UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I- CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GADUAÇÃO EM LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MATEUS SANTOS DE ARAÚJO SILVA

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE NUTRIENTES E TEMPERATURAS SOBRE O CRESCIMENTO, PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE SAXITOXINAS PELA CIANOBACTÉRIA *Raphidiopsis raciborskii.*

CAMPINA GRANDE- PB
2024

MATEUS SANTOS DE ARAÚJO SILVA

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE NUTRIENTES E TEMPERATURAS SOBRE O CRESCIMENTO, PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE SAXITOXINAS PELA CIANOBACTÉRIA *Raphidiopsis raciborskii.*

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado a Coordenação do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa

Coorientadora: Dra. Ranielle Daiana dos Santos Silva

CAMPINA GRANDE- PB
2024

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586i Silva, Mateus Santos de Araujo.

Influência de níveis de nutrientes e temperaturas sobre o crescimento, produção e liberação de saxitoxinas pela cianobactéria Raphidiopsis raciborskii. [manuscrito] / Mateus Santos de Araujo Silva. - 2024.

26 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa , Coordenação de Curso de Biologia - CCBS. "

"Coorientação: Prof. Dr. Ranielle Daiana dos Santos Silva , UEPB - Universidade Estadual da Paraíba "

1. Eutrofização. 2. Mudanças climáticas. 3. Algas nocivas. 4. Cianotoxinas. I. Título

21. ed. CDD 570

Elaborada por Bruno R. F. de Lima - CRB - 15/1021 BC/UEPB

MATEUS SANTOS DE ARAÚJO SILVA

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE NUTRIENTES E TEMPERATURAS SOBRE O CRESCIMENTO, PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE SAXITOXINAS PELA CIANOBACTÉRIA *Raphidiopsis raciborskii*.

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado a Coordenação do Curso de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Biologia.

Aprovada em: 05/07/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dra. Ranielle Daiana dos Santos (Coorientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Profa. Dra. Juliana dos Santos Severiano
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Me. Tatiane Medeiro Queiroz
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB

“Não esquecer que por enquanto é tempo de morangos” - Clarice Lispector.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**6**
2	**METODOLOGIA**	**8**
2.1	**Cepa de cianobactéria**	**8**
2.2	**Delineamento Experimental**	**8**
2.3	**Coleta de Dados**	**8**
2.4	**Análise estatística**	**9**
3	**RESULTADOS**	**9**
3.1	**Biomassa e Taxa de Crescimento**.....	**9**
3.2	**Produção e liberação de Saxitoxinas e conteúdo da toxina por cota celular**	**10**
4	**DISCUSSÃO**	**13**
4.1	**Biomassa e Taxa de Crescimento**.....	**13**
4.2	**Produção e liberação de Saxitoxinas e conteúdo da toxina por cota celular**.....	**14**
5	**CONCLUSÃO**	**15**
	REFERÊNCIAS	**15**
	AGRADECIMENTOS	**22**

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE NUTRIENTES E TEMPERATURAS SOBRE O CRESCIMENTO, PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE SAXITOXINAS PELA CIANOBACTÉRIA *Raphidiopsis raciborskii.*

Mateus Santos de Araújo Silva[1]

RESUMO

Raphidiopsis raciborskii é uma espécie de cianobactéria que possui distribuição cosmopolita, que tem seu crescimento favorecido pelo aumento da eutrofização e mudanças climáticas. Esta espécie consegue se adaptar a uma ampla faixa de temperatura e de recursos nutricionais, o que a possibilita formar florações tóxicas altamente nocivas a biota aquática e outros animais. Considerando isto, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento, e variações no conteúdo de toxinas intra e extracelulares, bem como por cota celular, em diferentes níveis de temperaturas e nutrientes, para melhor compreensão dos efeitos sinérgicos destes estressores em cenários futuros. Testamos a seguintes hipóteses: (i) ações sinérgicas de altas temperaturas e nutrientes aumentam a biomassa de *R. raciborskii* e consequentemente, a produção e liberação de STXs; (ii) e sob condições de altas temperaturas e limitação de nutrientes, há uma redução da biomassa da espécie, mas aumento da produção e liberação da toxina como mecanismo de homeostase celular. Foram realizados experimentos submetendo a cepa ITEP-A1 da espécie *R. raciborskii,* a diferentes condições nutricionais (C: controle; P+: Adição de Fosfato; P-: Limitação de Fosfato; N+: Adição de Nitrogênio e N-: Limitação de Nitrogênio) em duas temperaturas (25 e 35 ºC), utilizando de um cruzamento fatorial. Nossos resultados demonstraram que os efeitos sinérgicos do aumento de temperaturas e nutrientes não elevaram os valores da biomassa, produção e liberação de toxinas, o que não corrobora com nossa primeira hipótese proposta. Entretanto, individualmente verificamos que aumento dos nutrientes exerceram papel importante sobre a intensificação da biomassa e conteúdo de STXs de *R. raciborskii*, enquanto a temperatura utilizada mostrou-se desfavorável a espécie. O aumento na temperatura, associado com condições nutricionais de limitação refletiram sobre a redução da biomassa e aumento da síntese da Qstx, porém não afetaram de forma significativa na liberação de toxinas, corroborando parcialmente com nossa hipótese de que previa um aumento na produção e liberação das toxinas nestas condições. Em 25º a espécie obteve um ótimo crescimento e produção de toxinas, principalmente sobre condições de excesso de nutrientes. Esses resultados demonstram que a temperatura tem um papel importante na regulação do crescimento da espécie, principalmente quando associada com a condição nutricional, onde condições de abundância de nutrientes favorecem seu crescimento excessivo e capacidade invasiva, ressaltando a importância do controle duplo de nutrientes (N e P) para a mitigar o crescimento da espécie.

Palavras chaves: eutrofização; mudanças climáticas; algas nocivas; cianotoxinas.

ABSTRACT

Raphidiopsis raciborskii is a species of cyanobacteria that has a cosmopolitan distribution, and its growth is favored by increased eutrophication and climate change. This species can adapt to a wide range of temperatures and nutritional resources, which allows the formation of toxic blooms that are highly harmful to aquatic biota and other animals. Considering this, this work aimed to evaluate growth, and variations in the content of intra and extracellular toxins, as well as by cellular quota, at different levels of temperatures and nutrients, to better understand the

[1]Mateus Santos de Araújo Silva, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB); Departamento de Biologia; Rua Baraúnas, nº 351, Universitário, 58.429-500, Campina Grande, Contato: (83) 99420 -8122; e-mail: mateusjubileu.mj13@gmail.com; CV: http://lattes.cnpq.br/5780769240728641

synergistic effects of these stressors in future scenarios. We tested the following hypotheses: (i) synergistic actions of high temperatures and nutrients increase the biomass of *R. raciborskii* and consequently, the production and release of Saxitoxins (STX); (ii) and under conditions of high temperatures and nutrient limitations, there is a reduction in the species' biomass, but an increase in toxin production and release as a mechanism of cellular homeostasis. Experiments were carried out by subjecting the ITEP-A1 strain of the species *R. raciborskii* to different nutritional conditions (C: control; P+: Phosphate addition; P-: Phosphate limitation; N+: Nitrogen addition and N-: Nitrogen limitation) at two temperatures (25 and 35 ºC), using a factorial index. Our results demonstrated that the synergistic effects of increasing temperatures and nutrients did not increase the values of biomass, production and release of toxins, which does not corroborate our first hypothesis. However, we occasionally found that the increase in nutrients played an important role in increasing the biomass and STXs content of *R. raciborskii*, while the temperature used proved to be unfavorable for the species. The increase in temperature, associated with restricted nutritional conditions, reflected a reduction in biomass and an increase in Qstx synthesis, but did not significantly affect the release of toxins, partially corroborating our hypotheses that predicted an increase in production and release of toxins under these conditions. At 25º, the species achieved excellent growth and toxin production, especially under conditions of excess nutrients. These results demonstrate that temperature plays an important role in regulating the growth of the species, especially when associated with nutritional condition, where conditions of nutrient abundance favor its excessive growth, highlighting the importance of double control of nutrients (N and P) for the mitigate the excessive growth of the species.

Keywords: eutrophication; climate changes; harmful algae; cianotoxins.

