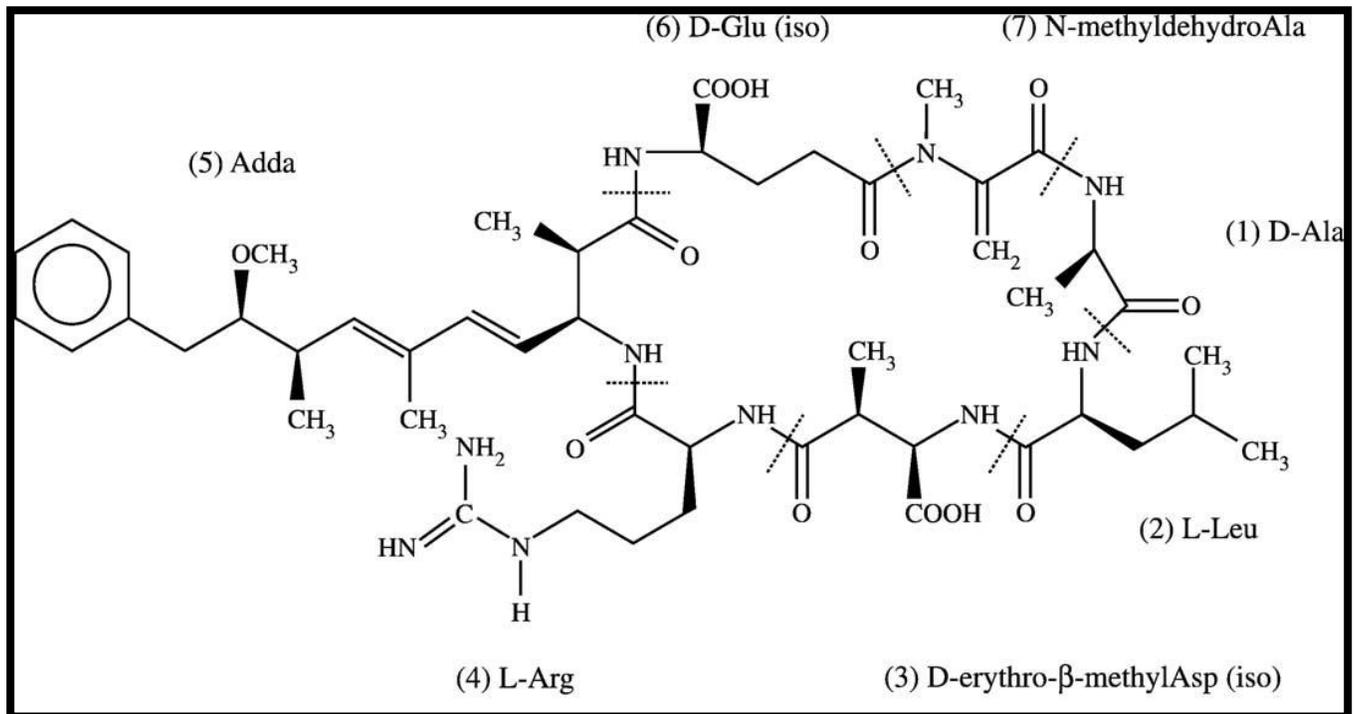


Figura 3- Estrutura química geral da microcistina. (Wiegand e Pflugmacher, 2005)

1.4- Cianobactérias e Limitação de nutrientes

As cianobactérias estão entre os microrganismos mais amplamente distribuídos na biosfera e possuem um importante papel nos ciclos globais de nitrogênio e fósforo. Sendo seu metabolismo baseado na fotossíntese, o esgotamento de nutrientes

essenciais é freqüentemente o fator limitante no crescimento celular das cianobactérias e a necessidade de adaptação a períodos de limitação de nutrientes é a principal pressão seletiva em diversos ambientes naturais (Schwarz & Forchhammer, 2005).

As cianobactérias unicelulares apresentam mudanças substanciais em resposta à escassez de nutrientes e exibem estratégias que permitem sua sobrevivência por longos períodos sob condições de estresse. Essas estratégias de sobrevivência empregam um metabolismo energético reduzido e requerem uma alta regulação das atividades celulares (Schwarz & Forchhammer, 2005).

É provável que situações de escassez de nutrientes regulem o ciclo celular em cianobactéria, como reportado para outros microrganismos. Contudo, o mecanismo ainda é pouco conhecido. Durante prolongada limitação nutricional, as estruturas intracelulares mudam consideravelmente. As mudanças mais óbvias são a degradação das membranas intracelulares do aparato fotossintético, os tilacóides, e o acúmulo de inclusões celulares (Schwarz & Forchhammer, 2005; Dagnino *et al.* 2006). Conforme demonstrado por Hai *et al.* (2001), sob condições de carência de nitrogênio e enxofre, grânulos de glicogênio se acumulam. Em contraste, em condições de carência de fósforo, a cianoficina (polímero de ácido aspártico e arginina) é sintetizada em várias cianobactérias como forma de estoque de nitrogênio e energia (Allen, 1984).

A cianobactéria não-diazotrófica *Synechococcus* sp. adapta-se à limitação de nitrogênio diferenciando-se em células despigmentadas e dormentes, capazes de sobreviver a períodos prolongados. A proteólise de ficobiliproteínas é uma fonte de aminoácidos para síntese de proteínas necessárias para adaptação à condição de

estresse. Culturas clorótidas podem suportar pelo menos 1 ano nessa condição, dependendo apenas de luz, e retomam o crescimento ao serem colocadas em meio rico dentro de 5 dias (Sauer *et al.*, 1999). Células desprovidas de nitrogênio por longo período mostram uma gradual diminuição do conteúdo de pigmentos e mantêm um nível residual de fotossíntese, 0.1% da atividade de células vegetativas. A síntese de proteínas é muito reduzida assim como o conteúdo de proteína total, indicando um contínuo turnover de proteínas durante a clorose (Sauer *et al.*, 2001).

De forma similar, *Microcystis* PCC7806 cultivada por longo período em ASM-1 perde a cor verde característica, tornando-se pálida após 30 dias. A maioria das células permanece viável nessa condição mesmo após 1 ano se providas de luz. A composição ultraestrutural de células verdes e pálidas mostrou que as últimas perderam o arranjo de membranas fotossintéticas característico das células verdes (Dagnino *et al.*, 2006). Além disso, culturas mantidas em meio rico que receberam meio de cultivo de células clorótidas e mostraram uma desorganização similar de estruturas de membranas fotossintéticas, além de reduzido crescimento. Esses resultados sugerem a existência de um sinal extracelular proveniente de células clorótidas capaz de coordenar uma resposta da população de *Microcystis* sp.

1.5- *Quorum sensing* em Cianobactéria

Sendo cianobactéria uma bactéria gram-negativa, os primeiros trabalhos sobre comunicação célula-célula nesse grupo têm sido voltados principalmente para a detecção de AHLs, bem como as enzimas que as degradam, AHL-acilases e AHL-lactonases.

Em um estudo recente, a produção de AHLs por cianobactéria foi confirmada pela detecção de um C8-AHL em culturas axênicas da cianobactéria do gênero *Gloeothece* (cepa PCC6909) (Sharif *et al.*, 2008). Porém, não foi verificada a presença de AHLs em condições de cultivo de duas cepas de *Microcystis* (NPLJ-4 e PCC7806), o que não exclui a possibilidade que ocorra QS mediado por outros tipos de moléculas nesse gênero (Meireles, 2003).

Com o objetivo de avaliar se a produção de cianotoxinas poderia ser controlada por QS, Braun & Bachofen (2004) tentaram estabelecer uma correlação entre a ocorrência de cianotoxinas e de homoserina lactonas em ecossistemas naturais. Foram investigados dois lagos, em um deles predominava *Planctothrix rubescens* e em outro predominava *Microcystis wesenbergii*. Neste último caso, as concentrações de toxinas e de lactonas mostraram tendências opostas, sugerindo que seu metabolismo pode ser relacionado. Em concentrações altas de microcistina, a concentração de AHL caiu e quando a concentração de toxina diminuiu a produção de AHL aumentou de novo, sugerindo que uma vez que a indução se inicie a molécula sinalizadora seria degradada e sua concentração cairia. A estabilidade de microcistinas no ambiente é variável e nada se sabe sobre a estabilidade de AHLs em ambientes naturais. Quando se adiciona AHLs a culturas de cianobactérias, este composto desaparece rapidamente,

indicando que se liga fortemente a componentes celulares ou que haja uma alta atividade de degradação enzimática deste composto. Finalmente os autores sugerem a possibilidade de que a liberação de AHL no ambiente dispare a síntese de toxinas. Assim, monitorar o nível de AHLs no habitat poderia ser uma forma eficiente de controlar florações de cianobactérias tóxicas.

Contudo, no processo de comunicação celular, além do AHL, algumas bactérias produzem também enzimas que são capazes de inativar AHLs, produzidos por elas próprias ou por outras bactérias, e assim interferir nos processos mediados por QS. Esse fenômeno é conhecido como *quorum quenching*. *Quorum quenching* já foi observado na cianobactéria filamentosa fixadora de nitrogênio *Anabaena sp.* cepa PCC7120. AHLs acumulam na biomassa desta cianobactéria durante a fase exponencial e desaparecem rapidamente no início da estacionária. De fato, sua biomassa apresenta também uma atividade de degradação de AHL do tipo acilase. A enzima correspondente foi capaz de degradar uma grande variedade de AHLs, o que pode representar um sistema modulador para controlar as respostas aos seus próprios sinais ou estar envolvido na sinalização de comunidades microbianas. (Romero *et al.*, 2008).

1.6- Microcistinas e limitação de nutrientes

Segundo um estudo realizado por Orr & Jones (1998), o processo de divisão celular de *Microcystis aeruginosa* e a produção de microcistina mostram uma correlação

linear sob limitação de nitrogênio, sugerindo que nos casos em que a produção de microcistina está sujeita a limitação de fatores ambientais (nutrientes, luz, temperatura), por fatores ambientais, sua variação está de fato respondendo à alteração na taxa de divisão celular. Com base em uma análise de vários outros trabalhos, os autores defendem que essa seria a idéia geral de controle ambiental da produção de microcistina em diversas cianobactérias hepatotóxicas. Esses autores acrescentaram ainda que segundo essa visão a microcistina não seria um metabólito secundário de acordo com o atual conceito (compostos não essenciais para o metabolismo primário, sintetizados em condições em que o crescimento cessa), sugerindo que desempenhe um papel essencial em cianobactérias toxigênicas. Mais tarde os mesmos autores correlacionaram concentração de microcistina por célula e massa de microcistina por peso seco e confirmaram que estes valores aumentam com a taxa de crescimento, mostrando que células de *M. aeruginosa* sob limitação de nitrogênio em crescimento acentuado são menores e tem maior conteúdo intracelular de microcistina que células de crescimento lento (Long *et al.*, 2001).

Em 2000, Oh *et al.* estudaram a produção de microcistina por *M. aeruginosa* sob condições de limitação de fósforo e seus resultados confirmaram que a taxa de produção de microcistina é diretamente proporcional à taxa de crescimento. Foi demonstrado ainda que há um aumento no conteúdo de microcistina sob limitação de fósforo e produção da forma mais tóxica, LR.

Adicionalmente, o trabalho de Lee *et al.*, (2000) demonstraram que a concentração celular de microcistina exibiu uma alta correlação direta com o conteúdo

de nitrogênio celular total em culturas de *M. aeruginosa* em que as concentrações de nitrogênio e fósforo foram fixadas.

Além disso, as investigações sobre o efeito da limitação de nitrogênio e fósforo na produção de microcistina, em *Microcystis aeruginosa* sugerem a existência de um mecanismo através do qual nitrogênio e fósforo interferem na sua síntese (Dai *et al.*, 2008).

1.7- Microcistinas: função ecológica ou fisiológica?

Embora a função das microcistinas seja ainda desconhecida, é evidente que elas promovem numerosos efeitos sobre toda comunidade aquática, destacando-se o fitoplâncton e zooplâncton. Esses efeitos dependem da particularidade de cada organismo, bem como das várias vias de sinalização intra e extracelulares. (Valdor & Aboal, 2007; Babica *et al.*, 2006; Kearns & Hunter, 2001; Kaebernick & Neilan, 2001). Algumas hipóteses a respeito das possíveis funções das microcistinas tem sido levantadas na literatura, dentre elas, a hipótese da produção de microcistina por cianobactéria como uma defesa contra herbivoria pelo zooplâncton (Carmichael, 1994). No entanto, essa idéia coexiste com trabalhos que a contradizem como o de Rohrlack *et al.*, (1999), cujas investigações mostraram que tanto uma cepa produtora de microcistina (*Microcystis aeruginosa* PCC7806) quanto a sua mutante, não produtora, foram capazes de reduzir a taxa de ingestão por *Daphnia galeata*.

Além disso, as sugestões de que as microcistinas possam ter evoluído em resposta à pressão exercida pelo zooplâncton são questionáveis diante de evidências filogenéticas. Rantala *et al.*, 2004 mostraram que um ancestral comum das cianobactérias produtoras de microcistinas precedeu a linhagem dos metazoários, e portanto, a produção de microcistina pode preceder em 1,5 milhões de anos a existência do zooplâncton.

Outra hipótese é a de que microcistinas podem ter efeitos alelopáticos. Contudo, embora muitos estudos tenham testado os efeitos de microcistinas sobre vários organismos, poucos estudos usaram microcistina em concentrações típicas do ambiente. As concentrações de microcistina ecologicamente relevantes, como as encontradas nas florações de *Microcystis*, seriam muito baixas para promover efeitos alelopáticos (Babica *et al.*, 2006).

Além disso, alguns resultados de competição entre cepas de *Microcystis* tóxicas e não-tóxicas contradizem a idéia de que a microcistina desempenhe um papel ecologicamente importante como composto alelopático (Kardinaal *et al.*, 2007).

No entanto, é fato que microcistinas dissolvidas também influenciam na fisiologia da cianobactéria produtora (Sedmak & Elersek, 2006; Valdor & Aboal, 2006 e Schatz *et al.*, 2007). Dessa forma, o papel das microcistinas nas células produtoras deve diferir do seu papel no meio ambiente.

Em experimentos *in vitro*, a adição das microcistinas mais comuns: -LR, -RR, e -YR, produziu mudanças morfológicas e fisiológicas em cepas de *Microcystis aeruginosa* produtoras ou não das toxinas testadas (Sedmak & Elersek, 2006).

