

Perda de Matéria Orgânica Dissolvida por Células de *Microcystis Aeruginosa* Expostas a Altas Intensidades de Luz

Roseli Machado dos Santos¹, Armando Augusto Henriques Vieira², Maria José Dellamano Oliveira³ e Saionara Eliane Salomoni³

Introdução

Microcystis aeruginosa é uma das cianobactérias que frequentemente formam florescimentos no Reservatório de Barra Bonita. A flutuação desse organismo e a turbulência característica do reservatório fazem com que as células que estavam iniciando o desenvolvimento do florescimento nas camadas inferiores da coluna fótica sejam rapidamente expostas a altas intensidades de luz. Esta exposição repentina a irradiâncias elevadas pode causar fotoinibição e mesmo fotooxidação, liberando uma grande quantidade de matéria orgânica dissolvida [1].

O presente trabalho objetivou verificar se células de diferentes idades de cultivo de *Microcystis aeruginosa* 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.

Material e métodos

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

A. Experimento I

A cultura de *M. aeruginosa* no início e no meio da fase exponencial de crescimento e na fase senescente (14, 28 e 49 dias de cultivo) foi incubada em frascos de policarbonato a diferentes irradiâncias: 33, 66, 166, 376, 547, 1062 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (segundo aquelas encontradas no Reservatório de Barra Bonita em dias claros), 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 *M. aeruginosa*, 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 14 e 49 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 *M. aeruginosa* com 14 e 49 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 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 [2], com modificações de Teixeira [3]. As medidas de radioatividade por cintilação líquida foram feitas segundo Vieira e Aidar-Aragão [4], obtidas através da utilização de um contador de cintilação líquida Packard (Downers Grove, Illinois) Tricarb 1550. Os cálculos foram feitos segundo Vieira et al., [1]. 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

Quando exposta as diferentes irradiâncias durante 4 horas, *M. aeruginosa* com 14 e 49 dias apresentou incremento ($p < 0,05$) na fixação de C^{14}OP , acompanhando o aumento da intensidade luminosa até a irradiância de 400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e estabilizando-se sob as irradiâncias superiores a esta. A cultura com 49 dias apresentou um incremento ($p < 0,05$) na fixação de C^{14}OP somente até a irradiância de 200 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Tab. 1).

Organismos fotossintéticos apresentam habilidade em

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. Professor Titular do Departamento de Botânica - Laboratório de Ficologia, 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

captar radiação fotossinteticamente ativa suficiente para uma fotossíntese eficiente enquanto minimizam a fotoinibição ou os danos resultantes da exposição a esta radiação [6].

A excreção celular de *M. aeruginosa* com 14 e 28 dias de cultivo apresentou aumento significativo somente sob a irradiância de 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Porém, houve aumento na liberação de C^{14}OD pela cultura com 49 dias de cultivo já a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, indicando que culturas mais velhas sofreram maior influência de altas irradiâncias (Tab. 1). Houve queda significativa na concentração de clorofila da cultura com 14 e 49 dias de cultivo somente quando exposta a irradiância de 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p < 0,05$) (Tab. 1). Apesar da queda na concentração de clorofila ser estatisticamente significativa, não houve fotooxidação do pigmento, sendo mais provável que esta seja uma resposta fotoadaptativa da cianobactéria, na qual os níveis de clorofila e outros pigmentos como carotenóides apresentam decaimento [6].

B. Experimento II

M. aeruginosa com 14 e 49 dias de cultivo não apresentou queda significativa do C^{14}OP fixado quando exposta durante 8 horas a 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A liberação de matéria orgânica dissolvida (MOD) manteve-se estável ao longo de todo o período de exposição, indicando grande resistência desta cianobactéria a altas intensidades luminosas, mesmo quando o tempo de exposição foi superior a 4 horas. Houve perda significativa ($p < 0,05$) de pigmento pela cultura nas duas idades de cultivo (Tab. 2), porém esta não indicou fotooxidação do pigmento.

