

Perda de Matéria Orgânica Dissolvida por Células de *Anabaena spiroides* Expostas a Altas Intensidades de Luz

Roseli Machado dos Santos¹, Maria José Dellamano Oliveira² e Saionara Eliane Salomoni³

Introdução

Anabaena spiroides apresenta vacúolos de gás que lhe permitem fazer parte, juntamente com *Microcystis* spp, da massa flutuante de cianobactérias. Possui a habilidade de manter uma intensa produção de biomassa por extensos períodos no epilimínio, utilizando estratégias fisiológicas que lhe permitem a otimização do uso de energia durante os “blossoms” de verão. É produtora de neurotoxinas e hepatotoxinas, além de liberar geosmina, substância que confere à água odor desagradável.

Os “blossoms” de cianobactérias em reservatórios tropicais são muito frequentes, sendo importante a realização de estudos acerca da ecologia destes organismos, possibilitando, em longo prazo, o estabelecimento de soluções de manejo e gerenciamento destes ecossistemas. Sendo assim, o presente trabalho objetivou verificar se células de diferentes idades de cultivo de *Anabaena spiroides* sofrem fotoinibição da fixação de carbono, fotooxidação da clorofila e aumento na liberação de matéria orgânica dissolvida quando expostas por determinados períodos a altas irradiâncias encontradas em dias claros nos reservatórios tropicais.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado com cultura unialgal de *Anabaena spiroides*, sendo dividido em três etapas. Em todas elas houve adição do radioisótopo $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ na cultura.

A. Experimento I

A incubação de *A. spiroides* foi realizada no meio da fase exponencial de crescimento e na fase senescente (12 e 35 dias de cultivo). Sob as irradiâncias: 33, 66, 166, 376, 547, 1062 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 4 horas com amostragem inicial, a cada 2 horas e ao final do período para a determinação dos vários parâmetros de interesse, como: carbono-14 total fixado (C^{14}OT), carbono-14 na fração particulada (C^{14}OP), carbono-14 na fração dissolvida (C^{14}OD) e concentração de clorofila.

B. Experimento II

Realizado em laboratório a fim de verificar se *A. spiroides*, crescendo a 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (valor próximo a seu E_K), aumentaria sua taxa de excreção quando exposta

repentinamente à irradiância de 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (equivalente à máxima encontrada em ambiente natural).

A cultura com 12 e 35 dias de cultivo foi distribuída em frascos de teflon (transparentes à radiação UV) e incubada sob a irradiância de 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 8 horas. Amostras iniciais e a cada duas horas foram retiradas para as análises previamente mencionadas.

C. Experimento III

Seguindo os mesmos procedimentos do experimento II, a cultura de *A. spiroides* com 12 e 35 dias de cultivo foi incubada na superfície do reservatório de Barra Bonita, com o intuito de comparar as respostas fisiológicas apresentadas sob condições naturais com aquelas obtidas em laboratório. A incubação foi feita em frascos de policarbonato (opaco a UV) e de quartzo (transparente a UV), a fim de avaliar possíveis diferenças nas respostas apresentadas pela cianobactéria sob ação da UV.

A quantificação do carbono fixado seguiu os cálculos descritos por Steemann-Nielsen [1], com modificações de Teixeira [2]. As medidas de radioatividade por cintilação líquida foram feitas segundo Vieira e Aidar-Aragão [3], obtidas através da utilização de um contador de cintilação líquida Packard (Downers Grove, Illinois) Tricarb 1550. Os cálculos foram feitos segundo Vieira et al. [4]. A concentração de clorofila foi mensurada segundo Talling e Driver [5].

Aos três experimentos foi aplicado o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A. Experimento I

Ao longo do experimento de 4 horas (“curva de luz”), *A. spiroides* apresentou incremento na fixação de carbono, até o ponto E_K , mantendo-se estável até 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Houve queda significativa ($p < 0,05$) na fixação somente à irradiância de 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para as duas idades analisadas (Tab. 1). O incremento na fixação de C^{14}OP está diretamente relacionado à fotossíntese, assim em condições de irradiâncias máximas ocorreu fotoinibição da fixação de carbono pelas células nas duas idades analisadas. A liberação de

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP, C. P.676.

2. Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP, C. P.676.

3. Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP, C. P.676.

Apoio financeiro: FAPESP

$C^{14}OD$ teve um incremento significativo ($p < 0,05$) que acompanhou o aumento das intensidades luminosas, sendo mais expressivo sob a irradiância de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tab. 1), para ambas as idades.

A influência de altos valores de irradiância sobre o fitoplâncton é amplamente abordada na literatura, indicando danos na membrana celular que afetam sua permeabilidade e resultam no aumento da liberação de matéria orgânica [6, 7, 8]. Por outro lado, o aumento da excreção celular de microalgas pode representar uma forma do organismo desfazer-se do excesso de carbono na célula [9]. Sendo assim, não é possível afirmar que o incremento da excreção celular esteja vinculado a qualquer dano na integridade física da cianobactéria, sendo necessárias análises mais específicas, como o estudo da ultraestrutura das cianobactérias após o período experimental, permitindo a observação tanto de danos como de adaptações que possam resultar da exposição a diferentes níveis de irradiância [10].

Apesar da concentração de clorofila ter declinado juntamente com o aumento da irradiância incidente (Tab. 1), isto não indica fotooxidação da membrana celular, pois, do contrário, este dano teria causado a queda total na fixação de $C^{14}OP$ devido à morte celular. Possivelmente o declínio sob as irradiâncias superiores a $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ está relacionado com o processo de adaptação a altas intensidades ou com um pequeno grau de fotobranqueamento e até fotooxidação da clorofila-a de *A. spiroides*.

B. Experimento II

Após 8 horas de incubação da cultura de *A. spiroides* com 12 e 35 dias de idade à irradiância de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ houve uma perda significativa do carbono fotoassimilado pela cianobactéria, indicando que a fotoinibição que ocorre sob altas irradiâncias causa também um aumento da liberação de matéria orgânica dissolvida (MOD) previamente fotoassimilada (Tab. 2). Não foi observada a influência da idade celular na liberação de MOD, o que pode resultar de um fator de estresse potencial causado pelo excesso de radiação incidente. *A. spiroides* apresentou queda significativa na concentração de clorofila para as duas idades analisadas. Porém, somente a cultura com 35 dias de cultivo apresentou fotooxidação do pigmento, indicando influência da idade celular na resposta fisiológica da cianobactéria (Tab. 2).

C. Experimento III

Quando incubada no Reservatório de Barra Bonita, *A. spiroides* com 12 e 35 dias de cultivo apresentou respostas semelhantes àquelas encontradas no experimento realizado em laboratório, com fotoinibição na fixação de $C^{14}OP$ acompanhada pelo incremento na liberação de $C^{14}OD$ (Tab. 3). Não foram constatadas diferenças significativas entre as respostas fisiológicas apresentadas por *A. spiroides*, quando comparamos os frascos utilizados. A concentração de clorofila apresentou declínio para as duas idades analisadas, independente do frasco utilizado na incubação (Tab. 3). Espécies de *Anabaena* são mais suscetíveis ao oxigênio reativo (simples) gerado pelo excesso de radiação UVB,

envolvido em danos oxidativos, e branqueamento da clorofila [11].

A fotorespiração que reduz a fixação de CO_2 é incrementada sob condições de altas intensidades de luz e excesso de O_2 , juntamente com baixos níveis de CO_2 livre, levando a inibição temporária da fixação de N_2 , mesmo nos heterocistos de *Anabaena*, devido aos altos níveis de oxigênio dissolvido no ambiente [12]. Isto explica, em parte, a menor resistência desta cianobactéria às irradiâncias às quais foi exposta.

Agradecimentos

A agência financiadora FAPESP, Proc. 04/05939-4.