Um estudo de Valdor & Aboal (2006) demonstrou o efeito inibitório das microcistinas: LR, -YR e -RR sobre o crescimento celular de cianobactérias pertencentes às ordens Oscillatoriales, Nostocales e Crococales. Este efeito se apresenta tanto com a exposição ao extrato celular, quanto à toxina purificada. No entanto, com o uso da molécula purificada, o efeito é mais persistente. Além da inibição do crescimento celular, em ambas situações houve a indução de alterações estruturais e morfológicas das culturas das cianobactérias tratadas.

Schatz *et al.*, (2007) verificaram que a lise de células de *Microcystis aeruginosa* induziu o aumento da produção de microcistinas nas células remanescentes de sua cultura. Os autores sugerem que a microcistina sirva como uma molécula sinalizadora, cuja presença indique a extensão da morte celular dentro de uma população de *Microcystis* e aumente a capacidade adaptativa das células sobreviventes, por promover sua toxicidade.

Apesar dos estudos apresentados mostrarem o efeito da microcistina sobre a fisiologia, tanto de *Microcystis aeruginosa* quanto de outros gêneros de cianobactérias, algumas questões ainda não foram respondidas. O fato da microcistina promover alterações fisiológicas nas próprias células potencialmente produtoras levanta a suspeita de que, assim como em outras bactérias, as modificações apresentadas possam representar adaptações da população em face às condições ambientais. Diante disso, a sugestão de mais uma hipótese merece ser considerada: a da participação da microcistina como uma molécula sinalizadora no controle fisiológico das células produtoras.

1.8- Justificativa do estudo:

Uma vez que a ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento representa um sério problema tanto ecológico quanto de saúde pública, devido à produção de compostos tóxicos, são necessárias pesquisas que ampliem os conhecimentos relativos aos mecanismos de controle fisiológico, principalmente os que regem o seu crescimento populacional e toxicidade.

Em condições de cultivo, cianobactérias freqüentemente atingem altas densidades celulares no início da fase estacionária e, em tais situações, a disponibilidade de nutrientes se torna um fator crítico à sua sobrevivência. Nessas circunstâncias, como apresentado anteriormente, algumas bactérias são capazes de perceber sua densidade através do sistema de *quorum sensing* e regular a própria fisiologia.

Assim como em outros microrganismos, a proliferação de células em cianobactéria obedece a curvas de crescimento com fases distintas, no entanto, até o momento, não existem estudos mais extensos que demonstrem a capacidade de autoregulação fisiológica da transição dessas fases por cianobactéria, como nos microrganismos citados ao longo da introdução deste trabalho.

Dessa forma, este estudo visa contribuir para a investigação de um possível sistema de *quorum sensing* em cianobactéria que envolva a produção de moléculas sinalizadoras para regular a entrada na fase estacionária, como já constatado em outras bactérias.

2- OBJETIVOS:

2.1- Objetivo geral:

- Investigar o efeito da adição de exudato de uma cepa de *Microcystis sp.* (MILJ-48) em cultivos da própria cepa, buscando avaliar alterações fisiológicas que indiquem uma autoregulação.

2.2- Objetivos específicos:

- Testar os efeitos promovidos pelos exudatos de diferentes fases de crescimento de *Microcystis sp.* (MILJ-48), a fim de avaliar alterações fisiológicas.
- Avaliar se o efeito do exudato pode ser aumentado através da adição de exudato concentrado às culturas de *Microcystis sp.* (MILJ-48).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Cepa utilizada

Neste estudo foi utilizada uma cepa tóxica de cianobactéria do gênero *Microcystis* sp. (MILJ-48), produtora de microcistina, isolada da Lagoa de Jacarepaguá, RJ e mantida no banco de culturas do Laboratório de Ecologia e Toxicologia de Cianobactérias LETC (Fig.4).

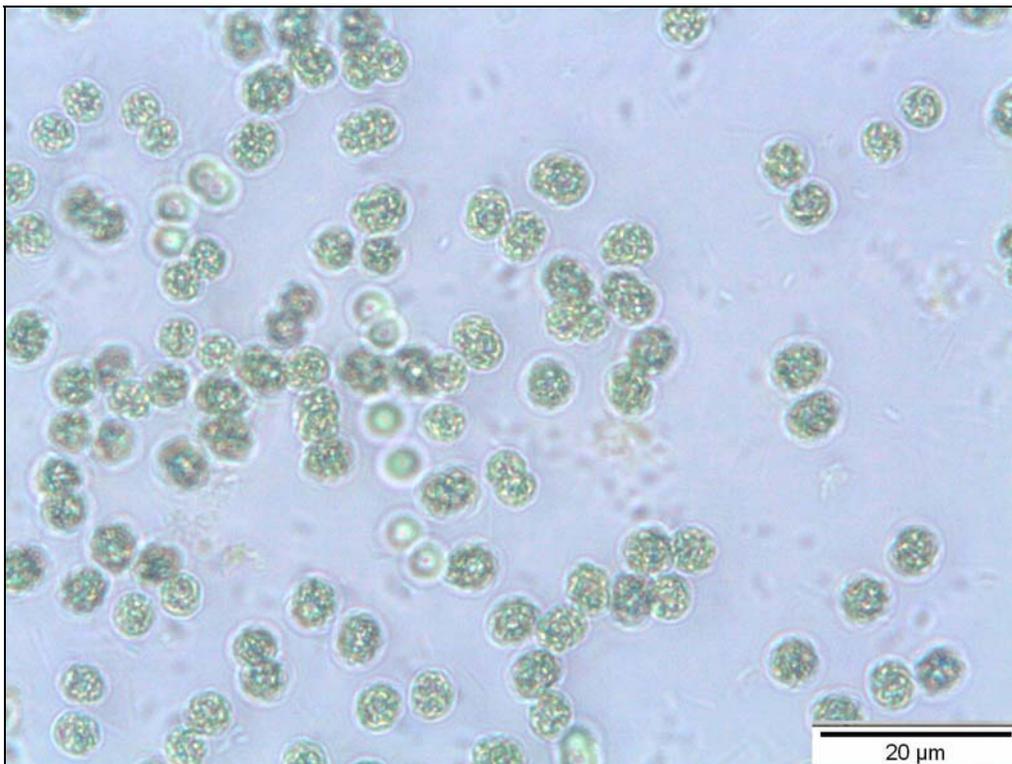


Figura 4- Cepa de *Microcystis* sp (MILJ-48)

3.2- Condições de cultivo:

Os experimentos foram realizados utilizando-se o meio de cultivo ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964) com pH ajustado para 8,0, em condições não axênicas, porém com contaminação bacteriana imperceptível numa análise microscópica convencional, sob intensidade luminosa de $100\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $24\pm 2^\circ\text{C}$, sem aeração e fotoperíodo de 12 horas.

3.3- Avaliação do efeito dos exudatos de diferentes fases de crescimento sobre a fisiologia de *Microcystis* sp. (MILJ-48)

Para a realização deste experimento foram preparados previamente quatro cultivos fechados da cepa MILJ-48, com 200ml cada, para a obtenção dos exudatos. Essas culturas foram iniciadas com $5,0 \times 10^5$ cél./ml, recebendo o inóculo de células de forma sincronizada a fim de se obter exudatos com as idades de 3, 6, 9 e 15 dias para o início do experimento (fig.5).

Após o período de crescimento, as células foram separadas do meio de cultivo primeiramente por centrifugação e posteriormente foram filtradas em filtro de borossilicato. Estes filtrados obtidos, constituídos do meio de cultivo acrescidos da matéria orgânica excretada pelas células durante seu crescimento passaremos a

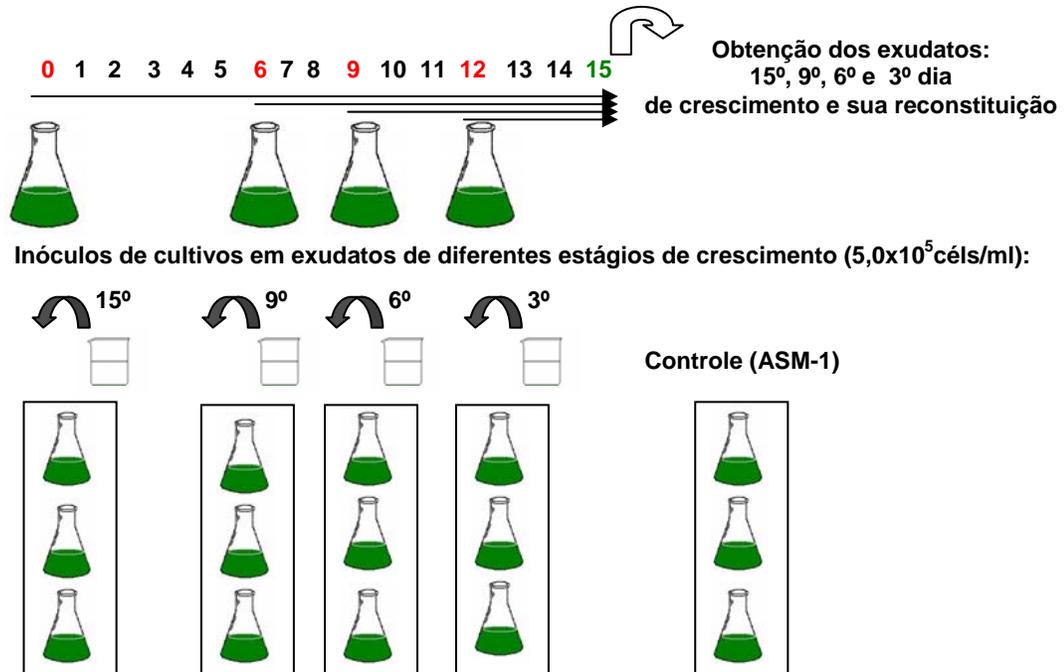
denominar como exudatos. Aos exudatos obtidos foram adicionados os sais para a reconstituição do meio ASM-1. A esterilização foi feita por meio de filtração em membrana de poro 0.22µm (Millipore - GV-PVDF - 47mm), em condições assépticas.

Os exudatos de 3, 6, 9 e 15 dias, obtidos após cultivo da cepa MILJ-48, assim como a condição controle (ASM-1), foram subdivididos em triplicatas de 50 ml cada e receberam um inóculo de forma que todas as culturas iniciassem com um número de $5,0 \times 10^5$ cél/ml de *Microcystis* sp. (MILJ-48).

O experimento teve a duração de 15 dias. Durante este período, a cada 3 dias foram retiradas amostras para determinação da densidade celular e nos dias 0, 6, 9 e 15 para a determinação da concentração de microcistina total.

A partir dos resultados obtidos, a condição do exudato de 6 dias (condição de maior efeito inibitório sobre o crescimento) foi escolhida para a realização de um segundo experimento, no qual o exudato foi previamente concentrado a fim de avaliar o efeito de concentrações superiores deste exudato sobre os parâmetros fisiológicos e produção de toxina, como descrito a seguir.

Cultivos da cepa MILJ-48 inoculados em diferentes dias para obtenção sincronizada dos exudatos



Os cultivos foram mantidos por 15 dias, com amostragens para determinação de densidade celular e concentração de microcistinas.

Figura 5- Esquema representativo do experimento 1 - Avaliação do efeito dos exudatos de diferentes fases de crescimento sobre a fisiologia de *Microcystis* sp. (MILJ-48). Em vermelho estão representados os dias em que os exudatos de 15, 9, 6 e 3 dias receberam o inóculo de células. Em verde está o início do experimento.

3.4- Avaliação do efeito de concentrados do exudato do 6º dia sobre a fisiologia de *Microcystis* sp. (MILJ-48)

Para a obtenção dos exudatos concentrados, foi realizado um cultivo em um volume de 10 litros de meio ASM-1 da cepa MILJ-48. Ao atingir o 6^o dia de cultivo, as células foram separadas do meio de cultivo através de centrifugação seguida de filtração em filtro de borossilicato. Obtido o exudato, o mesmo passou pelo processo de liofilização para a obtenção de exudatos concentrados em 100 e 50 vezes.

Para a obtenção do exudato concentrado em 100 vezes, 2000ml do exudato do 6^o dia foi liofilizado, ressuspenso em 20 ml de meio ASM-1 sendo então filtrado em filtro de poro 0,22µm (TTP – 85x85x213mm – reservatório de 500mL), para sua esterilização. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção do exudato concentrado em 50 vezes, sendo neste caso, liofilizado o volume 1000ml do exudato.

O processo foi realizado com volume suficiente para a obtenção de alíquotas dos exudatos concentrados para adição nas triplicatas experimentais, com suas respectivas concentrações.

As alíquotas de 20mL dos exudatos concentrados em 100 e 50x foram reservadas e mantidas em freezer até sua utilização no experimento.

Para a montagem do experimento foi inicialmente preparado um cultivo da cepa MILJ-48 em 12L de meio (Fig.6) para a obtenção do exudato do 6^o dia, seguindo o mesmo processo descrito no experimento 1.

O exudato obtido foi então dividido em 3 mariotes contendo 3,5L cada. A condição controle foi mantida em 3 balões contendo 1,5L de ASM-1 cada. No início do experimento as condições receberam um inóculo de forma que todas as culturas iniciassem com um número de células de 5×10^5 cél/ml da cepa MILJ-48.