1 INTRODUÇÃO

A cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii* (woloszynska) Aguilera *et al*., (2018), possui distribuição abrangente sobre muitos corpos d'águas em todo o globo, devido as suas características adaptativas e alta plasticidade fenotípica, que favorecem seu crescimento excessivo, as florações (Padisák, 1997; Antunes *et al* 2015; Buford *et al.,* 2016). Como diazotrófica facultativa, *R. raciborskii* pode fixar o nitrogênio (N) atmosférico, quando há limitação do nutriente na coluna d'água, possui uma alta afinidade com o fósforo (P), sendo capaz de utilizar e armazenar P oriundo de diferentes fontes (Burford *et al*., 2018). Além disso, está cianobactéria é tolerante a diferentes faixas de luz e temperaturas, o que possibilita sua dominância sobre outras espécies da comunidade fitoplanctônica em diferentes condições ambientais (Willis *et al*., 2018; Marques *et al.,* 2022).

Um consenso claro, é que o aumento nas concentrações de nitrogênio e fósforo favorecem o crescimento da espécie e dos níveis de toxinas (Burford *et al*., 2014; Santos-Silva *et al*., 2022). Entretanto, alterações nas razões estequiométricas desses nutrientes, podem resultar em respostas contrastantes nas cepas desta cianobactéria, isso porque, enquanto alguns estudos relatam a diminuição do crescimento e desenvolvimento da espécie sob limitação de N e/ou P (Barros et al., 2015; Jia et al., 2021; Lei et al., 2021), outros evidenciam que *R. raciborskii* consegue manter seu crescimento mesmo quando ocorre uma diminuição nos níveis destes nutrientes, devido a sua alta plasticidade fenotípica e adaptações mencionadas anteriormente, que permitem tolerar estas condições ambientais (Burford et al., 2018; Lu et al., 2022).

Atrelado ao aumento da eutrofização dos corpos hídricos, vários fatores consequentes das mudanças climáticas direcionam os processos sucessionais e favorecem as florações das cianobactérias, como o aumento dos níveis de temperaturas, concentrações do dióxido de carbono e da salinidade (Paerl e Huisman, 2009). Com base no relatório do "Intergovernmental

Panel on Climate Change" (IPCC), até o final deste século é esperado o aumento da temperatura global, e intensificação dos eventos de tempestades e secas extremas. Frente a estes cenários, estudos buscam investigar relações sinérgicas entre os efeitos de temperaturas e nutrientes sobre o crescimento e produção de toxinas produzidas por esta espécie, a fim de compreender seus mecanismos em cenários futuros (Santos-Silva et al., 2022). Particularmente, a *R. raciborskii* cresce em temperaturas entre 15 e 40ºC, com crescimento ótimo em temperaturas superiores a 24°C (Briand et al., 2004; Lei *et al.*, 2020; Santos-Silva *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2023). Relações de ótimo fisiológico para cianobactérias como *R. raciborskii* são previstas com aumento das temperaturas, por favorecerem as taxas de respiração, crescimento e produção de toxinas em respostas ao aumento da atividade metabólica (Rangel et al., 2016; Antunes et al., 2015). A ação sinergética da elevação dos nutrientes e temperaturas refletem em interações complexas que indicam aumento na biomassa e redução do volume celular de *R. raciborskii*, todavia, efeitos sobre as concentrações de toxinas produzidas por esta espécie permanecem pouco claros, uma vez que, sob aumentos de temperaturas verificou-se reduções nas concentrações de saxitoxinas (STXs) produzidas por esta cianobactéria (Mesquita et al., 2019; Santos-Silva et al., 2022). Essa relação é ainda menos elucidada ao considerar frações do conteúdo intra e extracelular de toxinas em resposta a ação simultânea a estes estressores. Além disso, compreender os efeitos de aumentos de temperatura em diferentes níveis de nutrientes permitem uma compreensão mais abrangente das respostas do crescimento da espécie e suas toxinas, já que, em ambientes tropicais, florações de cianobactérias foram associadas mais fortemente a níveis de eutrofização, e não em função das temperaturas (Bonilla et al., 2023). Em contrapartida, foi verificado que em regiões temperadas, *R. raciborskii* possui um melhor crescimento em temperaturas em 24 ºC, enquanto nas regiões mediterrânea, subtropical e tropical suas florações são perenes em temperaturas acima de 24 ºC, indicando que sua proliferação é intensificada com a temperatura (Recknagel *et al.*, 2019).

Cepas de *R. raciborskii* reportadas na América do Sul são produtoras de STXs, conhecida como a toxina paralisadora de molusco (PSP), uma neurotoxina alcaloide, que possui a capacidade de bloquear os canais de sódio (Na) e potássio (K) podendo resultar em uma paralisia respiratória (Thottumkara e Parsons, 2014; Christensen e Khan, 2020; Vico *et al*., 2020). Estudos com cepas de *R. raciborskii* produtoras de STXs, demonstraram que a produção da toxina esteve associada as altas concentrações de nutrientes (Santos-Silva et al., 2022), mas também sob limitação de P (Vargas et al., 2020). Variações nos níveis da toxina também foram relatadas frente a alterações nas temperaturas, apresentando respostas contrastantes, com das diminuição das concentrações de STXs em temperaturas de 30 e 32 ºC (Mesquita et al., 2019; Santos-Silva et al., 2022), e aumento da toxina observada em 35ºC (Rangel et al., 2016). Outra cianobactéria produtora de STXs, a *Aphanizomenom gracile* Lemmermann, obteve uma maior produção e liberação da toxina em 30 ºC (Cirés et al., 2017). Algumas investigações associaram a produção de toxina independe das condições ambientais, mas, depende diretamente do crescimento da espécie (Stucken et al., 2014; Vico et al., 2016). A produção de STXs por *R. raciborskii* também está associada a variação de fatores ambientais e estresses causados a espécie, em que a produção das toxinas permitem alcançar a homeostase celular (Ongley et al., 2016; Casali et al., 2017; Santos-Silva et al., 2024). Assim, investigações que relatem os efeitos sinérgicos de temperaturas e nutrientes sobre o crescimento de *R. raciborskii*, bem como sobre a produção e liberação de STXs são essenciais para reduzir riscos de exposição da toxina a diversos organismo que possam consumir da água.

Considerando as previsões de aumento de temperaturas e diferentes concentrações de nutrientes sobre a biomassa *R. raciborskii* e produção e liberação de STXs, este estudo objetivou-se avaliar o crescimento, bem como variações nas cotas intra e extracelulares em diferentes níveis de temperaturas e nutrientes, para melhor compreensão dos efeitos sinérgicos destes estressores em cenários futuros. Propomos às hipóteses de que (i) ações sinérgicas de

altas temperaturas e nutrientes aumentam a biomassa de *R. raciborskii* e consequentemente, a produção e liberação de STXs; (ii) e sob condições de altas temperaturas e limitação de nutrientes, há uma redução da biomassa da espécie, mas aumento da produção e liberação da toxina como mecanismo de homeostase celular.

2 METODOLOGIA

2.1 Cepa de cianobactéria

A linhagem de *R. raciborskii* produtora de STXs (ITEP-A1) foi obtida da coleção de culturas da Universidade Federal do Agreste do Pernambuco, foi relatada como produtora de STX, neosaxitoxina e decarbamoil-saxitoxina (De Bock et al., 2020). Esta cepa foi mantida em meio de cultura ASM-1 (pH 8,0), sob condições ambientais controladas, temperatura de 24±1 ºC e intensidade de luz considerada boa para o crescimento desta espécie (100 µmol de fótons m-2 s-1 de irradiância e fotoperíodo 12:12 horas), conforme descritos por estudos a anteriores (Briand et al., 2004; Thomas e Litcheman, 2016).

2.2 Delineamento experimental

Os experimentos foram desenvolvidos em um arranjo fatorial, considerando interações entre temperaturas e nutrientes. Foram delimitados 5 tratamentos de nutrientes; o meio de cultivo ASM1 (Gorham et al 1964), que corresponde ao controle, e meio ASM1 modificado com adição de fosfato (350 µmol de Na2PO3; Passarge, 2006) (P+), nitrato (7 mmol NaNO3; Marinho et al., 2013) (N+), para simular ambientes hipereutróficos, ricos em nitrogênio e fósforo, respectivamente, e tratamentos de limitação de nitrato com 7,8 µmol (N-) e fosfato com 0,05 µmol (-P), simulando condições oligotróficas, limitados por nitrogênio e fósforo (Chia et al., 2018). Foram testados 2 níveis de temperaturas, 25 e 35 °C, que correspondem respectivamente, a temperatura ótima para o crescimento além de ser a média encontrada em ambientes do semiárido tropical, e a temperatura descrita como máxima de crescimento para a espécie (Saker e Grifthis, 2000; Briand et al., 2004).