Referências

- [1] STEEMANN-NIELSEN, E. 1952. The use of radio-active carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 18: 117-140.
- [2] TALLING, J.F. E DRIVER, D. 1963. *Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton*. Proc. Conference on Productivity Measurements, Marine and Fresh Waters; Held. Univ. Have 1961. U.S. Atomic energy Comm. TID- 7633 142-146.
- [3] TEIXEIRA, C, 1973. Introdução aos métodos para medir produção primária do fitoplâncton marinho. *B. Inst. Oceanogr. USP*, 22: 59-92.
- [4] VIEIRA, A. A. H. E AIDAR-ARAGÃO, E. 1983. O emprego de cintilação líquida no estudo da excreção de matéria orgânica dissolvida pelo fitoplâncton. *B. Inst. Oceanogr. USP*, 31(1): 39-53.
- [5] VIEIRA, A. A. H., COLOMBO, V., ROCHA, O. 2002. Release of extracellular carbohydrates by *Peridinium willei* (Dinophyceae) under different irradiances. *Hoehnea*, 29: 241-247.
- [6] IGNATIADES L. E FOGG G. E. 1973. Studies on tehe factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (greville) cleve in culture. *J. Mar. Biol. Ass. Unit. King.*, 53: 937-956.
- [7] NALEWAJKO, C., DUNSTALL, T. G., SHEAR, H. 1976. Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algal-bacterial cultures: significance in estimation of total (gross) phytoplankton excretion rates. *J. Phycol.* 12 (1): 1-5.
- [8] MYKLESTAD, S. M., 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci. Tot. Environ.* (165): 155-164.
- [9] STAATS, N., STAL, L. J., DE WINDER, B., MUR, L. R. 2000. Oxygen photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 193: 261-269.
- [10] HOLZINGER, A. E LÜTZ, C. 2006. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37: 190-207.
- [11] HE, Y.Y., HÄDER, D. P., 2002. Uv-b-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp: protective effects of ascorbic acid and n-acetyl-L-cysteine. *J. Photochem. Photobiol.* 66(2): 115-124.
- [12] TOLBERT, N. 1974. Photorespiration,. In: STEWART, W. D. P. (Ed), *Algal Physiology And Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 474-504

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros analisados durante o experimento I com *Anabaena spiroides* com 12 e 35 dias de cultivo após 4 horas de exposição a diferentes irradiâncias.

Fase de crescimento	Irradiância ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	C^{14}OT (DPM.ml ⁻¹)	C^{14}OP (DPM.ml ⁻¹)	C^{14}OD (DPM.ml ⁻¹)	Liberção de C^{14}OD (%)	Clorofila (Mg/L ⁻¹)
Exponencial	0	4158 ± 216	3571 ± 212	338 ± 14	9 ± 0,5	0,35 ± 0,01
	60	206125 ± 9029	186295 ± 8973	8579 ± 94	4 ± 0,2	0,44 ± 0,01
	200	461310 ± 32654	448137 ± 32724	25732 ± 169	5 ± 0,4	0,43 ± 0,01
	400	545277 ± 13830	533683 ± 13737	25354 ± 180	4 ± 0,1	0,44 ± 0,01
	1000	523642 ± 15576	514938 ± 15554	22445 ± 123	4 ± 0,1	0,3 ± 0,01
	2000	73993 ± 1431	48065 ± 1462	25445 ± 96	35 ± 0,7	0,05 ± 0,01
Senescente	0	4066 ± 323	3721 ± 310	344 ± 23	8,5 ± 0,6	0,31 ± 0,03
	60	194875 ± 25559	186295 ± 25487	8579 ± 87	4,5 ± 0,5	0,32 ± 0,02
	200	472560 ± 33658	446887 ± 33741	25673 ± 230	5,5 ± 0,4	0,37 ± 0,01
	400	549027 ± 18952	523683 ± 18949	25344 ± 168	5 ± 0,2	0,37 ± 0,01
	1000	529892 ± 36112	507438 ± 36062	22453 ± 117	4,5 ± 0,3	0,3 ± 0,02
	2000	73879 ± 1265	48440 ± 1241	25439 ± 122	34 ± 0,6	0,06 ± 0,02