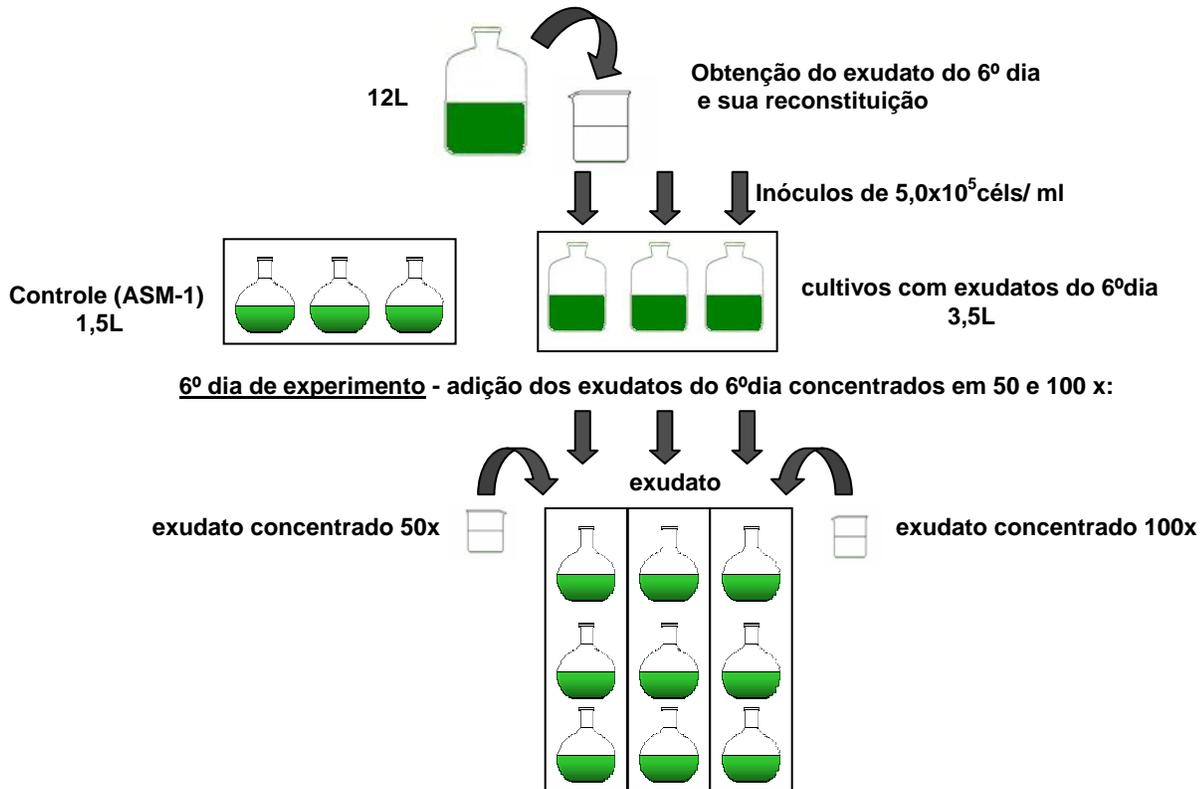
Todos os cultivos foram mantidos até o 6^o dia experimental. Nessa data os cultivos com o exudato do 6^o dia foram subdivididos para a adição das soluções concentradas em 100 e 50x. Dessa forma, cada marote teste foi subdividido em 3 balões contendo 1L da condição do exudato do 6^o dia. A dois balões foram então adicionadas as respectivas alíquotas concentradas e um deles permaneceu inalterado, sem adição do exudato concentrado para fins comparativos. A condição controle deste experimento (cultivo em meio ASM-1) permaneceu inalterada desde o t0 do experimento.

Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicatas.

Após a adição das soluções do exudato concentrado, os cultivos foram mantidos até o 15^o dia.

No decorrer do experimento, foram retiradas amostras a cada 3 dias para a determinação da densidade celular e concentração de clorofila-a, e nos dias 0, 6, 9, e 15 para a determinação da concentração de microcistina.

Cultivo da cepa (MILJ-48) para a obtenção dos exudatos no 6º dia de crescimento



Os cultivos foram mantidos por 15 dias com amostragem para determinação de densidade celular, concentração de clorofila-a e microcistina. A condição controle foi mantida inalterada e acompanhou o período de 15 dias de cultivo.

Figura 6- Esquema representativo do experimento 2: Avaliação do efeito de concentrados do exudato do 6º dia sobre a fisiologia de *Microcystis* sp. (MILJ-48)

3.5- Parâmetros fisiológicos analisados

3.5.1- Contagem de células para determinação da taxa de crescimento, tempo médio de duplicação, razão máxima de crescimento e rendimento máximo das culturas:

O crescimento celular foi acompanhado por meio de contagem de células realizada em microscópio ótico, utilizando Hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal. Para tanto, a cepa MILJ-48 foi submetida a um tratamento de digestão da mucilagem que consiste na adição de NaOH 1M na proporção de 2:1 (amostra:solução) e aquecimento em banho maria a 60°C por 10 minutos. Dessa forma as células perderam a forma agregada de colônia, permitindo assim a contagem individual das células.

A taxa de crescimento (μ) e tempo médio de duplicação(G) foram calculadas segundo as equações descritas em Fogg & Thake (1987).

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

Onde:

μ = Taxa de crescimento

N_2 e N_1 = número de células / mL nos tempos t_2 e t_1 .

A partir de μ podemos calcular o tempo médio de duplicação (G), $G = \ln 2 / \mu$

Determinamos a razão máxima de crescimento(R) dos experimentos, que corresponde ao número máximo de células/mL atingido durante a curva de crescimento dividido pelo número de células/mL do inóculo.

$$R = R_1 / R_0$$

Onde:

R_1 = Número máximo de células / mL R_0 = Número inicial de células / mL.

Também foi determinado o rendimento máximo das culturas (R), que corresponde ao número máximo de células atingidas ao final do cultivo subtraído do número de células no inóculo inicial.

3.5.2- Determinação da concentração de clorofila a

A extração da clorofila a foi realizada após filtração de um volume conhecido de amostras dos cultivos em filtro de borossilicato (13mm). Posteriormente, foi adicionado a este filtro um volume determinado de Metanol 100%. As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro. Após incubação, as mesmas foram centrifugadas a 1600g por 15 min (Eppendorf - modelo 5403), sendo 3mL do sobrenadante utilizados para determinar a concentração de clorofila a por espectrofotometria (Shimadzu - uv mini 1240). A leitura foi feita a 666 e a 750nm para correção da turbidez. Para o cálculo da concentração de clorofila a, foi utilizado o coeficiente de extinção determinado por Mackinney (1941), onde:

$$Chl_a = c.v.coef/V.1$$

c= densidade óptica a 666 – densidade óptica a 750

v= volume de metanol100%

V= volume da amostra

1= trajeto óptico

coef.= 13,4 (coeficiente de extinção de Mackinney, 1941).

3.6 – Análises da produção de microcistinas:

3.6.1- ELISA

Para a determinação das concentrações totais de microcistina no experimento 1, amostras de 2 ml da cultura foram retiradas nos tempos 0, 6, 9 e 15 dias, e submetidas a um processo de rompimento celular, através de gelo e degelo para sua posterior análise através do método de imunoenensaio enzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais da Beacon Analytical Systems (Portland, EUA) de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante.

3.6.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

A determinação das concentrações intracelulares de microcistina do experimento 2 foi feita utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Para a realização das análises um volume conhecido do cultivo foi retirado de cada condição experimental e filtrado em filtro de borossilicato (47mm). O material retido nos filtros foi utilizado para analisar o conteúdo de toxina intracelular.

Para a extração de microcistinas intracelulares os filtros foram picotados para facilitar a extração, e em seguida foi adicionada uma solução de metanol/ 0,1% de TFA

(Barco *et al.*, 2005) até cobri-los por inteiro. Após 1 hora em agitação constante, o extrato foi centrifugado a 3000g por 15 min. O processo foi repetido por mais duas vezes com o precipitado. Os sobrenadantes foram recolhidos ao final de cada centrifugação e reunidos para evaporação total sob fluxo de ar comprimido. Esse material foi hidratado em 20 mL de água MILLI-Q e passado em cartuchos de 1g de ODS (Bakerbond - 7466-07 - Octadecyl - Polar Plus) para concentração e purificação do extrato.

Os cartuchos foram previamente ativados com a passagem de 20mL de metanol 100%, seguido de 20 mL de água MILLI-Q. Após a passagem da amostra, foi feita a lavagem com 10 mL metanol 10%, 10 mL metanol 20% e 10 mL metanol 30%, respectivamente. Todas estas frações foram descartadas e o material retido no cartucho foi eluído com 20mL de metanol/TFA (0,1%). Esta fração foi evaporada totalmente sob fluxo de ar comprimido e ressuspensa em 1 mL de metanol/TFA (0,1%). Após 1 hora em agitação constante para solubilização, essa amostra foi filtrada em filtros de celulose regenerada (0.45 µm, 13 mm) e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O sistema de HPLC e as condições cromatográficas utilizadas estão descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Descrição dos componentes do sistema HPLC utilizado (Shimadzu).

| Componentes | Descrição |
|-------------|--|
| Detector | U.V./Vis - Detector de diiodo - SPDM10Avp |
| Bomba | LC-10AT VP |
| Loop | 100 μ L |
| Coluna | C ₁₈ , Lichrospher 100 RP (fase reversa) -18, 250 x 4 mm, 5 μ m |
| Aplicativo | LZ Workstation Class - vp |

Tabela 3 – Descrição das condições de cromatografia analítica utilizadas

| Parâmetros | Condição |
|-----------------|--|
| Fluxo | 0.75mL/min |
| Volume injetado | 150 μ L |
| U.V. | Espectro de absorção de 195 a 300nm |
| Fase móvel | Gradiente: Água/TFA 0,05% e acetonitrila/TFA 0,05% (grau HPLC) |
| Detecção | 238 nm |
| Tempo | 60 min |

O espectro de absorção de cada pico obtido nos cromatogramas foi analisado e comparado com o espectro obtido a partir de uma solução padrão de microcistina-LR. Para calcular as concentrações foram utilizadas as áreas dos picos com similaridade igual ou superior a 99% do padrão. A quantificação foi feita com base numa curva, previamente estabelecida, com concentrações variáveis da microcistina padrão nas mesmas condições da cromatografia analítica utilizada.

3.7- Tratamento estatístico dos dados

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do teste de Kruskal-Wallis (ANOVA), seguido pelo teste de Dunn, para comparação entre a condição controle e cada tratamento. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. O teste foi realizado utilizando-se o programa GraphPad InStat, versão 3.06.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Avaliação do efeito dos exudatos de diferentes fases de crescimento sobre a fisiologia de *Microcystis* sp. (MILJ-48).

4.1.1- Crescimento Celular:

O cultivo nos exudatos obtidos a partir de diferentes fases de crescimento da cepa de *Microcystis* sp (MILJ-48) (exudatos de 3, 6, 9 e 15 dias), promoveu um efeito inibitório no crescimento celular da própria cepa (Fig.7).

O efeito se apresentou de forma mais acentuada nos cultivos em exudato obtido do 6º dia de cultivo. No entanto, todos apresentaram uma redução significativa no crescimento celular ($p < 0,01$) quando comparados com a condição controle (Fig. 7).

Além disso, ao comparar o rendimento máximo de células dos cultivos crescidos nos diferentes exudatos, após 15 dias de cultivo, os resultados apresentaram um rendimento decrescente na ordem dos exudatos de 3, 9, 15 e 6 dias (Tab.4, Fig.8).

Os resultados mostraram que a fase de crescimento na qual o exudato foi obtido interferiu na indução da resposta. O maior efeito observado com o exudato obtido do 6º dia de cultivo sugere a maior concentração de algum sinal que seria liberado principalmente na fase exponencial. Após esse momento, parece ter havido uma diminuição do efeito, já que a inibição do crescimento induzida pelo exudato do 9º dia é diminuída, voltando a aumentar nos cultivos em exudato do 15º dia, quando a cepa atinge a fase estacionária de crescimento (Fig.5, Tab.4, Fig.6). Não se pode deixar de

considerar que possam também ter havido variações qualitativas na composição da matéria orgânica excretada ao longo dos tempos amostrais.

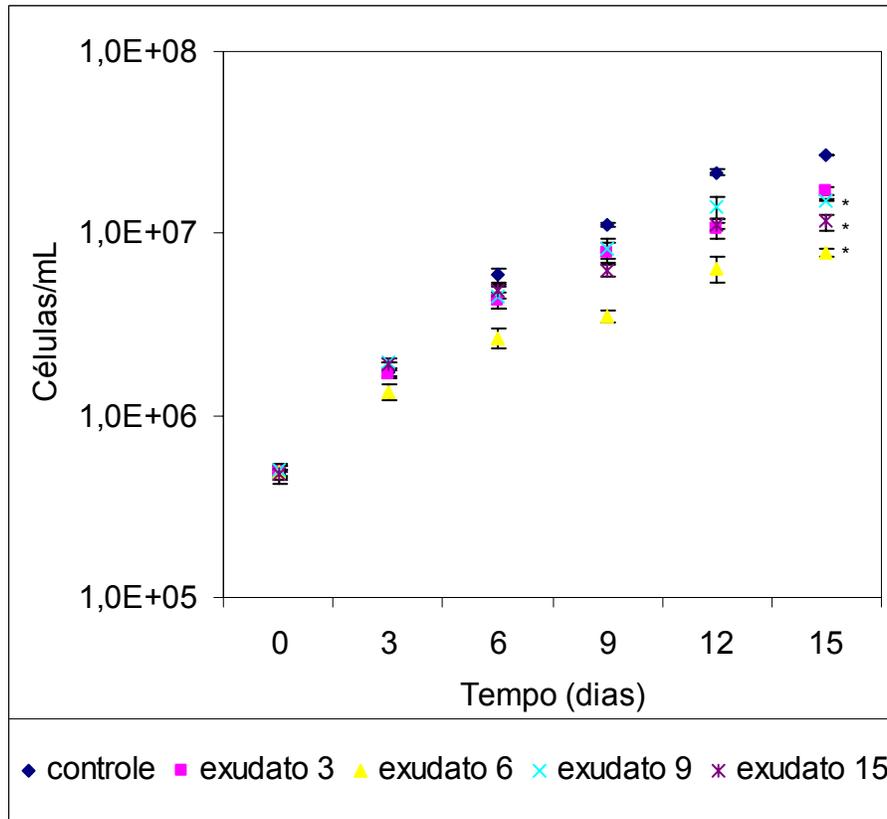


Fig.7- Curvas de crescimento da condição controle e dos cultivos de *Microcystis sp.*(MILJ-48) crescidos em exudatos obtidos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

Esse efeito inibitório diferenciado de acordo com a fase de crescimento poderia ser explicado como um autocontrole fisiológico. Ao atingir um determinado número crítico de células haveria a liberação de algum fator que alteraria a taxa de divisão celular. De acordo com esta idéia, o efeito observado parece ser análogo aos mecanismos de controle de *quorum sensing* já observados em outras bactérias que liberam moléculas

sinalizadoras para diminuir a taxa de crescimento, como uma forma de se preparar para a entrada da população na fase estacionária (Lazazzera,2000) .

Parece ter sentido que no caso de uma sinalização celular, de prevenção às condições limitantes ou de estresse, a liberação do sinal ocorra em um momento anterior à fase estacionária (6ºdia). Caso o propósito dessa sinalização seja promover alterações fisiológicas que estendam a sobrevivência da população, as alterações precisam ocorrer antecipadamente à escassez de nutrientes ou fator de estresse, e não quando os mesmos se esgotam ou quando a situação adversa já é um fator crítico no meio.