As culturas foram previamente aclimatadas a cada temperatura testada durante uma semana antes dos experimentos e incubadas em fase de crescimento exponencial, com uma biomassa inicial de 4,0 mg. L^{-1}. Para as culturas que foram inoculadas no meio de limitação de fosfato, houve aclimatação de 5 dias para que o estoque de o nutriente fosse consumido. Os experimentos foram realizados em uma câmara germinadora (modelo SSGF-342L), a fim de garantir condições estéreis e controle de luz e temperaturas. Os experimentos foram realizados em frascos de cultura de células (200 mL). Os experimentos foram incubados durante 10 dias, e em dias alternados amostras de 5 mL foram retiradas para determinação da biomassa da espécie, enquanto as concentrações de intra e extracelulares de STXs foram mensuradas no início e fim dos experimentos.

2.3 Coleta de dados

A biomassa de *R. raciborskii* foi estimada considerando as concentrações de clorofila-a (µg L^{-1}), as quais foram determinadas com o uso fluorômetro modulado por amplitude de pulso PHYTO-PAM e seu software Phyto-Win (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). As taxas de crescimento (µ; dia^{-1}) foram calculadas de acordo com a fórmula de regressão exponencial (Wood et al., 2005):

$$\textit{Taxa de crescimento } (\mu; \textit{day}^{-1}) = (\ln (Nt) - \ln (Nt0)) / (t - t0)$$

Onde, N representa o valor da biomassa no tempo final (t) e no tempo inicial (t0).

A densidade celular de *R. raciborskii* (células mL^{-1}) foi quantificada nos tempos iniciais e finais, usando uma câmara de contagem Brightline Neubauer aprimorada.

Para análise das Saxitoxinas intra e extra celulares, foi seguida as instruções do kit de placas Abraxis (Warminster, Pa.). As amostras foram filtradas em filtros GF/C (0,45 μm) para separar as frações intracelulares e extracelulares. O conteúdo intracelular de STXs foi quantificado a partir das células retidas no filtro, enquanto a fração extracelular foi determinada a partir da água filtrada. As concentrações totais (μg L^{-1}) das cianotoxinas foram determinadas pelo método de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), em que as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento. As concentrações de SXTs intracelular foram utilizadas para calcular as concentrações de toxinas por cota celular (Qsxt), como uma parcela de SXTs por unidade de biovolume (μg mm^3). O cálculo envolveu uma divisão entre a concentração de toxinas (μg L^{-1}), pelo biovolume de células de cada tratamento.

2.4 Análise estatística

Para avaliar os efeitos isolados e interativos entre as temperaturas e nutrientes sob a biomassa, taxas de crescimento específico e concentrações de STXs (intra e extracelular) e Qstx, foram realizadas análises de variância de medidas repetidas, considerado o tempo do experimento foi como um fator fixo. Quando verificadas diferenças significativas nos testes foram realizados o teste a posteriore de Bonferroni para comparação múltipla das médias.

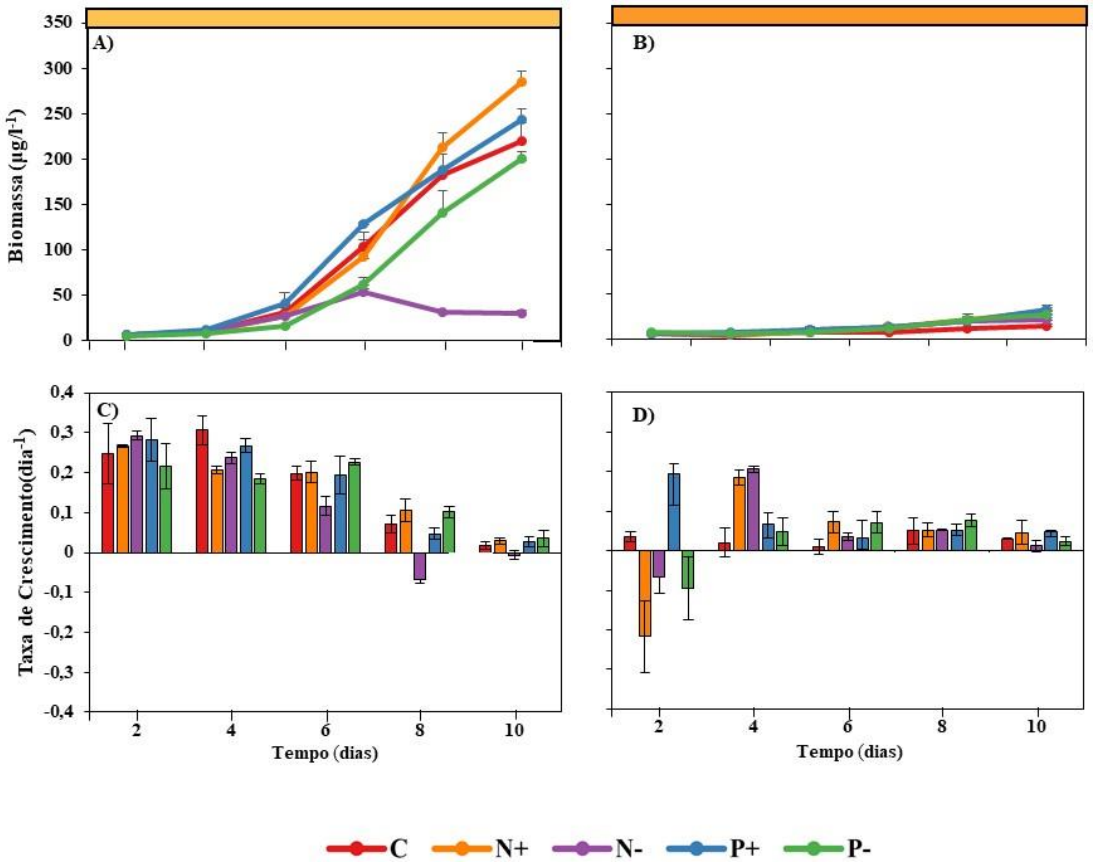
3 RESULTADOS

3.1 Biomassa e Taxa de Crescimento

Nossos resultados da ANOVA de medidas repetidas indicaram que a temperatura e os nutrientes de forma isolada e em ação sinergética afetaram significativamente a biomassa da *R. raciborskii* ($p<0,001$; Tabela 1; Figura 1). A espécie obteve a maior biomassa na temperatura de 25 ºC, no último dia do experimento, nos tratamentos com excesso de N (284,73 μg L^{-1}) e P (243,66 μg L^{-1}), já a menor biomassa observada no 10º dia, ocorreu no tratamento com limitação de N (29,76 μg L^{-1}). No tratamento de limitação de P em 25 ºC, foi possível visualizar que a espécie conseguiu crescer, mesmo diante da escassez do nutriente (199,96 μg L^{-1}) (Figura 1). Em 35 ºC foram registrados baixos valores de biomassa em comparação a 25 ºC, no 10º dia de experimento as maiores ocorreram nos tratamentos de adição de P e N (32,7 μg L^{-1} e 32,3 μg L^{-1}, respectivamente), e a menor biomassa foi observada no tratamento controle (15,4 μg L^{-1}).

As taxas de crescimento foram afetadas significativamente pelas temperaturas, enquanto os nutrientes não exerceram efeitos significativos de forma isolada ou sinergicamente com a temperatura ($p<0,001$; Tabela 1; Figura 1). As maiores taxas foram registradas em 25 ºC, com maior valor registrado no 4º dia e tratamento controle (0,30 dia^{-1}), a partir do dia 8, houve um declino do crescimento em todas as condições nutricionais, com crescimento significativamente menor em limitação de N (-0,006 dia^{-1}) no 10º dia do experimento. Na temperatura de 35 ºC, reduções significativas do crescimento ocorreram ao longo do tempo de incubação. A maior taxa de crescimento foi encontrada no dia 4 de experimentação sobre limitação de N (0,20 dia^{-1}), registrando inibição do crescimento na condição de excesso de N (-0,021 dia^{-1}), no 2º dia de incubação (Figura 1).

Figura 1: Biomassa e Taxa de Crescimento da *R. raciborskii* nas temperaturas de 25ºC e 35° em condições nutricionais (C; controle). Biomassa da espécie em 25 ºC (A), Biomassa da espécie em 35 ºC (B), Taxa de crescimento da espécie em 25ºC (C) e Taxa de crescimento da espécie em 35ºC (D).