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros analisados durante o experimento II com *Anabaena spiroides* com 12 e 35 dias de cultivo após 8 horas de exposição à irradiância de 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Fase de crescimento	Tempo (horas)	C^{14}OP (DPM.ml ⁻¹)	Perda de C^{14}OP (%)	C^{14}OD (DPM.ml ⁻¹)	Clorofila (Mg/L ⁻¹)
Exponencial	0	109841 ± 692	0	3786 ± 561	0,11 ± 0,01
	2	101176 ± 2022	7 ± 1,2	4493 ± 59	0,1 ± 0,01
	4	92417 ± 2530	16 ± 1,3	4782 ± 72	0,06 ± 0,01
	6	88768 ± 7455	24 ± 1,3	4841 ± 84	0,06 ± 0,01
	8	74687 ± 10286	31 ± 3	53120 ± 361	0,01 ± 0,01
Senescente	0	160111 ± 2726	0	4420 ± 62	0,15 ± 0,006
	2	148113 ± 2268	7 ± 2,6	5049 ± 119	0,15 ± 0,006
	4	135057 ± 2691	16 ± 2,4	5629 ± 39	0,11 ± 0,01
	6	121475 ± 1581	24 ± 1,3	6266 ± 43	0,04 ± 0,013
	8	115597 ± 1124	28 ± 1,6	77251 ± 149	0 ± 0

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros analisados durante o experimento III com *A. spiroides* com 12 e 35 dias de cultivo após 8 horas de exposição à irradiância de 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no reservatório de Barra Bonita.

Fase de crescimento	Frasco	Tempo (horas)	C^{14}OP (DPM.ml ⁻¹)	Perda de C^{14}OP (%)	C^{14}OD (DPM.ml ⁻¹)	Clorofila (Mg/L ⁻¹)
Exponencial	Policarbonato	0	116970 ± 773	0	1304 ± 6	0,9 ± 0,01
		2	99615 ± 834	15 ± 0,9	3525 ± 23	0,81 ± 0,01
		4	93405 ± 422	20 ± 0,7	10172 ± 14	0,75 ± 0
		6	90457 ± 922	23 ± 0,45	20628 ± 84	0,73 ± 0,005
		8	82532 ± 1317	29 ± 1,1	22363 ± 93	0,7 ± 0,01
	Quartzo	0	116970 ± 773	0	1325 ± 52	0,9 ± 0,01
		2	110701 ± 3276	5 ± 3,1	2928 ± 49	0,78 ± 0,01
		4	98635 ± 921	16 ± 1,3	4137 ± 11	0,76 ± 0,011
		6	85772 ± 1982	27 ± 2	12445 ± 201	0,72 ± 0,01
		8	78607 ± 544	33 ± 0,9	18931 ± 560	0,61 ± 0,01
Senescente	Policarbonato	0	106834 ± 367	0	2299 ± 20	0,99 ± 0,01
		2	91780 ± 501	14 ± 0,6	4556 ± 23	0,84 ± 0,005
		4	90353 ± 265	15 ± 0,4	10291 ± 77	0,76 ± 0,02
		6	88535 ± 1132	17 ± 1,2	23676 ± 61	0,72 ± 0,01
		8	80393 ± 268	25 ± 0,35	28475 ± 93	0,68 ± 0,011
	Quartzo	0	106834 ± 367	0	1325 ± 52	0,93 ± 0,015
		2	110701 ± 3276	4 ± 0,7	2928 ± 49	0,74 ± 0,01
		4	98635 ± 921	9 ± 1,2	4137 ± 11	0,72 ± 0,01
		6	85772 ± 1982	29 ± 1,6	12445 ± 201	0,65 ± 0,03
		8	78607 ± 544	32 ± 0,7	18931 ± 560	0,42 ± 0,015