C. Experimento III

Quando incubada no reservatório de Barra Bonita a cianobactéria apresentou fotoinibição na fixação de C^{14}OP para as duas idades ($p < 0,05$), havendo interferência do tipo de frasco utilizado, pois a cultura incubada em frascos de policarbonato apresentou fotoinibição somente na 8ª hora de exposição a 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto a cultura incubada em frasco de quartzo apresentou fotoinibição já na 4ª hora de exposição (Tab. 3). O incremento na liberação de C^{14}OD acompanhou o declínio de C^{14}OP para as duas idades analisadas, havendo também interferência do tipo de frasco na resposta fisiológica da cianobactéria, pois a cultura incubada em frasco de policarbonato apresentou uma concentração de C^{14}OD , liberado na 8ª hora, superior àquela apresentada pela cultura incubada em frasco de quartzo neste mesmo período. Esta diferença nas concentrações de C^{14}OD liberado entre os frascos pode resultar do processo de fotodegradação da MOD sob influência da radiação UV [7], que degradaria o radioisótopo $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ em C^{14}O_2 , possibilitando sua re-assimilação através da fotossíntese. Porém, como não houve incremento na fixação C^{14}OP pela cultura incubada em frascos de quartzo na 8ª hora de exposição, é possível que o C^{14}O_2 , oriundo da fotodegradação ou da fotorespiração, tenha passado a integrar a fração inorgânica do carbono-14 que não foi fotoassimilado.

Isto explica porque, em alguns casos, o C^{14}OD mensurado não correspondeu à perda de C^{14}OP . A concentração de clorofila na cultura com 14 e 49 dias de cultivo apresentou declínio, independente do frasco utilizado em sua incubação (Tab. 3).

Neste trabalho, a cianobactéria *M. aeruginosa* mostrou-se resistente ao maior nível de irradiância, incluindo a faixa UV, mesmo quando a exposição foi prolongada, o que pode ter ocorrido em função de características fotoadaptativas adicionais presentes em alguns grupos de cianobactérias [8,9]. Estes autores sugerem que a resistência de algumas cianobactérias a UVB está relacionada com a rápida mudança de sua expressão gênica que leva ao acúmulo de proteínas e carotenóides, o reparo do DNA por fotoreativação; o acúmulo de enzimas antioxidantes e a produção de aminoácidos semelhantes à micosporinas. Porém, é muito importante a realização de estudos com populações naturais em laboratório e campo, pois divergências drásticas podem ser observadas na resposta entre cianobactérias pertencentes a populações naturais e cultivadas dentro da mesma espécie, quando expostas à altos níveis de radiação ultravioleta.

Referências

- [1] VIEIRA, A. A. H., COLOMBO, V., ROCHA, O. 2002. Release of extracellular carbohydrates by *Peridinium willei* (Dinophyceae) under different irradiances. *Hoehnea*, 29: 241-247.
- [2] 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.
- [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] 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.
- [6] DILLON, J. G., MILLER, S. R., CASTENHOLZ, R. W. 2003. UV-Acclimation responses in natural of cyanobacteria (*Calothrix* sp.). *Environ. Microbiol.*, 5(6): 473-483.
- [7] ACHTERBERG, E. P.; VAN DEN BERG, C. M. G. 1994. In-line ultraviolet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. *Anal. Chim. Acta* 291:213-232.
- [8] MAC DONALD, T., DUBOIS, L., SMITH, C., CAMPBELL, A. 2003. Sensitivity of Cyanobacterial Antenna, Reaction Center and CO_2 Assimilation Transcripts and Proteins to Moderate UVB: Light Acclimation Potentiates Resistance to UVB. *Photochem. Photobiol.* 77(4): 405-412.
- [9] SINHÁ, R. P., KLISCH, M., GRÖNIGER, A., HADER, D. P. 1998. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 47: 83-94.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros analisados durante o experimento I com *Microcystis aeruginosa* com 14, 28 e 49 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)	Liberação de C ¹⁴ OD (%)	Clorofila (Mg/L ⁻¹)
Exponencial (início)	0	229 ± 54	185 ± 60	44 ± 8	21 ± 8	0,11 ± 0,005
	60	54745 ± 3178	44366 ± 3688	10379 ± 651	19 ± 2	0,13 ± 0
	200	62769 ± 4036	52162 ± 3911	10606 ± 152	17 ± 0,9	0,13 ± 0,01
	400	66860 ± 3472	56073 ± 3441	10787 ± 46	16 ± 0,8	0,13 ± 0,01
	1000	66547 ± 4170	56067 ± 4216	10480 ± 250	16 ± 1	0,11 ± 0,013
	2000	63400 ± 1966	50837 ± 1898	12563 ± 608	20 ± 1	0,04 ± 0,005
Exponencial (meio)	0	-----	111 ± 10	-----	-----	0,19 ± 0,01
	60	51250 ± 6664	47183 ± 6705	4067 ± 56	8 ± 1	0,21 ± 0
	200	83914 ± 1893	76626 ± 1978	7315 ± 383	9 ± 0,5	0,22 ± 0,01
	400	82418 ± 1923	75261 ± 1924	7157 ± 4,6	9 ± 0,2	0,21 ± 0,01
	1000	88510 ± 7131	81410 ± 7197	7100 ± 69	8 ± 0,7	0,2 ± 0,005
	2000	88310 ± 3273	80774 ± 3293	7536 ± 47	8 ± 0,3	0,14 ± 0,01
Senescente	0	238 ± 7,3	120 ± 5,6	118 ± 3	50 ± 1	0,14 ± 0,005
	60	61305 ± 973	56546 ± 847	4759 ± 188	8 ± 0,2	0,16 ± 0,005
	200	94670 ± 704	82489 ± 695	12211 ± 69	13 ± 0,1	0,17 ± 0,005
	400	94601 ± 2445	76062 ± 2382	18539 ± 156	20 ± 0,5	0,14 ± 0,01
	1000	93149 ± 2158	74422 ± 2334	18727 ± 330	20 ± 0,7	0,09 ± 0,005
	2000	92336 ± 2176	74852 ± 2259	17484 ± 107	19 ± 0,5	0,07 ± 0,014