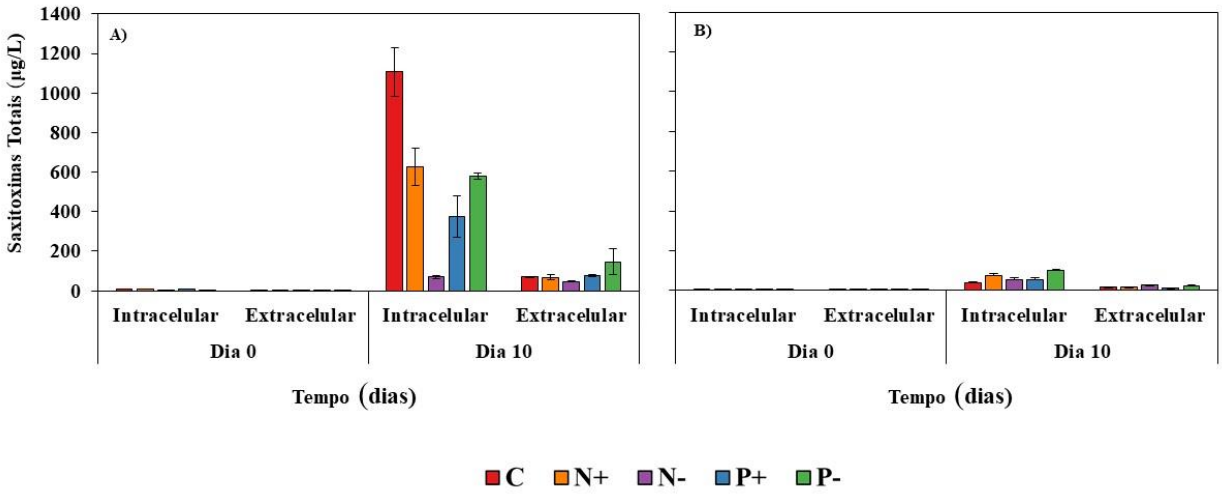


Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

3.2 Produção e liberação de Saxitoxinas e conteúdo da toxina por cota celular

Os efeitos das temperaturas, nutrientes e tempo, tanto de forma isolada, como combinada afetaram significativamente os níveis de toxinas intra e extracelulares, e no conteúdo de toxinas por cota celular ($p<0,001$; Tabela 2; Figura 2). A maior produção de toxinas ocorreu na temperatura de 25 ºC, com concentração mais elevada da fração intracelular registrada no tratamento de controle (1.106 µg L^{-1}) no último dia de experimentação. Concentrações de STXs no fim dos experimentos foram superiores às encontradas no início em todas as condições nutricionais, as concentrações mínimas de 1,09 µg L^{-1}, foram registradas no tratamento de limitação de P no início do experimento (Figura 2). A maior liberação de toxina na temperatura de 25 ºC ocorreu no dia 10, sobre a limitação de P (146,80 µg L^{-1}). Em 35 ºC, a maior produção de toxinas ocorreu no tratamento de limitação de P- (103,09 µg L^{-1}), e a maior liberação das toxinas nesta temperatura também ocorreu nesta condição nutricional (23,51 µg L^{-1}), ambos verificados no dia 10 (Figura 2).

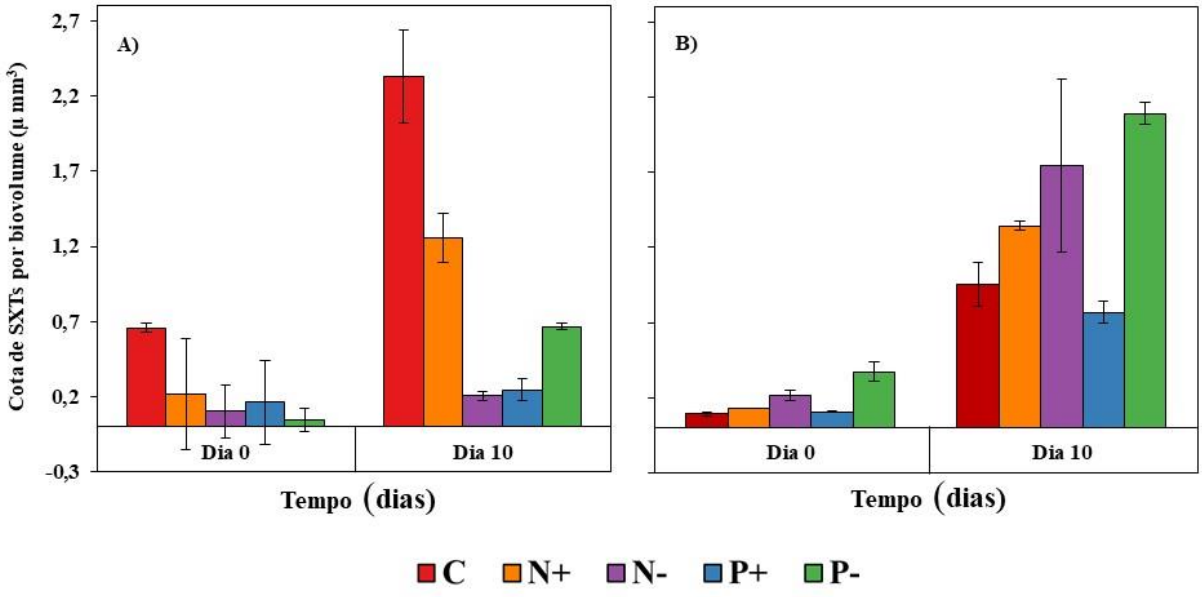
Figura 2: Saxitoxinas da *R. raciborskii* nas temperaturas de 25 e 35 °C nas condições nutricionais (C: controle; P+: Adição de Fosfato; P-: Limitação de Fosfato; N+: Adição de Nitrogênio e N-: Limitação de Nitrogênio). Saxitoxinas da espécie em 25 ºC (A); Saxitoxinas da espécie em 35 ºC (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Os maiores níveis de Qstx ocorreram na temperatura de 25 ºC, no tratamento controle (2,33 µg mm^3) no último dia de incubação. Entretanto, em 35 ºC, apesar de reduções nas concentrações da toxina nas frações intracelulares, observamos aumentos na cota celular, especialmente sob limitação de fósforo no dia 10 (2,09 µg mm^3) e em limitação de nitrogênio (1,74 µg mm^3), sendo estas superiores a concentrações encontradas em altos níveis de nutrientes em ambas as temperaturas testadas (Figura 3).

Figura 3. Cota celular de STX (Qstx) por biovolume da *R. raciborskii* nas temperaturas de 25 e 35 °C sob diferentes condições nutricionais (C: controle; P+: Adição de Fosfato; P-: Limitação de Fosfato; N+: Adição de Nitrogênio e N-: Limitação de Nitrogênio). Cota celular de STX (Qstx) da espécie em 25ºC (A) e Cota celular de STX (Qstx) da espécie em 35ºC (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 1. Resultados da ANOVA de medidas repetidas avaliando as respostas fisiológicas de biomassa, taxa de crescimento, conteúdo de toxinas intra e extracelular e Qstx da cepa ITEP-A1 da espécie *R. raciborskii* pós-exposição a diferentes condições de temperaturas e nutrientes. Df, grau de liberdade; ns, não significativo.

Fatores	**Biomassa**			**Taxa de Crescimento**			**STXs intracelular**			**STXs extracelular**			Qstx		
	df	**F**	**P**	**df**	**F**	**P**	**df**	**F**	**P**	**df**	**F**	**P**	**df**	**F**	**P**
Temperaturas	1	507.33	<0.001	1	96.797	<0.001	1	506.47	<0.001	1	66.497	<0.001	1	14.85	<0.001
Nutrientes	4	24.86	<0.001	4	1.460	ns	4	60.47	<0.001	4	5.188	<0.001	4	21.18	<0.001
Tempo	1	665.64	<0.001	1	54.348	<0.001	1	777.95	<0.001	1	167.047	<0.001	1	359.58	<0.001
Temperaturas:Nutrientes	4	23.96	<0.001	4	1.748	ns	4	62.63	<0.001	4	4. 992	<0.001	4	45.06	<0.001
Temperaturas:Tempo	1	451.25	<0.001	1	87.629	<0.001	1	486.69	<0.001	1	66.510	<0.001	1	24.25	<0.001
Nutrientes:Tempo	4	29.35	<0.001	4	5.205	<0.001	4	59.73	<0.001	4	5.376	<0.001	4	10.58	<0.001
Temperaturas:Nutrientes:Tempo	4	27.38	<0.001	4	1.551	ns	4	61.37	<0.001	4	5.059	<0.001	4	15.10	<0.001

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

4 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que os efeitos sinérgicos do aumento de temperaturas e nutrientes não elevaram os valores da biomassa, produção e liberação de toxinas, o que não corrobora com nossa primeira hipótese proposta. Entretanto, individualmente verificamos que aumento dos nutrientes exerceram papel importante sobre a intensificação da biomassa e conteúdo de STXs de *R. raciborskii*, enquanto a temperatura utilizada mostrou-se desfavorável a espécie. O aumento na temperatura, associado com condições nutricionais de limitação refletiram sobre a redução da biomassa e aumento da síntese da Qstx, porém não afetaram de forma significativa na liberação de toxinas, corroborando parcialmente com nossa hipótese de que previa um aumento na produção e liberação das toxinas nestas condições.