A partir das curvas de crescimento obtidas foram calculadas a taxa de crescimento, o rendimento celular, a taxa de duplicação e a razão máxima de crescimento para cada condição experimental (Tabela 4).

Tabela 4- Valores da razão máxima de crescimento (R1), rendimento máximo (R2), taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (G), obtidos a partir da curvas de crescimento de *Microcystis* sp. (MILJ-48) por um período de 15 dias, da condição controle e dos cultivos crescidos em exudatos obtidos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo.

| Cultivos | R1 | R2 | μ | G |
|------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| controle | 56,6 | $2,6 \times 10^7$ | 0,42 | 1,65 |
| exudato 3 | 34,9 | $1,6 \times 10^7$ | 0,36 | 1,92 |
| exudato 6 | 16,2 | $7,3 \times 10^6$ | 0,28 | 2,50 |
| exudato 9 | 30,2 | $1,4 \times 10^7$ | 0,36 | 1,92 |
| exudato15 | 24,3 | $1,1 \times 10^7$ | 0,38 | 1,80 |

Para todos os parâmetros de crescimento analisados, evidenciou-se o maior efeito inibitório do exudato do 6º dia sobre o crescimento celular, como pode ser observado nas figuras 8, 9 e tabela 4.

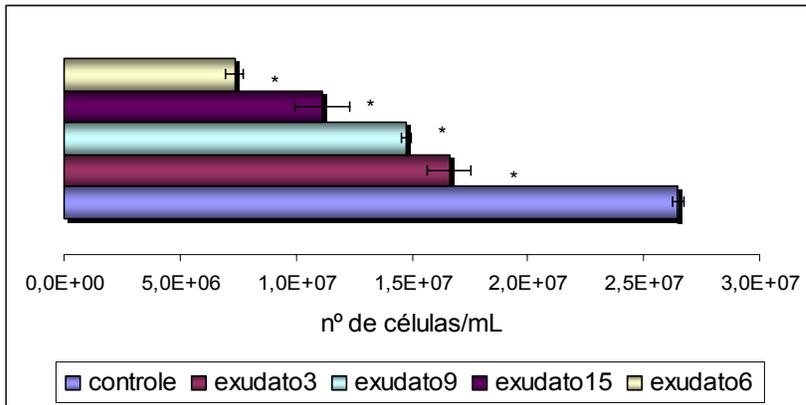


Fig.8- Variação do rendimento máximo em cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48): condição controle e cultivos crescidos em exudatos obtidos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

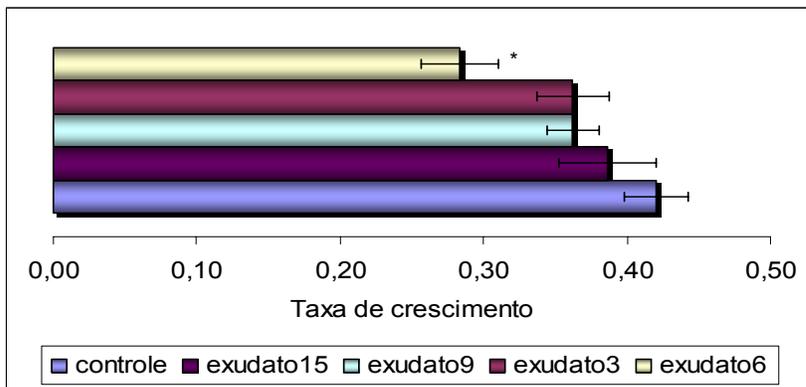


Fig.9- Variação da taxa de crescimento em cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48): condição controle e cultivos crescidos em exudatos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

Apesar de não terem sido realizadas análises de pigmentos, os cultivos crescidos com os exudatos do 6º e 15º dia apresentaram um estado visível de clorose (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram encontrados por Dagnino *et al.* (2006), que ao adicionar meio de culturas clorótidas de *Microcystis aeruginosa* em culturas de *Microcystis* sp. repletas de nutrientes observaram inibição no crescimento, alteração de pigmentos fotossintéticos e estado de clorose nas culturas tratadas.

4.1.2- Produção de microcistina total

Analisando a variação da produção de microcistinas pela cepa MILJ-48, durante o desenvolvimento das culturas verificou-se que, no 6º dia experimental, os cultivos crescidos nos exudatos do 9º e 15º dia apresentaram um aumento significativo na concentração total de microcistinas ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) quando comparados com a condição controle (Fig.10(B)).

No 9º dia do experimento, apenas o cultivo crescido em exudato do 9º dia apresentou uma produção significativamente menor de microcistina em relação à condição controle ($p < 0,05$). No último dia experimental (15º dia) houve uma redução na concentração de microcistina total em todas as condições, em relação aos tempos anteriores. Contudo todos os cultivos crescidos em exudatos ainda apresentaram uma concentração significativamente maior que a condição controle ($p < 0,01$), sendo o aumento nos cultivos crescidos em exudato do 6º e 15º dias considerados altamente significativos ($p < 0,001$) (Fig.10).

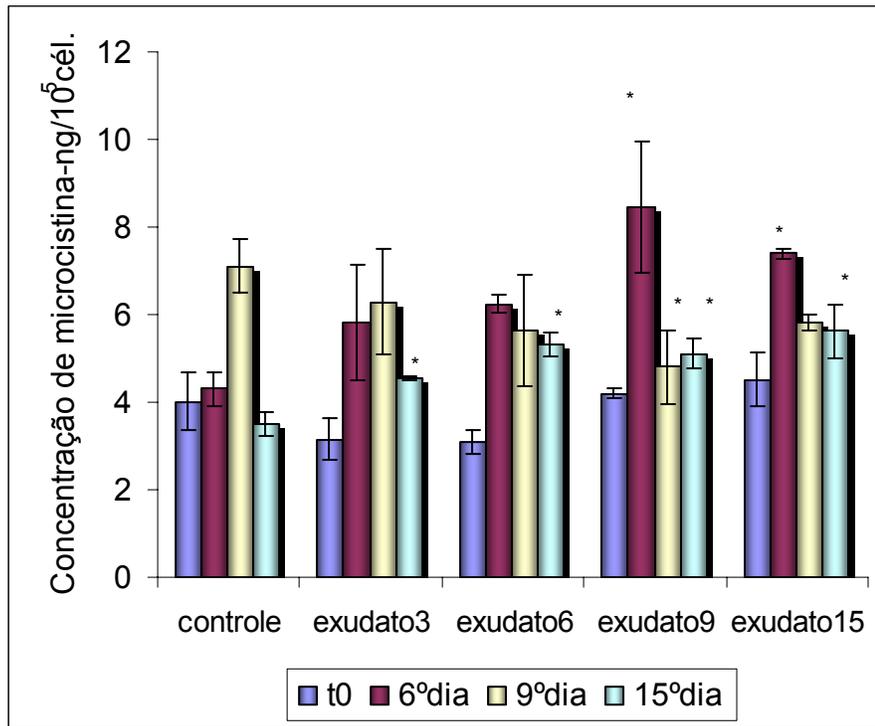


Figura 10 (A)- Variação temporal da concentração de microcistina total (ng/10⁵ células) em culturas de *Microcystis* sp. (MILJ-48) na condição controle e nos cultivos crescidos em exudatos obtidos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo: t0, 6º, 9º e 15º dia. Os resultados representam a média ± desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

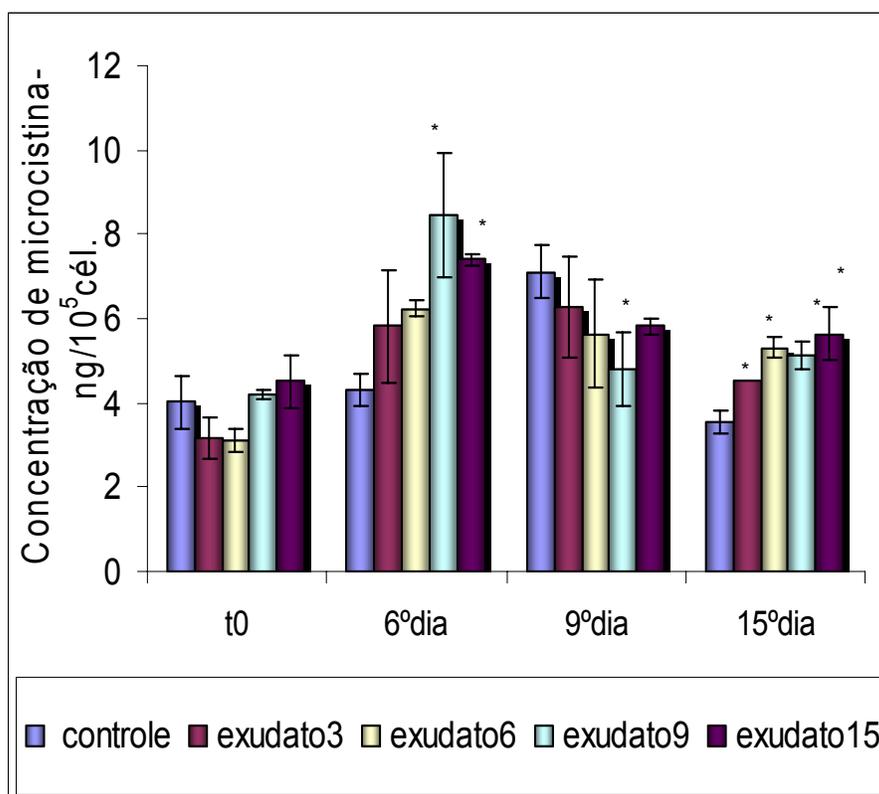


Fig.10(B)- Concentração de microcistina total (ng/10⁵ células) em culturas de *Microcystis* sp. (MILJ-48), de acordo com os dias amostrais, da condição Controle e dos cultivos crescidos em exudatos obtidos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

Ao analisar a variação da produção total de microcistina de acordo com os dias amostrais, todas as condições de exudato apresentaram uma tendência a um aumento no 6º ou 9º dia com uma diminuição no 15º dia de cultivo. Contudo, a condição controle apresentou uma variação diferente dos cultivos em exudatos (Fig.10).

Assim, ao comparar a variação da produção de microcistina nos cultivos em exudatos com a condição controle, parece que o exudato provoca uma antecipação do pico de produção da microcistina para o 6º dia de cultivo, o que ocorreria naturalmente

na condição controle apenas no 9º dia de cultivo. Esse resultado poderia explicar a antecipação da entrada na fase estacionária dos cultivos em exudatos. Caso a microcistina tenha alguma relação com a regulação do crescimento, sua produção antecipada poderia induzir a redução do crescimento da cepa ao ser cultivada nos exudatos, como foi observado.

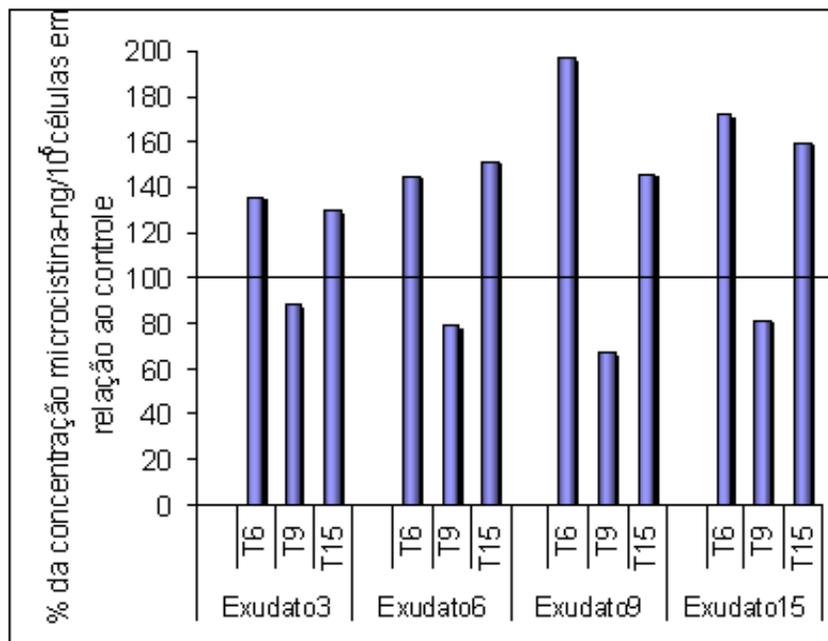


Figura 11- Porcentagem da concentração de microcistina $\text{ng}/10^5$ células detectada nos cultivos crescidos em exudatos do 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo, em relação a condição controle nos tempos: 0, 6º, 9º e 15º dias.

Ao analisar na Fig.11, os dados anteriores como porcentagem da variação da concentração de microcistina dos cultivos crescidos em exudatos das diferentes fases

de cultivo, em relação à variação da concentração de microcistina no cultivo controle, verificou-se um aumento no 6º e no 15º dias de cultivo, com uma redução intermediária no 9º dia experimental em todos os casos. É importante ressaltar que nessa análise, todos os exudatos promoveram um mesmo padrão de produção de microcistinas, parecendo que as células já estão programadas a reduzir ou aumentar a produção de microcistina em determinadas fases (6º e 9º dia) de crescimento, assim como mostrado no caso do controle (fig.10 e 11).

As fases em que os cultivos crescidos em exudatos apresentaram uma maior produção de microcistina em relação à condição controle (T6 e T15), coincidiram com as fases em que os cultivos crescidos com os exudatos testados promoveram as maiores inibições no crescimento da cepa estudada (6º e 15º dias). Inversamente, a fase onde há uma redução na produção da microcistina em relação ao controle (T9) coincidiu com a fase em que o cultivo crescido com o exudato testado promoveu uma inibição um pouco reduzida (9º dia) (Fig.11).

Em outras palavras, dentre as fases de crescimento testadas, os exudatos que promoveram a maior inibição no crescimento celular (6º e 15º dias), são aqueles onde se espera encontrar a maior concentração do sinal que promova esse efeito. Essas fases coincidiram com aquelas (6º e 15º dia) em foram detectadas as maiores concentrações de microcistinas nos cultivos crescidos com os exudatos em relação ao controle (fig.11). Dessa forma, os resultados apontam a possibilidade da participação de microcistinas na promoção do efeito inibitório sobre o crescimento de *Microcystis* sp.(MILJ-48).