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros analisados durante o experimento II com *Microcystis aeruginosa* com 14 e 49 dias de cultivo após 8 horas de exposição a irradiância de 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Fase de crescimento	Irradiância ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Tempo (horas)	C ¹⁴ OP (DPM.ml ⁻¹)	Perda de C ¹⁴ OP (%)	C ¹⁴ OD (DPM.ml ⁻¹)	Clorofila (Mg/L ⁻¹)
Exponencial (meio)	2000	0	111846 ± 517	0	573 ± 77	0,06 ± 0,002
		2	109738 ± 300	2 ± 0,45	1614 ± 68	0,055 ± 0,004
		4	109169 ± 537	2 ± 0,75	2039 ± 27	0,054 ± 0,003
		6	106017 ± 724	5 ± 0,77	2406 ± 36	0,049 ± 0,003
		8	93251 ± 868	17 ± 0,71	3220 ± 60	0,038 ± 0,003
Senescente	2000	0	154308 ± 1361	0	488 ± 76	0,1 ± 0,005
		2	154183 ± 1918	0,1 ± 0,9	1679 ± 68	0,1 ± 0,013
		4	145586 ± 2908	6 ± 2,4	2018 ± 27	0,09 ± 0,014
		6	142540 ± 3557	8 ± 2,7	2049 ± 35	0,07 ± 0,01
		8	134319 ± 2329	13 ± 1,3	3309 ± 70	0,05 ± 0,005

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros analisados durante o experimento III com *M. aeruginosa* com 14 e 49 dias de cultivo após 8 horas de exposição a 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 (meio)	Policarbonato	0	105334 ± 2072	0	2084 ± 53	0,051 ± 0,001
		2	95135 ± 581	10 ± 1,5	5228 ± 18	0,049 ± 0,001
		4	85821 ± 3513	18 ± 4,3	5538 ± 42	0,041 ± 0,002
		6	86163 ± 3525	18 ± 2,5	9041 ± 28	0,039 ± 0,0005
	Quartzo	8	75290 ± 3776	28 ± 5	10023 ± 6	0,033 ± 0,002
		0	105334 ± 2072	0	2084 ± 53	0,06 ± 0,0005
		2	95334 ± 1536	9,5 ± 1,6	2279 ± 48	0,047 ± 0,001
		4	85364 ± 398	19 ± 1,7	4295 ± 85	0,04 ± 0,001
Senescente	Policarbonato	6	81388 ± 169	23 ± 1,4	5482 ± 191	0,033 ± 0,002
		8	63760 ± 2535	39,5 ± 2	7897 ± 36	0,027 ± 0,002
		0	87622 ± 1595	0	970 ± 15	0,051 ± 0,001
		2	83409 ± 3655	4,8 ± 3,7	1520 ± 54	0,047 ± 0,001
	Quartzo	4	85337 ± 2065	2,5 ± 3,7	1929 ± 31	0,041 ± 0,002
		6	81929 ± 2664	6 ± 4	3421 ± 119	0,035 ± 0,002
		8	73284 ± 3253	7,8 ± 2	8282 ± 57	0,03 ± 0,001
		0	89700 ± 283	0	975 ± 9	0,05 ± 0,0005
Quartzo	2	83428 ± 372	4,8 ± 4	1337 ± 2	0,047 ± 0,001	
	4	78244 ± 1369	2,5 ± 4	2043 ± 8	0,034 ± 0,0005	
	6	73925 ± 4092	6 ± 4	2554 ± 40	0,031 ± 0,001	
	8	70529 ± 183	16 ± 4	5549 ± 27	0,02 ± 0,002	