4.1 Biomassa e taxa de crescimento

O aumento de temperaturas vem sendo descrito como um fator essencial para o crescimento e expansão da *R. raciborskii* (Antunes et al., 2015). A redução da biomassa e taxas de crescimento da cianobactéria em 35 ºC mesmo em cenários de excesso de nutrientes, contradiz os achados de Saker e Griffiths, (2000), em que foi observado que a espécie obteve um bom crescimento nesta temperatura. Estes resultados sugerem que o estresse causado pela temperatura foi suficiente para inibir seu crescimento, isso pode estar relacionado com a menor capacidade de resistir a fotoinibição da espécie, em altas temperaturas, podendo afetar diretamente no sucesso da espécie (Várkonyi et al., 2000). Outros estudos mostraram o elevado crescimento da espécie em temperaturas entre 30 e 35 ºC (Soares et al., 2003; Briand et al., 2004; Santos-Silva et al., 2022), reforçando que respostas podem variar de acordo com a cepa estudada, e que sua variabilidade intraespecífica permite sua expansão em diferentes condições ambientais (Willis et al., 2016). O crescimento ótimo de *R. raciborskii* ocorre em uma faixa de temperatura de 24-27ºC (Burford et al., 2016; Galvanesse et al., 2019; Santos-Silva et al., 2022), o que justifica o maior crescimento populacional da espécie na temperatura de 25 ºC, observada em nossos achados. A capacidade de suportar essa faixa (24-27ºC) de temperaturas está atrelada a sua expansão para as regiões temperadas do mundo, que vem sendo intensificada devido ao aquecimento global, gerando problemas para o manejo dos corpos hídricos, principalmente quando associado com o aumento dos nutrientes (Sinha et al., 2012; Recknagel et al., 2019).

Elevadas biomassas nos tratamentos de excesso de N e P observadas neste estudo, corroboram que estes fatores são essenciais para o crescimento de *R. raciborskii* (Burford et al., 2016; Xiao et al., 2020; Santos-Silva et al., 2022). Em contrapartida, observamos que a limitação de P não representou uma barreira para o crescimento da espécie sobre a temperatura de 25 ºC, o que condiz com outros estudos que verificaram crescimento da espécie mesmo sobre limitação deste nutriente (Willis et al. 2019; Galvaneasse et al., 2019). Isso ocorre devido sua capacidade de estocar o fósforo, clivar moléculas orgânicas para sua aquisição e transcrição de genes envolvidos na síntese de proteínas que auxiliam na captação e transporte, o que pode sustentar seu crescimento por mais de 10 dias nesta condição nutricional (Burford et al., 2016; Willis et al., 2015; Willis et al., 2019). Diferentemente, a limitação de N inibiu fortemente o crescimento de *R. raciborskii* em 25 ºC, resultados similares foram encontrados por Willis et al. (2015), em que condições de N limitadas, a espécie apresentou as menores taxas de crescimento. Isso pode ocorrer porque, embora a espécie possua a capacidade fixar o N atmosférico, esse processo é energeticamente dispendioso, e as quantidades N fixados podem serem capazes apenas de manter as atividades metabólicas da célula e não de resultar em crescimento (Burford et al., 2016; Wu et al., 2022). Além disso, a limitação do N também pode afetar a capacidade da espécie de suportar altas temperaturas, o que demonstra que a ação

sinergética do aumento das concentrações deste nutriente e da temperatura influencia significativamente no crescimento da espécie (Thomas e Litchman, 2016). Nossos resultados ressaltam o favorecimento da capacidade invasiva e de formação de florações da *R. raciborskii,* sob altos níveis de eutrofização, sendo assim, é importante considerar o controle duplo de N e P para a construção de planos de manejo eficientes no controle das florações desta espécie (Pearl e Huisman et al., 2009).

4.2 Produção e liberação de Saxitoxinas e conteúdo da toxina por cota celular

As concentrações de toxinas demonstraram estar positivamente associadas com a biomassa, sofrendo grande influência do aumento da temperatura, que resultou na redução da sua produção e liberação. Em 25 ºC, as concentrações de STXs foram favorecidas por elevados níveis de nutrientes, indicando que que condições eutróficas favorecem a produção de toxinas. Em nosso estudo as altas concentrações de STXs estiveram positivamente relacionadas com a biomassa da espécie, o que está de acordo com os achados de Vico et al., 2016, esses resultados atenuam a importância do controle das florações da espécie para reduzir as concentrações de toxinas e riscos de intoxicação. Foi possível verificar que em 35 ºC, mesmo em altas condições nutricionais, a espécie produziu menores concentrações de toxinas, em relação a menor temperatura, demonstrando que a temperatura, influenciou fortemente a produção de toxinas, da mesma forma, estudos como o de Mesquita et al., (2019) demonstram que a produção de toxinas foi menor em temperaturas mais elevadas (30ºC). Estes resultados estão de acordo com a ideia que a temperatura possui grande influência sobre a expressão dos genes responsáveis pela produção da STX, em cianobactérias, embora no estudo de Cirés et al., (2017) tenha sido encontrado a maior expressão dos genes e produção da STX em 30ºC, quando comparado com 23ºC. Nossos resultados demonstram que houve uma menor produção de STX em 35º C, o que pode estar atrelado a expressão dos genes responsáveis pela produção da toxina, porém, não realizamos avaliações a nível de expressão gênica, o que é de grande importância para trabalhos posteriores elucidarem melhor a influência da temperatura e nutrientes sobre a expressão dos genes e produção de STXs em *R. raciborskii*. Por outro lado, em 25 ºC, a maior produção de toxinas na condição nutricional de C, e a menor, com a escassez de N, corroboram com a literatura, que indica que a produção de STX é dependente da razão de N:P, e por ser uma toxina rica em N, quando exposta a limitação sua produção decaí (Van Der Walls et al., 2014). Isso ressalta que o controle desse nutriente é de extrema importância para minimizar os danos causados pelas florações da espécie. Interessantemente, em condições de limitação de P, a espécie obteve alta produção de toxinas, o que pode estar relacionado com as alta afinidade com o nutriente (Burford et al., 2016).

Em nosso estudo, não ocorreu altas taxas de liberação toxinas, independente das temperaturas e condições nutricionais, o que contrapõe o achado por Cirés et al., (2017), em que as maiores taxas de liberação de STX ocorreram sobre as temperaturas mais altas. A liberação de toxinas pode estar associada a condições de estresse e formas de mitigar os danos causados por esses fatores, a fim de manter a homeostase celular (Casali et al., 2017). Estudos indicaram que o aumento da liberação de toxinas pode estar associado com a lise celular (Walls et al., 2018; Holland e Linner, 2013; Vargas et al.,2020), entretanto, em contrastes a estes achados, a baixa taxa de toxina extracelular observadas aqui podem indicar que não houve grande ocorrência de lise celular durante o experimento.

Observamos que maiores Qstx ocorreram na temperatura de 25 ºC no tratamento C, porém, na temperatura mais alta (35ºC) e sob limitação de nutriente, também ocorreram altas Qstx, o que corrobora com a hipótese de que condições de estresse estimulam a produção de STXs. Embora o papel fisiológico das toxinas não seja totalmente definido, estudos demonstram que a maior concentração de toxinas ocorre quando a espécie é submetida a

condições de estresse demonstrando que a STX possui um papel importante na regulação metabólica e de defesa contra estressor (Castro et al. 2004; Pomati et al. 2003; Carneiro et al. 2009; Casali et al. 2017; Vargas et al. 2019).

A ocorrência da maior Qstx em 25ºC e sob a condição nutricional de C, fortalece a hipótese de que o balanço estequiométrico entre os nutrientes é favorável para produção de toxinas, o que torna esses resultados preocupantes diante do aumento da eutrofização nos corpos hídricos, que tende favorecer o crescimento da espécie e sua expansão pelo globo (Zhou et al., 2019; Burford et al., 2018). As altas Qstx em 35 ºC e limitação dos nutrientes, sugere que as reduções na biomassa e aumento das concentrações das toxinas por cota celular podem refletir um mecanismo de homeostase, importante para suportar as tais condições de estresse. A limitação do P esteve associada com a maior Qstx, ocorrem devido a mudança nos regimes nutricionais afetar significativamente na produção de toxinas (Van De Wall et al., 2014; Vargas et al.,2020).