4.2- Avaliação do efeito de concentrados do exudato do 6^o dia sobre a fisiologia de *Microcystis* sp. (MILJ-48)

4.2.1- Crescimento Celular

O crescimento celular dos cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48) em exudato do 6^o dia, os quais foram acrescentados os concentrados de exudato 50 e 100 vezes, não sofreu aumento no efeito inibitório em relação ao exudato original. As condições em que foram acrescentadas as soluções concentradas apresentaram a mesma curva de crescimento celular quanto comparadas à condição original do exudato do 6^o dia. Contudo, as três condições de exudato testadas promoveram uma inibição significativa do crescimento, quando comparadas à condição controle (fig.12).

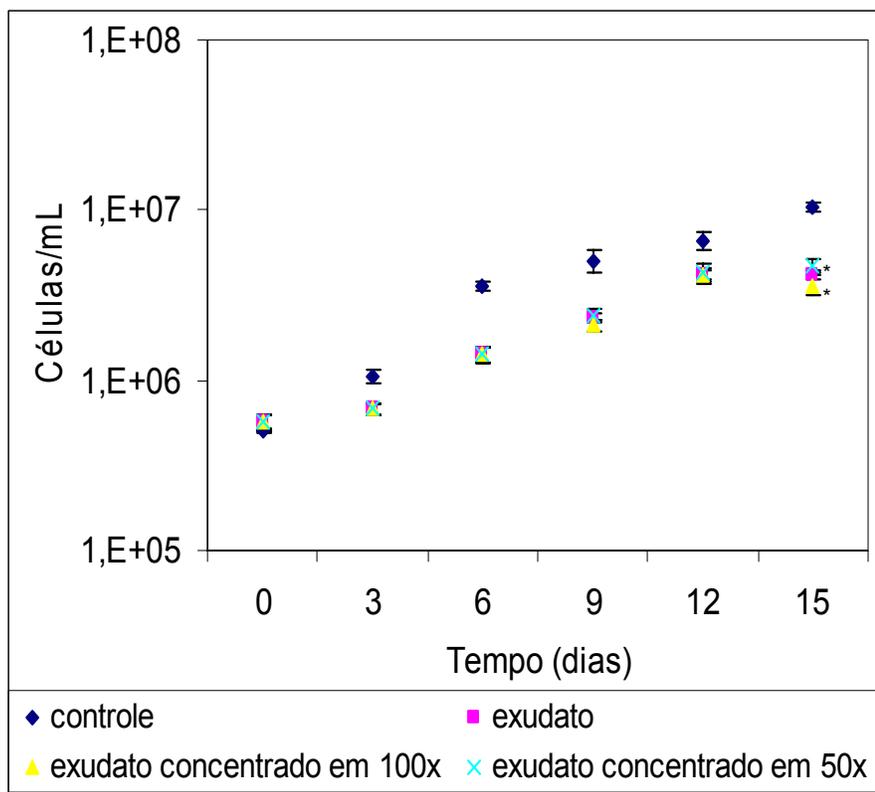


Figura 12-Curvas de crescimento de *Microcystis* sp. (MILJ-48). Condição controle, cultivos em: exudato, exudato com adição de exudato concentrado 100x e exudato com adição de exudato concentrado 50x. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa MILJ-48. Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

Existem três possibilidades de explicação para esses resultados:

1) A molécula sinalizadora pode não ter sido concentrada pelo método de liofilização; 2) A molécula sinalizadora pôde ser concentrada, no entanto, sua concentração no exudato do 6º dia já se encontra no ponto de saturação, não sendo possível uma maior percepção da molécula pelas células; 3) A molécula pode ter sido degradada durante o processo, uma vez que sua natureza química e estabilidade são desconhecidas.

A partir das curvas de crescimento obtidas das condições testadas, foram calculados o rendimento máximo (Fig.13), a taxa de crescimento (Fig.14), o tempo de duplicação e a razão máxima de crescimento, apresentados na Tabela 5. Esses resultados confirmaram a igualdade do efeito inibitório promovido pelos exudatos concentrados e o exudato original quando comparados a condição controle.

O rendimento máximo de células alcançado pelos cultivos com exudatos concentrados e com exudato original apresentou valores próximos de densidade celular. O mesmo ocorreu com os valores da velocidade máxima de crescimento. O tratamento estatístico de todas as condições confirmou uma inibição significativa ($p < 0,05$) do crescimento quando comparadas à condição controle.

Tabela.5- Valores da razão máxima de crescimento, rendimento máximo, taxa de crescimento e tempo de duplicação, obtidos a partir das curvas de crescimento de *Microcystis* sp. (MILJ-48) na condição controle e dos cultivos crescidos em: exudato, exudato com adição de exudato concentrado em 100x e exudato com adição de exudato concentrado em 50x. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa MILJ-48.

| Cultivos | Razão máx.de crescimento | Rendimento máximo | Taxa de crescimento (μ) | Tempo de duplicação(G) |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------------|------------------------|
| controle | 20,3 | $9,7 \times 10^6$ | 0,33 | 2,12 |
| exudato não concentrado | 7,3 | $3,5 \times 10^6$ | 0,16 | 4,54 |
| exudato concentrado em 50x | 8,4 | $3,0 \times 10^6$ | 0,16 | 4,54 |
| exudato concentrado em 100x | 6,3 | $4,1 \times 10^6$ | 0,16 | 4,54 |

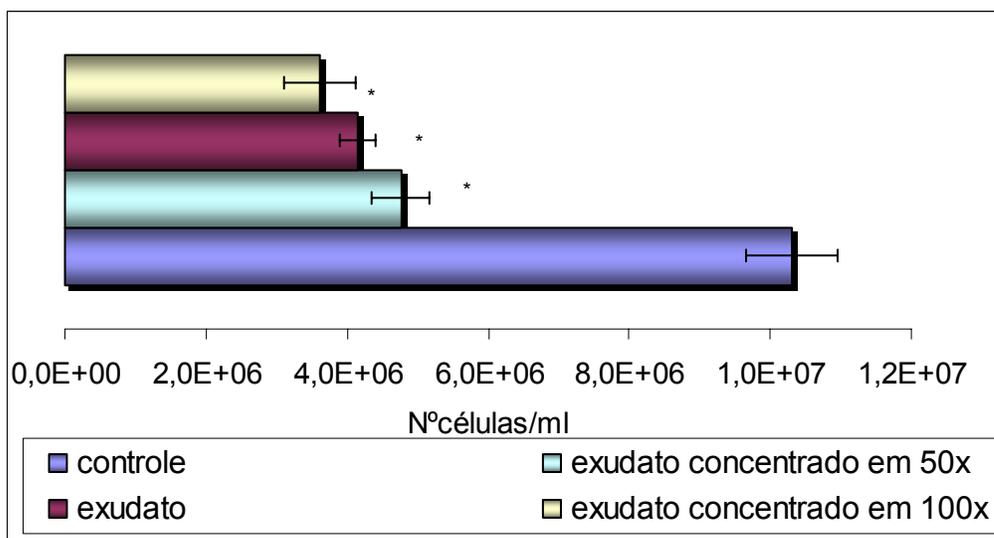


Figura 13- Variação do rendimento máximo dos cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48): controle, cultivo em exudato, cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 100x e cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 50x. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa (MILJ-48). Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

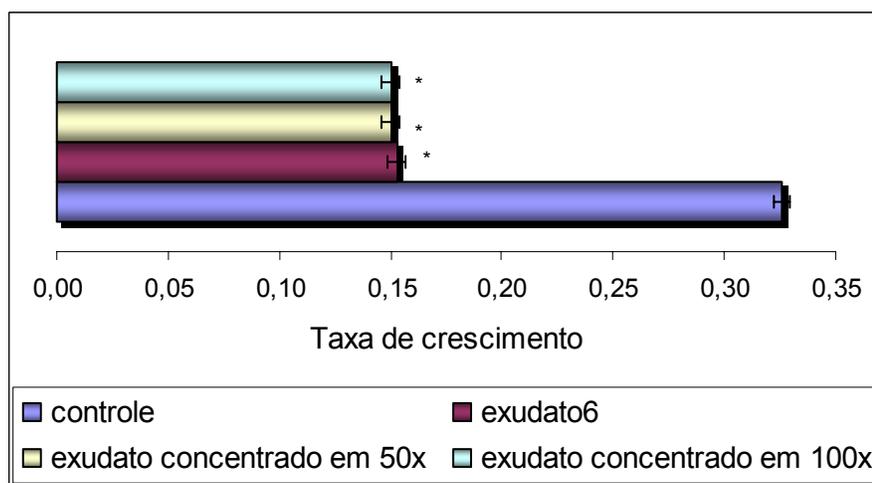


Figura 14- Variação da taxa de crescimento dos cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48): controle, cultivo em exudato, cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 100x e cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 50x. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa MILJ-48. Os

resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

4.2.2- Agregação Celular:

Foi possível observar que as células de *Microcystis sp.* crescidas nos exudatos testados, apresentaram uma tendência à agregação (Fig.15). Este comportamento foi também observado por Sedmak & Elersek (2006) em cepas de *Microcystis aeruginosa* cujas culturas foram expostas à ação das microcistinas-LR, RR, e YR. Nessas condições, as células exibiram uma tendência a formar pseudocolônias com grandes agregados de células. Os autores chamam atenção ao fato do fenômeno de agregação celular ser normalmente observado nas culturas utilizadas quando as mesmas atingem uma fase estacionária ou quando estão “velhas”, o que reproduz igualmente o comportamento da cepa MILJ-48, utilizada neste trabalho.

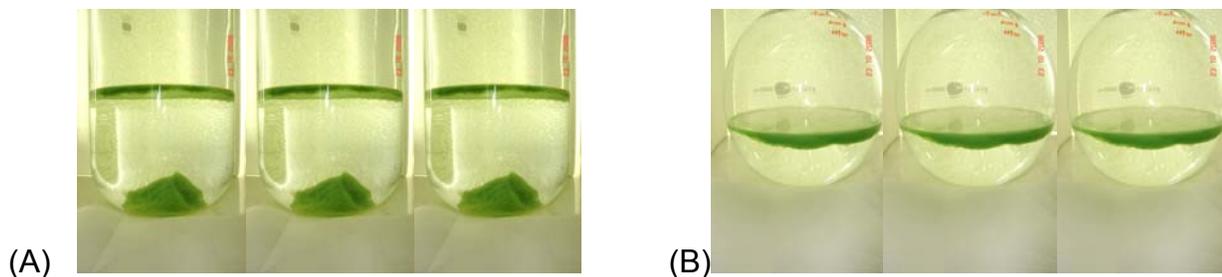


Fig.15- Efeito de agregação celular observado nos cultivos em exudatos do 6º dia (A) e a condição controle (B).

Paralelamente, comparando o fenômeno de agregação observado com cepas do gênero *Microcystis* expostas à microcistina nos cultivos, com os resultados de um estudo que envolve o sistema *quorum-starvation* em *Pseudomonas aeruginosa*, mediante a adição de um AHL às suas culturas, podemos observar que as alterações fisiológicas e morfológicas promovidas são similares (You *et al.*, 1998). Dentre as alterações morfológicas induzidas em *Pseudomonas aeruginosa*, destacou-se aumento no tamanho da célula e a agregação celular (You *et al.*, 1998). É importante ressaltar que essas foram as mesmas alterações observadas em células de *Microcystis sp.* quando a microcistina foi adicionada (Sedmak & Elersek ,2006).

Dessa forma, se ao adicionar microcistina ou exudato, as culturas adquirem uma morfologia típica de culturas em fase estacionária ou senescente, pode ser que esta seja mais uma adaptação para estender a sobrevivência provocada pelo sinal contido no exudato. Assim, novamente os efeitos promovidos pela microcistina e pelo exudato coincidem.

Em adição às modificações na morfologia externa, ao cultivar as células em meio que contenha sinais que induzam *quorum starvation*, espera-se como resposta a modificação de estruturas intracelulares. Portanto, em cianobactérias, sob limitação de nutrientes, espera-se a indução de alterações tais como degradação dos tilacóides, inclusões celulares e redução de pigmentos fotossintéticos. Apesar de não terem sido realizadas análises de estruturas intracelulares no presente trabalho, Dagnino *et al.* (2006) verificaram a degradação dos tilacóides em células de *Microcystis sp.* ao colocá-las em meio condicionado obtido de culturas clorótidas (culturas em condições de

limitação de nutrientes). Portanto, um sinal contido no meio induziu às características morfológicas que são observadas nas células quando as culturas estão em situações de escassez, mesmo que o meio esteja repleto de nutrientes. Apesar desse trabalho apresentar indícios de que cianobactéria possa realizar *quorum starvation*, resta investigar essas alterações diante da adição de microcistina em culturas de *Microcystis*.

Valdor & Aboal (2006), também observaram um efeito inibitório sobre o crescimento, com alterações de estruturas intracelulares, induzido pela adição das microcistinas LR, YR e RR e de extratos celulares de cianobactérias em culturas de outros gêneros de cianobactéria, como *Scytonema sp.*, *Phormidium sp.* e *Geitlerinema splendium*. Dentre as alterações observadas são apontadas: dilatação e desagregação dos tilacóides; formação de células de resistência nos gêneros capazes de produzi-las; descoloração; alterações na agregação das colônias; inclusões celulares, deformações e morte celular.

4.2.3- Variação na concentração de Clorofila a:

Os cultivos crescidos em exudato obtido do 6º dia e em exudato do 6º dia com adição de exudatos concentrados (100x e 50x) da cepa MILJ-48 não promoveram alterações na produção de clorofila a em relação à condição controle (Fig.16), mostrando que a adição das soluções dos exudatos concentrados não potencializou o efeito do exudato do 6º dia sobre os cultivos testados.

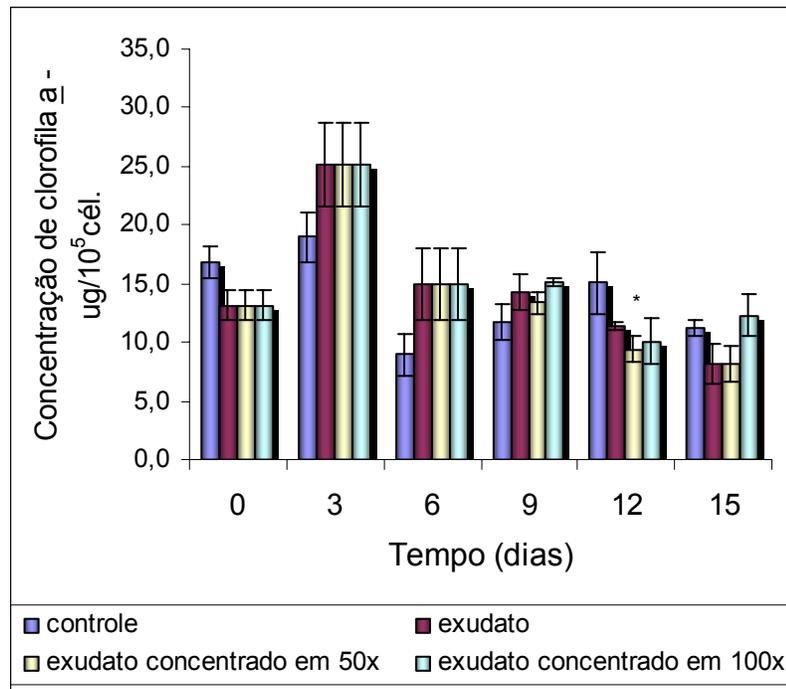


Fig.16- Variação da concentração de Clorofila a em cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48): controle, cultivo em exudato, cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 100x e cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 50x. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa (MILJ-48). Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo em relação ao controle.