Em síntese, nosso estudo demonstrou que o aumento das temperaturas atuou como um estressor para a espécie, diminuindo seu crescimento, mas, quando em ação sinérgica com a limitação de nutrientes, causou um aumento na Qstx, já em 25 ºC, condições de excesso de nutrientes intensificaram a biomassa e produção de toxinas de *R. raciborskii*. O que ressalta a necessidade do controle duplo de nutriente para mitigar as florações tóxicas dessa cianobactéria. Sugerimos que trabalhos futuros possam avaliar a resposta da espécie frente a esses estressores considerando as respostas ecofisiológicas de diferentes cepas, bem como avaliar a expressão gênica, para melhor compreender os mecanismos pelas populações desta espécie.

5 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo mostraram que *R. raciborskii* teve seu crescimento e produção de toxinas favorecidas em elevados nutrientes, mas inibidos como aumento da temperatura, o que resultou na diminuição das concentrações de STXs, tanto na porção intra quanto extracelular. Em contrapartida, o aumento da temperatura e condições de limitação de nutrientes promoveu um aumento da Qstx, indicando um possível mecanismo para tentar manter a homeostase celular. O nosso estudo contribuiu para a compreensão do comportamento da espécie diante das ações sinergéticas do aumento de temperatura e nutrientes, considerando a alta capacidade da espécie de se adaptar as diversas condições nutricionais e seus mecanismos para contornar o estresse causado pelo aumento da temperatura. Sendo assim, é de extrema importância considerar o controle duplo dos nutrientes (P e N) para a construção de planos de manejo, que sejam eficientes na mitigação das florações da espécie, a fim de diminuir riscos de intoxicação e de degradação dos ecossistemas aquáticos. Todavia, sugerimos que estudos futuros considerem análise da toxicidade da espécie, considerando seu potencial de produzir diversos análogos da STX, além disso, é fundamental compreender a resposta de outras cepas da espécie, considerando a alta variabilidade genética que suas populações possuem, essas análises podem auxiliar na compreensão da resposta da espécie de forma mais ampla.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, A., Gómez, E. B., Kaštovský, J., Echenique, R. O., & Salerno, G. L. (2018). The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). **Phycologia,** *57*(2), 130–146. https://doi.org/10.2216/17-2.1.

ALI, B., Anushka, Mishra, A. Effects of dissolved oxygen concentration on freshwater fish: A review. **Int J Fish Aquat Stud** 2022;10(4):113-127. DOI: https://doi.org/10.22271/fish.2022.v10.i4b.2693.

AMARAL, V., Bonilla, S., & Aubriot, L. (2014). Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. **European Journal of Phycology,** 49(1), 134–141. https://doi.org/10.1080/09670262.2014.897760

ANTUNES JT, Leão PN e Vasconcelos VM (2015) Cylindrospermopsis raciborskii: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. **Front. Microbiol**. 6:473. doi: 10.3389/fmicb.2015.00473.

BARROS, M. U. G.; CARLOTO LOPES, I. K.; LOBO FARIAS, W. R.; CAPELO NETO, J. efeitos da depleção de nutrientes no crescimento e na densidade de células da espécie Cylindrospermopsis Raciborskii. **Revista AIDIS de ingeniería y ciencias ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, *[S. l.]*, v. 8, n. 1, p. 71–83, 2015. Disponível em: https://revistas.unam.mx/index.php/aidis/article/view/48447. Acesso em: 30 may. 2024.

BOCKWOLDT, K.A., Nodine, E.R., Mihuc, T.B., Shambaugh, A.D. and Stockwell, J.D. (2017), Reduced Phytoplankton and Zooplankton Diversity Associated with Increased Cyanobacteria in Lake Champlain, USA. J**ournal of Contemporary Water Research & Education**, 160: 100-118. https://doi.org/10.1111/j.1936-704X.2017.03243.x.

BONILLA, S.; AGUILERA, A.; AUBRIOT, L.; HUSZAR, V.; ALMANZA, V.; HAAKONSSON, S.; IZAGUIRRE, I.; O'FARRELL, I.; SALAZAR, A.; BECKER, V.; CREMELLA, B. Nutrients and not temperature are the key drivers for cyanobacterial biomass in the Americas. **Harmful Algae**, 121, 102367, 2023.

BRIAND, J.F.; LEBOULANGER, C.; HUMBERT, J.F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P. Cilindrospermopsis raciborskii (cyanobacteria) invasion at mid- latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **J. of Phycol**, 40 (2), 231-238, 2004.

BURFORD, M. A., Beardall, J., Willis, A., Orr, P. T., Magalhaes, V. F., Rangel, L. M., … Neilan, B. A. (2016). Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii. **Harmful Algae**, 54, 44–53. doi:10.1016/j.hal.2015.10.012.

BURFORD MA, Davis TW, Orr PT, Sinha R, Willis A, Neilan BA. Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii. **FEMS Microbiol Ecol.** 2014 Jul;89(1):135-48. doi: 10.1111/1574-6941.12341. Epub 2014 May 12. PMID: 24735048.

BURFORD, M.A., DAVIS, T.W. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* . ***Chin. J. Ocean. Limnol.* 29**, 883–891 (2011). https://doi.org/10.1007/s00343-011-0517-5.

BURFORD, M.A., Willis, A., Chuang, A. *et al*. Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii. **J. Ocean. Limnol.** 36, 1032–1039 (2018). https://doi.org/10.1007/s00343-018-7179-5.

CAREY, Cayelan C. *et al*. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. **Water research**, v. 46, n. 5, p. 1394-1407, 2012.

CASALI SP, Dos Santos ACA, de Falco PB, Calijuri MDC. Influence of environmental variables on saxitoxin yields by Cylindrospermopsis raciborskii in a mesotrophic subtropical reservoir. **J Water Health.** 2017 Aug;15(4):509-518. doi: 10.2166/wh.2017.266. PMID: 28771148.

CHIA, M.A.; JANKOWIAK, J.G.; KRAMER, B.J.; GOLESKI, J.A.; HUANG, I.S.; ZIMBA, P.V.; GOBLER, C.J. Succession and toxicity of Microcystis and Anabaena (Dolichospermum) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. **Harmful algae**, 74, 67-77, 2018.

CHONUDOMKUL, D. Yongmanitchai, W. Theeragool, G. Kawachi, M. Kasai, F. Kaya, K. Watanabe, M.M. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan, **FEMS Microbiology Ecology,** Volume 48, Issue 3, June 2004, Pages 345–355, https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.014.

CHORUS, I, WELKER M; eds. 2021. Toxic Cyanobacteria in Water, 2nd edition. **CRC Press, Boca Raton (FL)**, on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

CHRISTENSEN, V. G. KHAN, E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin, **Science of The Total Environment,** Volume 736, 2020, 139515, ISSN 0048-9697, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515.

CIRÉS, S.; Delgado, A.; González-Pleiter, M.; Quesada, A. Temperature Influences the Production and Transport of Saxitoxin and the Expression of *STX* Genes in the Cyanobacterium *Aphanizomenon gracile*. **Toxins** 2017, *9*, 322. https://doi.org/10.3390/toxins9100322.

DE BOCK, M.F.S., Moraes, G.S.d.O., Almeida, R.G.d.S., Vieira, K.D.d.S., Santoro, K.R., Bicudo, Á.J.d.A. and Molica, R.J.R. (2020), Exposure of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings to a Saxitoxin-Producing Strain of *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* (Cyanobacterium) Reduces Growth Performance and Increases Mortality Rate. **Environ Toxicol Chem**, 39: 1409-1420. https://doi.org/10.1002/etc.4728

FIGUEIREDO, D.R., Reboleira, A.S.S.P., Antunes, S.C. *et al.* The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a Portuguese temperate Lake. ***Hydrobiologia*** 568, 145–157 (2006). https://doi.org/10.1007/s10750-006-0196-y.

GALVANESE, E.; PADIAL, A.A.; AUBRIOT, L. Acclimatization to high temperatures increases the ability of *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria) to cope with phosphate deficiency and reveals distinct responses to stress. Eur. **J. Phycol**. 1-10, 2019.

GÉRARD C., Poullain V., Lance E.,, Acou A., Brient L., Carpentier A. , Influence of toxic cyanobacteria on community structure and microcystin accumulation of freshwater molluscs, Environmental Pollution, Volume 157, Issue 2, 2009, Pages 609-617, ISSN 0269-7491, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.017.

GOBLER, C. J. Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective, **Harmful Algae**, Volume 91, 2020, 101731, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101731.

GUZMÁN-GUILLÉN, R., Prieto Ortega, A. I., Moyano, R., Blanco, A., Vasconcelos, V., & Cameán, A. M. (2015). Dietaryl-carnitine prevents histopathological changes in tilapia (Oreochromis Niloticus) exposed to cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, 32(1), 241–254. doi:10.1002/tox.22229.

IPCC, 2023: Sections. In: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 35-115, doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.