Os resultados confirmam o aspecto observado nas culturas, que neste experimento não apresentaram estado de clorose como foi observado no experimento 1.

4.2.4- Concentração de microcistina intracelular

A concentração de microcistina intracelular se apresentou mais elevada no 6º dia de crescimento da cepa MILJ-48 mostrando que nesta cepa, a produção de microcistina é mais acentuada durante a fase exponencial como já foi observado em outros estudos com o mesmo gênero de cianobactéria (Kearns e Hunter, 2001; Song *et al.* 2006, Watanabe *et al.*, 1989). Este resultado é diferente do observado no experimento 1, onde o controle exibiu um pico de microcistina no 9º dia. Este fato poderia ser atribuído à idade das células utilizadas como inóculo, já que houve uma diferença de 2 dias de antecedência na idade das células utilizadas como inóculo neste experimento em relação ao anterior. De acordo com Schatz *et.al.*(2007) o efeito inibitório da microcistina foi dependente da idade das células que foram submetidas à adição de microcistina em culturas de *Microcystis* sp.

Todas as condições testadas reproduziram um mesmo padrão de produção, apresentando uma diminuição da concentração de microcistina intracelular após o 9º dia de cultivo (fig.17(A) e fig.17(B)).

O tratamento estatístico dos resultados de concentração de microcistina intracelular não apresentou diferenças significativas, embora as condições testadas com exudato tenham apresentado reduções significativas de crescimento em relação à condição controle (Fig.13 e 14).

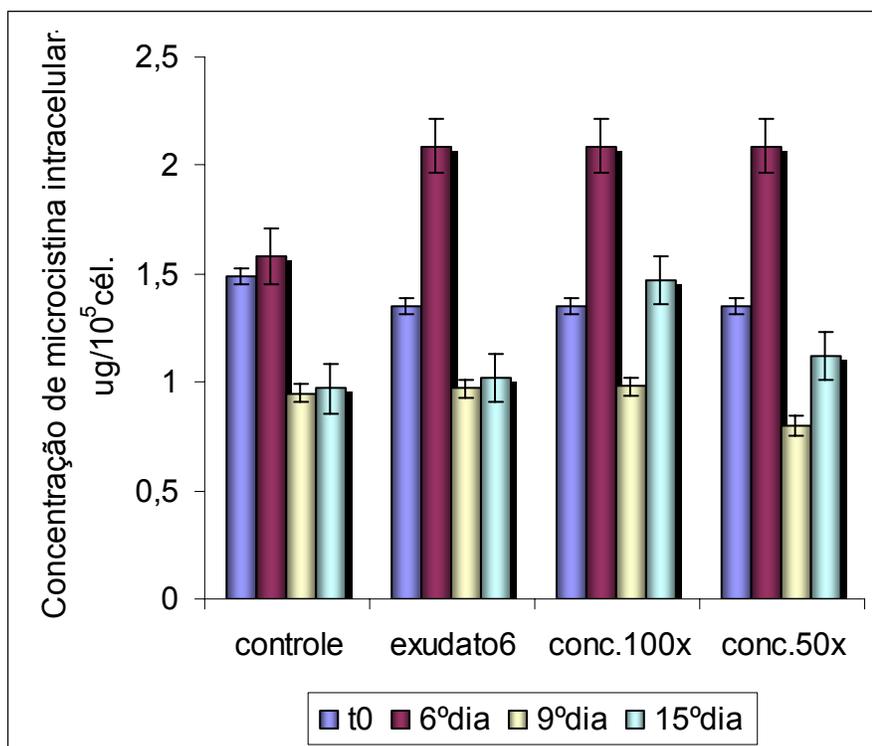


Fig.17 (A)- Produção de microcistina intracelular- $\mu\text{g}/10^5$ células em cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48) da condição controle, cultivo em exudato, cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 100x e cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 50x, de acordo com os dias amostrais: início, 6º, 9º e 15º dia experimental. Todos os exudatos foram obtidos do 6ºdia de cultivo da cepa (MILJ-48). Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

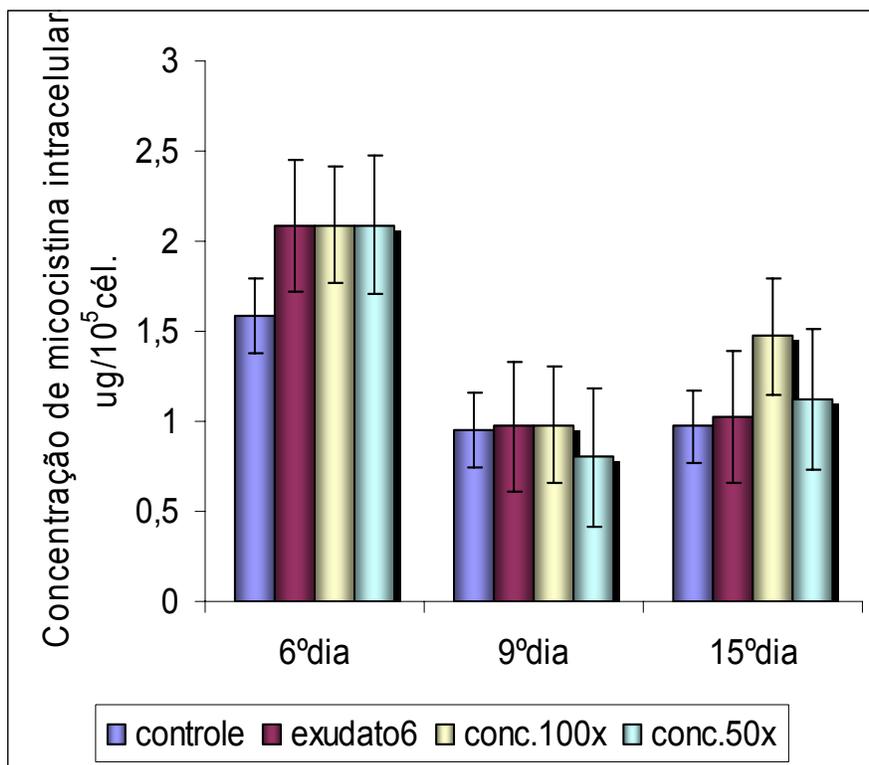


Fig.17(B)- Variação da concentração de microcistina intracelular- $\mu\text{g}/10^5$ células em cultivos de *Microcystis* sp. (MILJ-48): condição controle, cultivo em exudato, cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 50x e cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 100x, de acordo com as condições experimentais. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa (MILJ-48). Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

Ao analisar a porcentagem da variação da concentração de microcistina intracelular nos cultivos em exudatos em relação ao cultivo controle, verificou-se um aumento no 6º e no 15º dia de cultivo, com uma redução intermediária no 9º dia experimental, reproduzindo os resultados observados no experimento1 (fig.18).

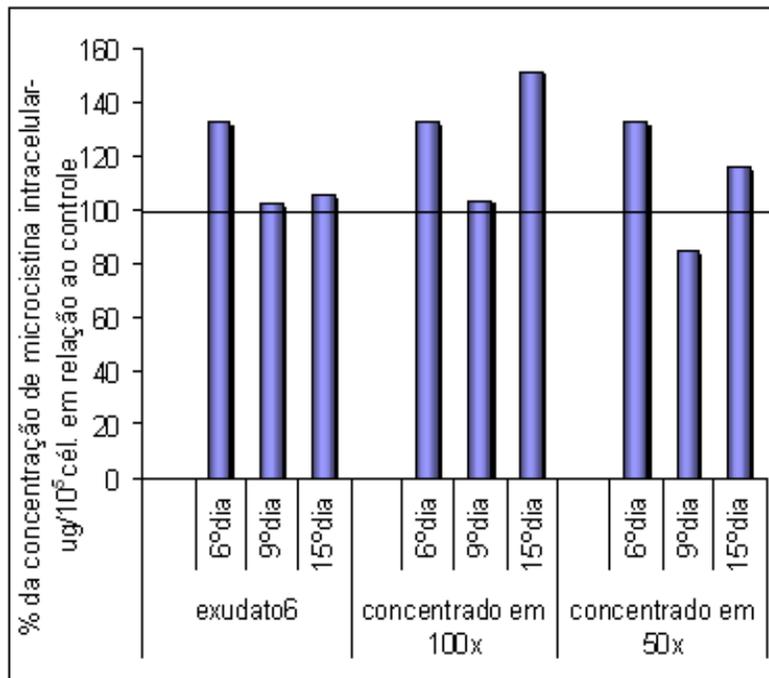


Figura 18- Porcentagem da concentração de microcistina intracelular- $\mu\text{g}/10^5$ células, detectada nos cultivos crescidos em exudato, cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 50x e cultivo em exudato com adição de exudato concentrado 100x, no início, 6º, 9º e 15º dia em relação à condição controle dos respectivos tempos amostrais. Todos os exudatos foram obtidos do 6º dia de cultivo da cepa (MILJ-48).

4.3- Análise da concentração de microcistina no meio extracelular:

Diante da suspeita da participação da microcistina na inibição do crescimento observada nos experimentos anteriormente apresentados, foi necessária uma avaliação da concentração de microcistina contida no meio extracelular (exudatos) nas fases equivalentes. Para isso, foi feito um cultivo em meio ASM-1 e foram retiradas amostras para análise de microcistina do exudato nos dias 0, 6 e 12. As análises foram realizadas utilizando o método de imunoensaio enzimático (ELISA)

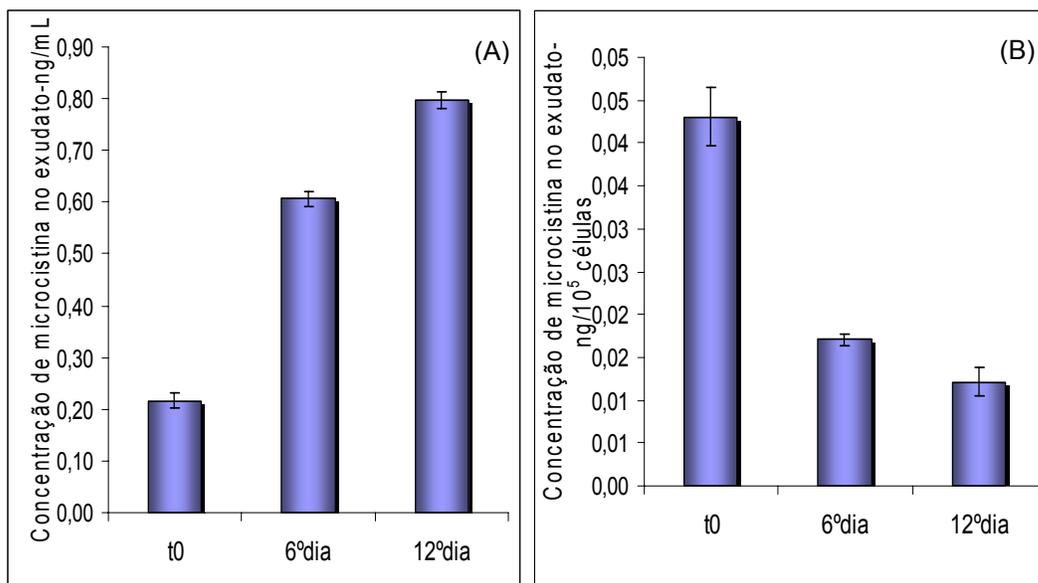


Fig.19- (A) Variação da concentração de microcistina extracelular-ng/mL da cepa MILJ-48 crescida em meio ASM-1. (B) Variação da concentração de microcistina extracelular-ng/10⁵ células da cepa (MILJ-48) crescida em meio ASM-1. Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

A diferença observada no conteúdo de microcistina no meio extracelular, comparando sua concentração em ng/ml (Fig.19(A)) e em ng/10⁵células (Fig.19(B)) mostra que apesar da microcistina tender a acumular no meio, a sua liberação pela célula parece decrescer à medida que a cultura envelhece. Contudo a produção intracelular por célula mostrada na figura 17(A) sugere uma tendência a um novo aumento no 15ºdia. Portanto, é necessário que seja realizado um acompanhamento após o 15º dia de cultivo para confirmar essa tendência.

Essa tendência a um novo acréscimo na produção de microcistina possui suporte nos resultados de Schatz *et al.* (2007), que demonstram uma maior expressão de *MycB*, uma das enzimas envolvidas na produção de microcistina pelas células de *Microcystis sp.*, na fase estacionária. Assim, pode ser que haja dois momentos distintos onde a maior produção da microcistina seja necessária para a regulação fisiológica da cepa: na fase exponencial, pois após esse período observa-se um declínio da velocidade de crescimento fazendo com que a população entre na fase estacionária; e na própria fase estacionária, já que se espera que neste período a densidade populacional se mantenha constante, dessa forma as concentrações de microcistina precisariam manter-se altas a fim de regular o crescimento das células exercendo o efeito inibitório. Portanto, tanto os resultados de Schatz *et al.* (2007) quanto os obtidos no presente trabalho, apoiariam a idéia de que a microcistina possa participar de uma regulação do crescimento das células produtoras.

O acréscimo da concentração de microcistina observado no meio extracelular (Fig.19(A)) não é surpreendente já que as condições em que foram mantidos os experimentos não propiciam a sua degradação. Além disso, esse acúmulo é compatível com a possível participação da microcistina como uma molécula sinalizadora, já que para que o processo de *quorum sensing* ocorra, precisa haver a percepção de um sinal correspondente a uma densidade celular crítica. Dessa forma, os resultados do experimento 2 também contribuem para essa explicação mostrando que o ponto crítico da concentração de um sinal pode ter sido já alcançado com a concentração do exudato do 6º dia de cultivo.

Além disso, o trabalho realizado por Schatz (2007), mostrou que a microcistina e outros peptídeos liberados de células de *Microcystis* sp. estimulam a expressão de *McyB* e que concentrações de microcistina superiores a 10µg/L não exerceram efeito adicional, mostrando que parece haver um limite para a promoção do efeito. O mesmo autor mostra que a sensibilidade das células expostas às microcistinas se apresentou dependente do estado fisiológico e que as células em fase estacionária são mais sensíveis à exposição à microcistinas respondendo mais fortemente com a maior expressão de *McyB*.

Como o que era de interesse para a análise dos experimentos nos quais foram utilizados os exudatos era a concentração absoluta de microcistinas, que ficou contida no meio de cultivo e não a sua proporção de excreção por célula, foi considerado o resultado absoluto de microcistina no exudato para correlacionar com os resultados das concentrações de microcistina dos experimentos 1 e 2.

As concentrações de microcistina detectadas no experimento 1 demonstraram uma produção diferenciada de acordo com as fases de crescimento da cepa. No entanto, como a microcistina tende a aumentar sua concentração no meio extracelular (Fig.19(A)), parece que as diferenças na produção de microcistinas totais (intra e extracelular) observadas (Fig. 10) foram resultado principalmente das variações do conteúdo intracelular. Parece que as células estão programadas a diminuir ou a aumentar a produção de microcistina em determinadas fases, o que contribui para a sugestão de que a microcistina desempenhe um papel fisiológico nas células produtoras.

4.4- Microcistina como sinalizador de densidade populacional

Para avaliar a viabilidade da hipótese de a microcistina atuar como uma molécula sinalizadora de densidade populacional, com participação no controle da divisão celular, alguns requisitos precisam ser considerados:

1º) A produção de microcistina precisaria ser influenciada pelas flutuações do meio, para assim aumentar ou reduzir de acordo com os fatores ambientais e promover as respostas adequadas às diferentes situações.

Essa dinâmica é apresentada em vários estudos que mostram variação na produção de microcistina de acordo com a intensidade luminosa, salinidade, nutrientes e temperatura (Jiang *et al.*, 2007). Além disso, o conjunto de genes da microcistina sintetase (*mcyABCDEFGHIJ*) gera dois transcritos policistrônicos, *mcyABC* e *mcyDEFGHIJ*, a partir de um promotor central localizado entre *mcyA* e *mcyD*. Ambos os transcritos possuem dois sítios de início de transcrição, usados alternadamente de acordo com a intensidade luminosa em que a cianobactéria é cultivada (Kaebernick *et al.*, 2002).

2º) Por ser um polipeptídeo pouco permeável na membrana, para que a microcistina possa ser considerada como um sinal, deveria também ser exportada pela célula, não sendo sua liberação apenas resultante da lise celular.

O conjunto de genes *mcy* inclui o gene *mcyH*, cuja seqüência apresenta alta similaridade com transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*), especialmente com o subgrupo dessa família de transportadores associado com a exportação de peptídeos não ribossomais. A inativação do gene *mcyH* resultou na perda da produção de microcistina e ainda na ausência de expressão de pelo menos um dos outros componentes do complexo *mcy*, sugerindo seu papel não apenas no transporte mas também na biossíntese de microcistina . Esses resultados reforçam questões a respeito do papel ecofisiológico da microcistina (Pearson *et al.*, 2004).

3º) A microcistina deveria promover algum efeito na própria célula produtora.

De fato, a adição das microcistinas mais comuns, microcistina-LR, microcistina-RR, e microcistina-YR, produz mudanças morfológicas e fisiológicas em cultivos de *Microcystis aeruginosa*, seja em cepas produtoras ou não das toxinas testadas (Sedmak & Elersek, 2006). Os autores ressaltam que o fato das microcistinas dissolvidas exercerem efeito na fisiologia de cianobactérias produtoras de microcistina leva a concluir que o papel dessa molécula na célula produtora é diferente de seu papel no ambiente aquático.

4º) A cepa produtora de microcistina deveria possuir alguma vantagem adaptativa em relação à não-produtora, uma vez que a sinalização deveria exercer alguma função na célula.

No entanto, a dinâmica populacional entre cepas tóxicas e não-tóxicas, tanto no ambiente quanto em condições de cultivo até agora estudadas, provam o contrário. As cepas não-produtoras de microcistina dominam os ambientes naturais (Welker *et al.*, 2003; Welker *et al.*, 2007) e competitivamente excluem as cepas produtoras em condições de cultivo (Kardinaal *et al.*, 2007).

Embora o custo fisiológico da produção de toxina ainda não tenha sido completamente elucidado, parece de fato que possui implicações nas cepas produtoras de toxina, tornando-as menos eficientes.

Em experimentos de competição entre cepas tóxicas e não-tóxicas de *Microcystis*, as cepas tóxicas foram competitivamente excluídas, mesmo com inóculo de células muito superior em relação à não-tóxica (Kardinaal *et al.*, 2007). Considerando o custo-benefício da produção de toxina, ao investir seus recursos na produção de microcistina, a cepa pode ter menos recursos disponíveis para investir em outras funções celulares.

Comparando a correlação entre microcistina e crescimento em *Microcystis* com resultados similares, obtidos em um estudo com *Vibrio harveyi*, o crescimento celular apresentou correlação com bioluminescência, sendo que a bioluminescência tendeu a diminuir a taxa de crescimento. Nesse caso, os autores sugerem que a energia canalizada para a emissão de luz compete com a energia utilizada para o crescimento (Nackerdien *et al.*, 2008).

A correlação negativa entre crescimento e concentração de microcistina foi também observada em ambientes naturais, onde foram acompanhadas florações de

Microcystis em lagos eutróficos. Com o aumento da biomassa de *Microcystis*, as florações se apresentam, em média, menos tóxicas, ou seja, quanto mais densa a floração de células de *Microcystis*, menor a concentração de microcistina detectada (Kardinaal *et al.*, 2007; Welker *et al.*, 2003).

Além disso, a média do conteúdo de microcistina por célula é tipicamente alta no início da floração de *Microcystis*, mas diminui consideravelmente no auge dessas florações (Welker *et al.*, 2003; Welker *et al.*, 2007; Kardinaal *et al.*, 2007).

Essa variação temporal entre a concentração de microcistina e a densidade celular poderia ser explicada pela variação da proporção das cepas produtoras e não produtoras que compõem a floração. A densidade de células não produtoras de microcistina é maior que a das células produtoras, no auge das florações, já que a produção de microcistina parece prejudicar a capacidade de crescimento das cepas produtoras (Kardinaal *et al.*, 2007). Desse modo, do início ao auge da floração, haveria uma sucessão temporal entre as cepas tóxicas e não tóxicas.

Pode ser que nos atuais estados de trofia dos ecossistemas aquáticos, que vem cada vez mais se apresentando como eutróficos, essa função tenha se tornado pouco útil para as cepas produtoras, o que pode ser refletido pela dominância das cepas não-tóxicas nos ambientes naturais.

Rantala *et al.* (2004) propôs a hipótese de que a capacidade de produzir microcistina esteve presente em um ancestral comum a muitos gêneros de cianobactérias e foi herdada verticalmente ao longo da diversificação dos gêneros tóxicos de cianobactéria, sendo repetidamente perdida. Todos os gêneros que

produzem microcistina contêm linhagens que não a produzem. A diferença entre as linhagens produtoras e não produtoras está na ausência de todos ou alguns genes do complexo de microcistina sintetase. Dessa forma, para o gênero *Microcystis*, os genes de microcistina sintetase estiveram originalmente presentes e as linhagens não tóxicas perderam a capacidade de produzir a toxina. Uma análise filogenética mostrou que a maioria das linhagens tóxicas de *Microcystis aeruginosa* fica agrupada enquanto que linhagens não tóxicas se distribuem por toda a árvore filogenética (Tanabe *et al.*, 2007). Além disso, em um grupo de linhagens tóxicas são encontradas também linhagens não tóxicas, o que indica que genes para a síntese da toxina podem ser perdidos ou adquiridos.

Também no caso de *Planktothrix*, todas as linhagens não tóxicas isoladas na Europa haviam perdido 90% do complexo de genes de microcistina sintetase (Christiansen *et al.*, 2008). Assim, a capacidade de uma cepa produzir microcistina depende primeiro da presença do complexo microcistina sintetase e em segundo lugar da sua expressão, sob influência de fatores ambientais.

No entanto, caso a microcistina tenha relação com a regulação fisiológica, a diminuição do metabolismo pode representar um ganho, já que capacita a população a uma autoregulação, possibilitando que a população mantenha-se por mais tempo sob situações limitantes de recursos.

Também se deve considerar que a frequência observada da co-ocorrência de cepas tóxica e não-tóxicas pode ser interpretada como decorrente de processos seletivos cujos fatores não estejam diretamente relacionados com a produção de

microcistina. Assim, a análise de custo-benefício da produção de microcistina precisa considerar que essa variação pode ser devida também a outras características ecológicas, refletindo os processos de adaptação aos respectivos ambientes.

5º) As cianobactérias precisariam possuir um sistema que fosse capaz de perceber o sinal liberado.

Embora os estudos introdutórios sobre *quorum sensing* em cianobactéria tenham sido voltados para a investigação da sinalização por meio de AHL, cianobactérias possuem o sistema sensorial de dois componentes, que consiste de uma proteína transmembrana histidina quinase (HPK) e uma proteína reguladora de resposta (RR). (Mann *et al.*, 2000). O papel de HPK seria de direcionar a fosforilação para sua proteína cognata RR, em resposta a um sinal ambiental específico. Essa fosforilação regularia a atividade de RR, geralmente envolvida na expressão gênica (Mann *et al.*, 2000).

A análise do genoma de *Synechocystis* PCC6803 indica pelo menos 44 proteínas histidina quinase e 52 proteínas reguladoras de resposta (Kaneko *et al.*, 1996) e proteínas de cianobactérias contendo os módulos HPK e RR estão envolvidas em uma ampla faixa de respostas adaptativas (Mann *et al.*, 2000).

O balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por sinais extracelulares como hormônios, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos (Jia, 1997). Em consequência à ação destes sinais, ocorre regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, regulação do metabolismo e expressão

gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Genoux *et al.*, 2002).

Portanto, considerando: (i) as alterações fisiológicas, morfológicas e moleculares induzidas nas próprias células produtoras ao adicionar microcistina em seus cultivos;(ii) as possibilidades de sinalização pela microcistina suportadas pelos trabalhos apresentados anteriormente; e (iii) os resultados verificados pelo presente trabalho, a hipótese da participação da microcistina no controle fisiológico das células produtoras justifica ser considerada e investigada.

5- CONCLUSÕES:

- 1- O cultivo da cepa de *Microcystis sp.*, MILJ-48 em exudato proveniente desta cepa resultou em inibição da sua taxa de divisão celular nas condições experimentais utilizadas.
- 2- Exudatos de *Microcystis sp.*(MILJ-48) retirados das diferentes fases de crescimento exerceram um efeito inibitório sobre o crescimento de forma variável.
- 3- A condição de cultivo na qual foi observado um efeito inibitório máximo sobre o crescimento foi aquela com exudato retirado do 6º dia de cultivo de *Microcystis sp.*
- 4- Os cultivos em exudatos apresentaram clorose, fenômeno observado em culturas em condições de limitação de nutrientes, com redução nos pigmentos fotossintéticos, o que pode significar uma redução do metabolismo da população.
- 5- As concentrações de microcistina nos exudatos obtidos da própria cepa testada apresentaram uma correlação positiva com o efeito inibitório sobre o crescimento de *Microcystis sp.* (MILJ-48).

- 6- Os efeitos dos exudatos incluíram agregação celular típica de culturas em fase estacionária.

- 7- O fato de o exudato ter exercido efeito sobre as próprias células produtoras sugere a existência de um sistema de autoregulação sensível à densidade celular, como os que utilizam moléculas sinalizadoras - *quorum sensing*.

- 8- Esses resultados nos permitem levantar a hipótese da participação da microcistina como um sinal regulatório da fisiologia das células produtoras.

6- PERSPECTIVAS FUTURAS:

6.1- Experimento com adição de microcistina às culturas de *Microcystis sp.*

Para a comprovação da hipótese de ser a microcistina uma molécula sinalizadora, faz-se necessária uma investigação na qual reúna em um só experimento as evidências colhidas de vários trabalhos, uma vez que estes se complementam, porém sozinhos não comprovam a questão.

Dagnino *et al.* (2006) demonstraram alterações estruturais internas, redução no crescimento e clorose em culturas de *Microcystis sp.* que receberam meio condicionado de culturas clorótidas de *Microcystis sp.* em que sugerem *quorum-starvation*. No entanto, não adicionaram a própria microcistina às culturas de *Microcystis sp.*, e sim o exudato da cepa estudada.

Sedmak & Elersek (2006) adicionaram microcistina em culturas de *Microcystis aeruginosa*, porém não avaliaram o efeito sobre o crescimento celular e alterações nas estruturas intracelulares, demonstrando apenas algumas alterações morfológicas.

Hu *et al.*, (2004) observaram inibição no crescimento e clorose em culturas tratadas com MC-RR, no entanto seu estudo avaliou seu efeito em *Synechococcus elongatus*, uma cianobactéria não produtora de toxina.

Apesar de Valdor & Aboal (2006) demonstrarem o efeito inibitório das microcistinas LR, YR e RR sobre o crescimento celular de alguns gêneros de três ordens distintas de cianobactéria, ainda assim, o gênero *Microcystis*, não foi testado.

Schatz *et al.*, (2007) verificaram que a lise de células de *Microcystis aeruginosa* e a adição de microcistina às culturas da própria cepa promoveram o aumento da produção de microcistinas nas células remanescentes de sua cultura, sugerindo o seu papel com info-químico, porém a variação na produção de microcistina não foi correlacionada com o crescimento da cepa, o que é importante para a sugestão do seu papel como reguladora da densidade populacional.

Portanto, surge a necessidade de testar a adição de microcistina à uma cultura de *Microcystis sp.*, verificando os parâmetros fisiológicos e morfológicos (inibição do crescimento celular, alterações de estruturas internas: degradação de tilacóides, inclusões celulares, alterações morfológicas externas: agregação celular e tamanho da célula) para a investigação da função da microcistina.

6.2- Experimento utilizando os exudatos de uma cepa de *Microcystis sp.* não produtora de microcistina.