JIANG, Y. Chen, Y. Yang, S. Li, R. Phylogenetic relationships and genetic divergence of paralytic shellfish toxin- and cylindrospermopsin- producing Cylindrospermopsis and raphidiopsis, **Harmful Algae**, Volume 93, 2020, 101792, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101792.

LANDSBERG. J. H, Hendrickson, J, Tabuchi, M, Kiryu, Y, Williams, B. J, Tomlinson, M.C. A large-scale sustained fish kill in the St. Johns River, Florida: A complex consequence of cyanobacteria blooms, **Harmful Algae**, Volume 92, 2020, 101771, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101771.

LEI, L., Dai, J., Lin, Q., & Peng, L. (2020). Competitive dominance of Microcystis aeruginosa against *Raphidiopsis raciborskii* is strain- and temperature-dependent. **Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems**, (421), 36. doi:10.1051/kmae/2020023

LEI L, Lei M, Cheng N, Chen Z, Xiao L, Han B-p and Lin Q (2021). Nutrient Regulation of Relative Dominance of Cylindrospermopsin-Producing and Non-cylindrospermopsin Producing *Raphidiopsis raciborskii*. **Front. Microbiol.** 12:793544. doi: 10.3389/fmicb.2021.79354.

LU, Z.; YE, J.; CHEN, Z.; XIAO, L.; LEI, L.; HAN, B.P.; PAERL, H.W. Cyanophycin accumulated under nitrogen-fluctuating and high-nitrogen conditions facilitates the persistent dominance and blooms of Raphidiopsis raciborskii in tropical waters. **Water Res**. 214, 118215, 2022.

MARQUES, L. C. B. Lima, J. E. Pimentel, J. S. M. Giani, A. Heterocyte production, gene expression, and phylogeography in Raphidiopsis (=Cylindrospermopsis) raciborskii, **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 98, Issue 6, June 2022, fiac052, https://doi.org/10.1093/femsec/fiac052.

MASSEY , I. Y. Al osman, M. & Yang, F. (2020): An overview on cyanobacterial blooms and toxins production: their occurrence and influencing factors, Toxin Reviews, DOI: 10.1080/15569543.2020.1843060.

MESQUITA, M.C.; LÜRLING, M.; DORR, F.; PINTO, E.; MARINHO, M.M. Combined efect of light and temperature on the production of saxitoxins in Cylindrospermopsis raciborskii strains. **Toxins,** 11:38, 2019.

NOWICKA-KRAWCZYK, P.; Zelazna-Wieczorek, J.; Skrobek, I.; ˙Ziułkiewicz, M.; Adamski, M.; Kaminski, A.; Zmudzki, P. Persistent ˙Cyanobacteria Blooms in Artificial

Water Bodies—An Effect of Environmental Conditions or the Result of Anthropogenic Change. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 2022, 19, 6990. https://doi.org/10.3390/ ijerph19126990.

PAERL HW, Fulton RS 3rd, Moisander PH, Dyble J. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. **ScientificWorldJournal**. 2001 Apr 4;1:76-113. doi: 10.1100/tsw.2001.16. PMID: 12805693; PMCID: PMC6083932.

PAERL HW, Huisman J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. Environ Microbiol Rep. 2009 Feb;1(1):27-37. doi: 10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x. PMID: 23765717.

PADISAK, J., 1997. Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv. Fuer Hydrobiol**. Suppl. 107, 563–593.

PICHARDO, S.; Cameán, A.M.; Jos, A. *In Vitro* Toxicological Assessment of Cylindrospermopsin: A Review. **Toxins** 2017, *9*, 402. https://doi.org/10.3390/toxins9120402

PLOMINSKY A´ M, Larsson J, Bergman B, Delherbe N, Osses I, *et al*. (2013) Dinitrogen Fixation Is Restricted to the Terminal Heterocysts in the Invasive Cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii CS-505. **PLoS ONE** 8(2): e51682. doi:10.1371/journal.pone.0051682.

RANGEL, L.M., Ger, K.A., Silva, L.H.S. *et al.* Toxicity Overrides Morphology on *Cylindrospermopsis raciborskii* Grazing Resistance to the Calanoid Copepod *Eudiaptomus gracilis* . **Microb Ecol 71**, 835–844 (2016). https://doi.org/10.1007/s00248-016-0734-8

RECKNAGEL, F., Zohary, T., Rücker, J., Orr, P. T., Branco, C. C., & Nixdorf, B. (2019). Causal relationships of Raphidiopsis (formerly Cylindrospermopsis) dynamics with water temperature and N:P-ratios: A meta-analysis across lakes with different climates based on inferential modelling. **Harmful Algae**, 84, 222–232. doi:10.1016/j.hal.2019.04.005.

SAKER, M.L.; GRIFFITHS, D.J. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, 39:349–354, 2019.

SAMARAS, A. Tsoukali, P. Katsika, L. Pavlidis, M. Papadakis, I.E. Chronic impact of exposure to low dissolved oxygen on the physiology of Dicentrarchus labrax and Sparus aurata and its effects on the acute stress response, **Aquaculture**, Volume 562, 2023, 738830, ISSN 0044-8486, https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738830.

SANTOS-SILVA, R.D., Chia, M.A. Barbosa, V.V. Severiano, J.S. Barbosa, J.E.L. Synergistic effects of temperature and nutrients on growth and saxitoxin content of the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*. J **Appl Phycol 34**, 941–952 (2022). https://doi.org/10.1007/s10811-021-02678-8.

SANTOS-SILVA, R.D. Severiano, J.S. Chia, M.A. Queiroz, T.M. Cordeiro-Araújo, M.K. Barbosa, J.E.L. Unveiling the link between *Raphidiopsis raciborskii* blooms and saxitoxin levels: Evaluating water quality in tropical reservoirs, Brazil, **Environmental Pollution,** Volume 344, 2024, 123401, ISSN 0269-7491, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123401.

SHI, J., He, S., Zhao, L. *et al.* Physiological and molecular responses of invasive cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* to ambient phosphorus deficiency. **J. Ocean. Limnol. 40**, 1792–1803 (2022). https://doi.org/10.1007/s00343-022-1314-z.

SIDELEV, S. Koksharova, O. Babanazarova, O. Fastner, J. Chernova, E. Gusev, E. Phylogeographic, toxicological and ecological evidence for the global distribution of *Raphidiopsis raciborskii* and its northernmost presence in Lake Nero, Central Western Russia, **Harmful Algae**, Volume 98, 2020, 101889, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101889.

SMITH, J. L., Tong, M., Fux, E., & Anderson, D. M. (2012). Toxin production, retention, and extracellular release by Dinophysis acuminata during extended stationary phase and culture decline. **Harmful Algae**, 19, 125–132. doi:10.1016/j.hal.2012.06.008

SMUCKER, N. J., Beaulieu, J. J., Nietch, C. T., & Young, J. L. (2021). Increasingly severe cyanobacterial blooms and deep water hypoxia coincide with warming water temperatures in reservoirs. **Global Change Biology**, 27(11), 2507–2519. doi:10.1111/gcb.15618.

SOTERO-MARTINS, A., Carvajal, E. ., Santos, J. A. A. dos, Moura, P. G., Handam, N. B., Kotowski-Filho, N. P., & Jardim, R. (2021). Events linked to Geosmin and 2-methylisoborneol (2-MIB) in a Water Supply Source in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a case study. **In *SciELO Preprints*.** https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.2091.

STUCKEN, K.; John, U.; Cembella, A.; Soto-Liebe, K.; Vásquez, M. Impact of Nitrogen Sources on Gene Expression and Toxin Production in the Diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and Non-Diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. **Toxins** 2014, *6*, 1896-1915. https://doi.org/10.3390/toxins6061896.

TESTAI, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F. M., & Funari, E. (2016). Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. ***Critical Reviews in Toxicology***, *46*(5), 385–419. https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865.

THOMAS, M.K.; LITCHMAN, E. Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. **Hydrobiologia,** 763(1), 357-369, 2016.

THOTTUMKARA, A.P., Parsons, W.H. and Du Bois, J. (2014), Saxitoxin. **Angew. Chem. Int**. Ed., 53: 5760-5784. https://doi.org/10.1002/anie.201308235.

TOPOROWSKA M. e PAWLIK-SKOWROŃSKA B. Four-Year Study on Phytoplankton Biodiversity in a Small Hypertrophic Lake Affected by Water Blooms of Toxigenic Cyanobacteria. **Polish Journal of Environmental Studie**s. 2014;23(2):491-499.

VAN DE WAAL DB, Smith VH, Declerck SA, Stam EC, Elser JJ. Stoichiometric regulation of phytoplankton toxins. Ecol Lett. 2014 Jun;17(6):736-42. doi: 10.1111/ele.12280. Epub 2014 Apr 8. Erratum in: Ecol Lett. 2015 Sep;18(9):983-4. doi: 10.1111/ele.12472. PMID: 24712512.