Adicionalmente ao experimento com adição de microcistina às culturas de *Microcystis sp.*, se faz necessário um experimento complementar, submetendo as células ao crescimento em exudato de uma cepa de *Microcystis sp.* não produtora de toxina, avaliando dessa forma seu efeito e a possível participação de outras moléculas contidas no exudato.

Neste experimento seriam avaliados os mesmos parâmetros fisiológicos e morfológicos verificados no experimento com adição de microcistina, para fins comparativos.

6.3- Investigação da possível via de sinalização da microcistina

Caso os resultados dos experimentos anteriores sejam positivos, o aprofundamento dessa linha de pesquisa seria avaliar a possível via de sinalização da microcistina.

A possibilidade de microcistina funcionar como um inibidor de proteínas fosfatase das próprias cianobactérias já foi sugerida (Kaerbernich & Neilan, 2001). Tal sugestão foi levantada com base na identificação dos genes que codificam proteínas quinases e fosfatases tipo eucarióticas em *Anabaena* PCC7120 (Zhang & Libs, 1998). No entanto, a atividade das proteínas fosfatases encontradas em *Microcystis* sp. não foi inibida pela microcistina testada (Shi *et al.*, 1999).

Apesar da microcistina não exercer efeito sobre as fosfatases em cianobactéria, seu efeito em outras proteínas envolvidas no processo de fosforilação não foi ainda pesquisado.

Sabe-se que o balanço celular entre a atividade fosfatase e quinase é um mecanismo crucial para as atividades celulares e PP2A desempenha um papel importante mantendo o balanço entre sobrevivência e morte celular. Em células de mamíferos, a microcistina-LR induziu apoptose principalmente mediada pela inibição de

PP2A e conseqüente ativação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) (Komatsu *et al.*, 2007).

Portanto, permanece a possibilidade da microcistina atuar na regulação do ciclo celular em cianobactérias, atuando sobre vias de sinalização dependentes de fosforilação.

Ao analisar o contexto:

- De que a microcistina promove inibição no crescimento celular e/ou mudanças morfológicas em alguns gêneros de cianobactéria (Valdor & Aboal, 2006; Sedmak & Elersek, 2006);
- Que a microcistina exerce efeito sobre as proteínas quinases e fosfatases, que regem o ciclo celular em mamíferos (Komatsu *et al.*, 2007);
- Que proteínas quinases tipo-eucarióticas tem sido descobertas em cianobactérias (Zhang, 1993);
- Que proteínas quinases tipo-eucarióticas podem estar envolvidas em respostas fisiológicas em cianobactérias (Mann *et al.*, 2000)
- e considerando o presente trabalho.

Pode ser sugerida mais uma hipótese: a de que a microcistina possa utilizar essas proteínas como via de sinalização em cianobactérias. Essa questão é uma proposta a ser considerada em trabalhos futuros e pode vir a complementar e confirmar as sugestões do presente trabalho.

7- BIBLIOGRAFIA:

ALLEN, M.M. 1984. Cyanobacterial cell inclusions. Annu Rev Microbiol. 38: 1-25.

BABICA, P., BLÁHA, L. & MARSÁLEK, B. 2006. Exploring the natural role of microcistins- a review of effects on photoautotrophic organisms. J. Phycol. 42:9-20.

BARCO, B., LAWTON, L.A., RIVERA, J. & CAIXACH, J. 2005. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1074: 23-30 .

BRAUN, E. & BACHOFEN, R. 2004. Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. Hydrobiologia. 522:271-280.

CARMICHAEL, W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. Sci Am. 270:78-86.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. New York and London.: E&FN Spon.

CHRISTIANSEN,G., MOLITOR,C., PHILMUS,B. & KURMAYER,R. 2008. Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. Mol.Biol.Evol. 25:1695-1704.

DAGNINO, D., MEIRELES, D.A. & ALMEIDA, J.C.A. 2006. Growth of nutrient replet *Microcystis* PCC7806 culture is inhibited by an extra-cellular signal produced by chlorotic cultures. Environ Microbiol. 8:30-36.

DAI, R., LIU, H., ZHAO, X., RU, J. & HOU, Y. 2008. Relationship of energy charge and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen-limited or phosphorous-limited cultures. Toxicon. 51:649-58.

DEGRASSI, G. AGUILAR, C., BOSCO, M., ZAHARIEV, S., PONGOR, S. & VENTURI, V. 2002. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS 358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Opin Microbiol. 45:250-254.

EBERHARD, A., BURLINGAME, A.L., EBERHARD, C., KENYON, G.L., NEALSON, K.H., OPPENHEIMER, N.J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. Biochemistry. 20:2444-2449.

FALCONER, I.R. & HUMPAGE, A.R. 2005. Health risk assessment of Cyanobacterial (Blue-Green Algal) toxins in drinking water. Int J Environ Res Public Health, Basel. 2:43-50.

FEDERLE, M.J. & BASSLER, B.L. 2003. Interspecies communication in bacteria. J Clin Invest. 12:1291-1298.

FLAVIER A.B., SCHELL M.A. & DENNY T.P. 1998. An RpoS (sigma S) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. Mol Microbiol. 28: 475-486.

FOOG, G.E. & THAKE. 1987. Algae cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press, Ltd., London. Third Ed. 269p.

GENOUX, D., HADITSCH,U., KNOBLOCH,M., MICHALON,A., STORM,D. & MANSUY,I.M. 2002. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. Nature. 418:970-975.

GERA, C. & SRIVASTAVA,S. 2006. Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. Curr. Science. 90: 666-677.

GORHAN, P.R., MACLACHLAV, J.R., HAMMER, V.T. & KIM, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. Verh. Int. Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie. 15: 796-804.

HAI, T., HEIN, S. & STEINBÜCHEL, A. 2001. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA syntases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA syntases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. Strain MA19. Microbiology. 147: 3047-3060.

HALDENWANG, W.G. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. Microbiol Rev. 59:1-30.

HARRIS BZ, KAISER D. & SINGER M. 1998. The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. Genes Dev. 12:1022-1035.

HU, Z., LIU, Y. & LI, D. 2004. Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Environ Toxicol. 19:571-577.

IRETON K., RUDNER D.Z., SIRANOSIAN KJ. & GROSSMAN, A.D. 1993. Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the SpoOA transcription factor. Genes Dev. 7:283-294.

ISHIHAMA A. 1997. Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. Curr Opin Genet Dev. 7:582-588.

JIA,Z. 1997. Protein phosphatases:structures an implications. Biochem.Cell Biol. 75:17-26.

JIANG,Y., JI,B., WONG,R.N.S. & WONG,M.H. 2007. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium- *Microcystis aeruginosa*. Harmful Algae.7:127136.

KAEBERNICK,M., DITTMANN,E., BORNER,T. & NEILAN,B.A. 2002. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcistin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. Appl and Environ Microbiol. 68:449-445.

KAEBERNICK, M. & NEILAN,B.A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. FEMS Microbiol Ecol.35:1-9.

KAMEI A, YUASA T, ORIKAWA K, GENG X.X. & IKEUCHI M. 2001. A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J Bacteriol.183:1505–1510. doi: 10.1128/JB.183.5.1505-1510.2001

KANEKO, T., SATO, S., KOTANI, H., TANAKA, A., ASAMISU,E., NAKAMURA,Y., MIYAJIMA, N., HIROSAWA, M., SUGIURA,M., SASAMOTO, S., KIMURA,T., HOSOUCHI, T., MATSUNO,A., MURAKI,A., NAKAZAKI, N., NARUO,K., OKUMURA,S., SHIMPO,S., TAKEUCHI,C., WADA,T., WATANABE A., YAMADA,M., YASUDA,M. & TABATA, S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res.3:109-136.

KARDINAAL, W.E.A., TONK, L., JANSE, I., HOL, S., SLOT, P., HUISMAN,J. & VISSER,P.M. 2007. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. Appl Environ Microbiol. 2939-2946.

KEARNS, K.D. & HUNTER, M.D. 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces setting of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. Microbiol Ecology, 42: 80-86.

KELLER, L. & SURETTE, M. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol.4:248-258.

KOMATSU, M., FURUKAWA,T., IKEDA,R., TAKUMI,S.,NONG,Q., AOYAMA,K., AKIYAMA,S., KEPPLER,D. & TAKEUCHI,T. 2007. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. Oxford University press on behalf of the Society of Toxicology. p.1-60.

LAZAZZERA B.A. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. Curr Opin Microbiol. 3:177-182.

LEE, S.J., JANG, M.H, KIM, H.S., YOON, B.D. & OH, H.M. 2000. Variation of content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and stage. J.Appl.Microbiol. 89:323-329.

LONG, B.M., JONES, G.J. & ORR, P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. Appl Environ Microbiol. 67:278-283.

MACKINEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J.Biol.Chem. 140:315-322.

MANN,N.H., WIITTON,B.A. & POTTS,M.(eds) 2000. The Ecology of Cyanobacteria, 367-395.

MEIRELES, D.A. 2003. Busca por reguladores do metabolismo em cianobactérias. Monografia do Bacharelado. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

METCALF, J.S., MERILUOTO, J.A.O. & CODD, G.A., 2006. Legal and security requirements for the air transportation of cyanotoxins and toxicogenic cyanobacterial cells for legitimate research and analytical purposes. Toxicol lett, 163: 85-90.

NACKERDIEN,Z.E., KEYNAN,A., BASSLER,B.L., LEDERBERG,J. & THALER,D.S. 2008. Quorum sensing influences *Vibrio harveyi* growth rates in a manner not fully accounted for by the marker effect of bioluminescence. PLoS ONE. 3:1671.doi:10.1371.

OH, H., LEE, S.J., JANG, M. & YOON, B. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus limited chemostat. Environ Microbiol.66:176-179.

ORR, P.T., & G.J. JONES. 1998. Relationship between microcystin production and division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. Limnol. Oceanogr. 43:1604-1614.

PARKER, C.T. & SPERANDIO V. 2009. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. Cell Microbiol. 11:363-369.

PEARSON, L.A., HISBERGUES,M., BORNER,T., DITTMANN,E. & NEILAN,B.A. 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. Appl Environ Microbiol.70:6370-6378.

PESCI, E. C., MILBANK, J. B. J., PEARSON, J.P., MCKNIGHT, S., KENDE, A. S., GREENBERG, E.P., & IGLEWSKI, B. H. 1999. Quorum signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc.Natl.Acad.Sci. 96:11229-11234.

RANTALA,A., FEWER,D.P., HISBERGUES,M., ROUHAINEN,L., VAITOMAA,J., BÖRNER,T. & SIVONEN,K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. Proc.Natl.Acad.Sci.101:568-573.

READING, N.C. & SPERANDIO,V. 2006. Quorum sensing: The many languages of bacteria. FEMS Microbiol. 254:1-11.

ROHRLACK, T., DITTMANN, E., HENNING, M., BORNER, T. & KOHL, J-G. 1999. Role of Microcystin in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 65:737-739.

ROMERO, M., DIGGLE, S.P., HEEB, S., CÁMARA, M. & OTERO, A. 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp.PCC7120:identification of AiiC, a novel AHL-acylase. FEMS Microbiol Lett. 280:73-80.

SAUER,J., GORL M. & FORCHHAMMER,K. 1999. Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. Arch Microbiol.172:247-255.

SAUER,J., SCHREIBER, U., SCHMID,R., VOLKER, U. & FORCHHAMMER,K. 2001. Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. Plant Physiol 126: 233-243.

SCHATZ,D., KEREN,Y., VARDI,A., ASSAF, S., CARMELI, S., BORNER,T., DITTMANN,E. & KAPLAN,A. 2007. Towards clarification of the biological role of microcistins, a family of cyanobacterial toxins. Environ Microbiol. 9:965-970.

SCHWARZ, R. & FORCHHAMMER, K. 2005. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. Microbiology.151:2503-2514.

SEDMAK,B. & ELERSEK,T. 2006. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. Microbiol Ecol.51:508-515.

SHARIF, D.I., GALLON, J., SMITH C.J. & DUDLEY, E. 2008. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. Mult J Microbial Ecology. 2: 1171-1182.

SHI, L., CARMICHAEL,W.W. & KENNELLY,P.J. 1999. Cyanobacterial PPP family protein phosphatases posses multifunctional capabilities and are reseistant to microcistin-LR. J. Biol.Chem. 274: 10039-10046.

SÖDERBON F & LOOMIS W.F. 1998. Cell-cell sinaling during *Dictyostelium* development. Trends Microbiol. 6:402-406.

SONG, L., SANO, T., LI, R., WATANABE, M.M, LIU,Y. & KAYA, K. 2006. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycol Res, 46: 19 - 23.

TANABE, Y., KASAI, F. & WATANABE, M.M. 2007. Multicocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Microbiology.153:3695-3703.

THORNE, S.H. & WILLIAMS, H.D. 1999. Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli: identification of the role of an N-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. J Bacteriol. 181:981-990.

VALDOR, R. & ABOAL, M. 2007. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. Toxicon. 49:769-779.

WATANABE, M.F., HARADA, K-I, MATSUURA, K., WATANABE, M. & SUZUKI, M. 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). J Appl Phycol, 1: 161-165.

WATERS, C.M. & BASSLER, B.L. 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Ann Rev Cell Developmental Biology.21:319-346.

WELKER,M., DOHREN,H, TAUSCHER,H. STEINBERG,C.E.W. & ERHARD,M. 2003. Toxic *Microcystis* in shallow lake Müggelsee (Germany): dynamics, distribution, diversity. Arch.Hydrobiol. 157:227-248.

WELKER,M., SEJNOHOVÁ,L., NÉMETHOVÁ,D., DÖHREN,H., JARKOSKÝ,J. & MARSÁLEK,B. 2007. Seasonal shifts in chemotype composition of *Microcystis* sp. Communities in the pelagial and the sediment of a shallow reservoir. Limnol. Oceanogr. 52:609-619.

YOU Z., FUKUSHIMA J., TANAKA K., KAWAMOTO S. & OKUDA K. 1998. Induction of entry into the stationary growth phase in *Pseudomonas* by N-acylhomoserine lactone. FEMS Microbiol Lett. 164:99-106.

ZHANG C.C & LIBS, L. 1998. Cloning and characterization of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp.PCC7120. Molec.Gen Genet. 258:26-33.

ZHANG, X.; ZHAO, F.; GUAN, X.; YANG, Y.; LIANG, C. A. & QIN, S. 2007. Genome-wide survey of putative Serine/threonine protein kinases in cyanobacteria. BMC Genomics. 8:395.

ZHANG C.C. 1993. A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium, *Anabaena* PCC7120. Proc.Natl. Acad. Sci. 90:11840-11844.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)