VARGAS, S.R., dos Santos, P.V., Bottino, F. *et al.* Effect of nutrient concentration on growth and saxitoxin production of *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanophyta) interacting with *Monoraphidium contortum* (Chlorophyceae). *J* **Appl Phycol 32**, 421–430 (2020). https://doi.org/10.1007/s10811-019-01972-w

VICO, P., Aubriot, L., Martigani, F., Rigamonti, N., Bonilla, S., & Piccini, C. (2016). Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii.* **Harmful Algae**, 56, 37–43. doi:10.1016/j.hal.2016.04.008

VICO, P. Bonilla, S. Cremella, B. Aubriot, L. Iriarte, A. Piccini, C. Biogeography of the cyanobacterium Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Volume 148, 2020, 106824, ISSN 1055-7903, https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106824.

WANG, S. Zhang, X. Chen, N. Tian, L. Zhang, Y. Nam, W. A systematic review and quantitative meta-analysis of the relationships between driving forces and cyanobacterial blooms at global scale, Environmental Research,Volume 216, Part 3, 2023, 114670, ISSN 0013-9351, https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114670.

WESTRICK, J.A., Szlag, D.C., SOUTHWELL, B.J. *et al.* A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Anal Bioanal Chem* **397**, 1705–1714 (2010). https://doi.org/10.1007/s00216-010-3709-5

WILLIS, A. Adams, M.P. Chuang, A.W. Orr, P.T. O'Brien, K.R. Burford, M.A. Constitutive toxin production under various nitrogen and phosphorus regimes of three ecotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* ((Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju), **Harmful Algae**, Volume 47, 2015, Pages 27-34, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.05.011.

WILLIS, A. Chuang, A.W. Woodhouse, J.N. Neilan, B.A., Burford, M.A. Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, **Toxicon**, Volume 119, 2016, Pages 307-310, ISSN 0041-0101, https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.005.

WU, Z., Yang, S. & Shi, J. Overview of the distribution and adaptation of a bloom-forming cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii:* integrating genomics, toxicity, and ecophysiology. J. **Ocean. Limnol**. 40, 1774–1791 (2022). https://doi.org/10.1007/s00343-022-2003-7.

XIAO, M. Willis, A. Burford, M.A. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity, **Harmful Algae**, Volume 62, 2017, Pages 84-93, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.12.008.

YANG, Y. Yu, G. Chen, Y. Jia, N. Li, R. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin, Journal of Hazardous Materials, Volume 406, 2021, 124653, ISSN 0304-3894, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124653.

ZHENG, B. He, S. Zhao, L. Li, J. Du, Y. Li, Y, Shi, J. Wu, Z. Does temperature favour the spread of *Raphidiopsis raciborskii*, an invasive bloom-forming cyanobacterium, by altering cellular trade-offs?, Harmful Algae, Volume 124, 2023, 102406, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102406.

ZHANG, Z., Fan, X., Peijnenburg, W. J. G. M., Zhang, M., Sun, L., Zhai, Y., … Qian, H. (2021). Alteration of dominant cyanobacteria in different bloom periods caused by abiotic factors and species interactions. **Journal of Environmental Sciences**, 99, 1–9. doi: 10.1016/j.jes.2020.06.001.

ZHANG, J., Shi, K., Paerl, H., Rühland, K., Yuan, Y., Wang, R., Chen, J., Ge, M., Zheng, L., Zhang, Z., Qin, B., Liu, L., Smol, J. Ancient DNA reveals potentially toxic cyanobacteria

increasing with climate change, **Water Research**, Volume 229, 2023, 119435, ISSN 0043-1354, https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119435.

ZHOU, Y. L. Wang, Y. Zhou, et al., Eutrophication control strategies for highly anthropogenic influenced coastal waters, **Science of the Total Environment** (2019), https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135760.

ZUO, J. Xiao, P. Heino, J. Tan, F. Soininen, J. Chen, H. Yang, J. Eutrophication increases the similarity of cyanobacterial community features in lakes and reservoirs, **Water Research,** Volume 250, 2024, 120977, ISSN 0043-1354, https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120977.

AGRADECIMENTOS

Desde muito novo fui impressionado pela grandeza da vida e suas diversas formas, por muitos anos não entendia onde canalizar esse amor pela vida, e só com o passar do tempo e amadurecimento, percebi que a vida era o que mais me cabia, o que eu queria estudar para sempre, assim entrei no curso de biologia, apaixonado pela vida e com muita vontade de descobrir mais sobre ela. Quem diria que este ciclo está tão perto de se encerrar, quem diria que tanta coisa aconteceria neste percurso.

É impossível falar deste percurso e não citar a pessoa que mais me motiva, o amor da minha vida! Agradeço a minha mãe, Patrícia Santos, por ser dedicada e afetuosa, pelos seus sacrifícios por ter sido mãe tão jovem, por compreender meus momentos e me incentivar a fazer o que verdadeiramente amo, nenhuma palavra jamais será capaz de descrever o quanto te amo!

As minhas avós, Maria de Fátima e Lúcia Maria, mulheres que me ensinaram tanto sobre a vida, sempre com um sorriso no rosto e boas conversas, aprendi com elas que o amor não é só falado, mas se manifesta em forma de um almoço de sábado ou um cafezinho com bolo de milho, muitos dos meus momentos favoritos da vida aconteceram em dias "ordinários", repletos de amor.

Aos meus pais e avô José Helenilson, Aldalécio Vital e Pedro Batista, pelo apoio de sempre.

Aos meus irmãos e cunhada, Pedro, Camila e Sarah e Maria Helena, por todo apoio e compreensão durante esta caminhada, eu os amo.

Aos meus sobrinhos, Noah e Zyan, antes deles minha vida era feliz, mas após a chegada deles o amor se mostrou de uma forma nunca imaginada, nos momentos cansativos, momentos com eles mudaram completamente meu humor.

Á minha gata de estimação Maggie, que embora não compreenda essas palavras, seu amor e afeto fazem grande diferença em minha vida.

Agradeço aos meus amigos, pelo afeto e muito mais por respeitar minha ausência em muitos momentos.

Á minha grande amiga Mércia, nossas conversas, caminhadas e idas pra academia me salvaram em muitos momentos, gratidão por todo afeto que compartilhamos nessa longa caminhada, eu te amo!

Ao meu amigo Jefferson, que em tempos difíceis esteve presente e fez grande diferença, sua amizade é de grande importância pra mim, te amo!

As minhas amigas que foram fruto da universidade, Alice Silva, Jeniffer Medeiros e Eduarda Cardoso, eu esperava muitas coisas do percurso da universidade, mas encontrar o amor em grupo formado por 4 pessoa tão diferentes não era uma delas, porém, posso afirmar que certamente essa foi uma das melhores surpresas da vida, o amor de vocês foi essencial em toda essa caminhada, não existe Jubileu em biologia sem vocês, e que bom!

Aos meus amigos e amigas que conheci no ônibus, rimos e brincamos muito no caminho, e esses momentos foram importantes para aliviar a tensão de alguns momentos, assim como os momentos de reflexões e choro tiveram sua grande importância, agradeço a todos vocês pelo carinho e amor. Principalmente Manuella Ribeiro e Maria Amália, por me ouvirem em tantos momentos necessários.

Ao meu orientador Etham Barbosa. agradeço pela oportunidade de participar do Laboratório de Ecologia Aquática (Leaq), e por todos os ensinamentos, sem a oportunidade que você me deu, minha caminhada na universidade não seria tão marcante!

Á minha coorientadora, Dra Ranielle Daiana, que me ensinou tanto durante esses anos, seu impacto na minha formação acadêmica é imensurável, obrigado por todos os conselhos, conversas e reuniões!

Á professora Juliana Severiano, agradeço também pela oportunidade estar no Leaq e por acreditar no meu potencial, você é uma grande inspiração.

Á todos do Leaq, por todo suporte técnico, científico e ajuda nos experimentos, além dos momentos de conversas e diversão. Principalmente a Aline Nery e Tatiane Medeiros, por todas as conversas, conselhos e risadas, vocês foram muito importantes na minha caminhada.

Agradeço a UEPB, por promover uma educação pública, gratuita e de qualidade, se comprometendo coma formação de milhares de jovens, impactando a vida de milhares paraibanos. Viva a educação pública!

Aos meus professores da graduação em geral, que contribuíram de forma significativa para a minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa durante a execução do projeto.

Ao projeto Rio Paraíba Integrado (FAPESQ/PELD/ 23/2020), pela oportunidade de atuar em campo e por todo apoio.