



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALINE MARIA BEZERRA NERY

**RESPOSTAS DE CEPAS DA CIANOBACTÉRIA *Raphidiopsis raciborskii* A
DIFERENTES NÍVEIS DE NUTRIENTES REFLETEM PLASTICIDADE
FENOTÍPICA?**

**CAMPINA GRANDE, PB
2023**

ALINE MARIA BEZERRA NERY

**RESPOSTAS DE CEPAS DA CIANOBACTÉRIA *Raphidiopsis raciborskii* A
DIFERENTES NÍVEIS DE NUTRIENTES REFLETEM PLASTICIDADE
FENOTÍPICA?**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do
título de graduada em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ecologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Juliana dos Santos Severiano

Coorientadora: Me. Ranielle Daiana dos Santos Silva

**CAMPINA GRANDE, PB
2023**

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.

N456r Nery, Aline Maria Bezerra.

Respostas de cepas da cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii* diferentes níveis de nutrientes refletem plasticidade fenotípica? [manuscrito] / Aline Maria Bezerra Nery. - 2023.
29 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Profa. Dra. Juliana dos Santos Severiano, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS. "

"Coorientação: Profa. Ma. Ranielle Daiana dos Santos Silva , Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."

1. Cianobactérias nocivas. 2. Eutrofização. 3. Saxitoxina.
4. Cilindrospermopsina. I. Título

21. ed. CDD 570

ALINE MARIA BEZERRA NERY

RESPOSTAS DE CEPAS DA CIANOACTÉRIA *RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII* A
DIFERENTES NÍVEIS DE NUTRIENTES REFLETEM PLASTICIDADE FENOTÍPICA?

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do
título de graduada em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ecologia.

Aprovada em: 27/10/2023

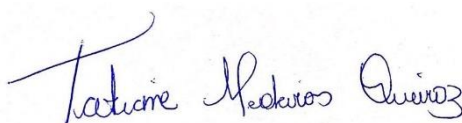
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Juliana dos Santos Severiano (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



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



Me. Tatiane Medeiros Queiroz
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr. Juliana dos Santos Severiano, pela paciência, carinho, dedicação, apoio e confiança.

À minha co-orientadora Me. Ranielle Daiana dos Santos Silva, pelo carinho, dedicação, confiança, paciência. Obrigada por todos os ensinamentos passados de forma paciente e pelos perrengues tratados sempre com humor.

Ao meu professor Dr. José Etham de Lucena Barbosa, pela confiança e apoio. Obrigada por me aceitar em seu laboratório e fazer eu me envolver mais na pesquisa e em vários projetos.

Aos meus pais Irlane e Alexandre, a meu irmão Alysson, pela compreensão, por minha ausência nas reuniões familiares. A minha mãe por ser a minha inspiração na licenciatura desde criança, que me educou e sonha com este dia.

A minha avó, Maria Nazareth (in memoriam), embora fisicamente ausente, minha outra inspiração, que sempre senti sua presença ao meu lado, dando-me força.

A todos do LEAq pelo acolhimento, amizade, brincadeiras e dedicação.

Aos meus amigos pelos momentos de amizade, apoio e carinho.

RESUMO

Florações de *Raphidiopsis raciborskii* têm intensificado devido ao aumento de eutrofização dos corpos aquáticos e mudanças climáticas. Contudo, a grande expansão e sucesso dessa espécie também vem sendo associada à sua plasticidade fenotípica. Assim compreender variações intraespecíficas de *R. raciborskii* em diferentes condições e níveis nutricionais é necessário, pois auxilia no entendimento da ecologia da espécie, e como esses fatores que favorecem sua expansão. Temos como objetivo avaliar a variação intraespecífica de cepas da cianobactéria *R. raciborskii* produtoras de saxitoxina e cilindrospermopsina em diferentes condições e níveis nutricionais. As hipóteses testadas foram: (i) o aumento de nutrientes, promoverá aumento nas repostas fisiológicas em ambas as cepas de *R. raciborskii*, (ii) variações intraespecíficas as mudanças nutricionais refletem a plasticidade fenotípica da espécie, em que a cepa produtora de saxitoxina (SXT) apresentará melhores respostas fisiológicas do que a cepa produtora de cilindrospermopsina (CYN) em condições de altas e baixas concentrações de nutrientes. As cepas foram expostas a cinco condições nutricionais, de alto nitrogênio (N+) e fósforo (P+) e baixo nitrogênio (N-) e fósforo (P-), tendo o meio ASM-1 sem modificações como condição controle (C), na temperatura de 25 °C, considerada ótima para o crescimento da espécie. Para verificar diferenças significativas nas concentrações de clorofila-a, taxas de crescimento, atividade fotossintética (Fv/Fm) e densidade de heterócitos, das cepas em diferentes condições de nutrientes foram realizadas Análises de variância de dois fatores (ANOVA axb). Nossos resultados mostraram variações intraespecíficas entre as cepas nos diferentes níveis de nutrientes, onde a cepa produtora de saxitoxina apresentou um maior destaque em sua taxa de crescimento, biomassa e taxa fotossintética, em N+, P+ e P-, em relação a cepa produtora de cilindrospermopsina, e a densidade de heterócitos não foram observadas diferenças significativas em ambas as cepas. Observados altas biomassas nas condições enriquecidas de nitrogênio, fósforo, e limitação de fósforo garante o sucesso da espécie, contudo foram observadas limitações em baixas concentrações de N+. Além disso, o resultado da limitação de fósforo não afetou o crescimento das cepas, indicando uma dificuldade no controle da espécie, sendo necessário o controle duplo de nutrientes para mitigar as florações de *R. raciborskii*.

Palavras-Chave: cianobactérias nocivas; eutrofização; saxitoxina; cilindrospermopsina; nitrogênio; fósforo.

ABSTRACT

Blooms of *Raphidiopsis raciborskii* have intensified due to increased eutrophication of aquatic bodies and climate change. However, the great expansion and success of this species has also been associated with its phenotypic plasticity. Therefore, understanding intraspecific variations of *R. raciborskii* in different conditions and nutritional levels is necessary, as it helps to understand the ecology of the species, and how these factors favor its expansion. We aim to evaluate the intraspecific variation of strains of the cyanobacterium *R. raciborskii* that produce saxitoxin and cylindrospermopsin under different conditions and nutritional levels. The hypotheses tested were: (i) the increase in nutrients will promote an increase in physiological responses in both strains of *R. raciborskii*, (ii) intraspecific variations, nutritional changes reflect the phenotypic plasticity of the species, in which the saxitoxin-producing strain (SXT) will present better physiological responses than the cylindrospermopsin (CYN) producing strain under conditions of high and low nutrient concentrations. The strains were exposed to five nutritional conditions, high nitrogen (N⁺) and phosphorus (P⁺) and low nitrogen (N⁻) and phosphorus (P⁻), with the ASM-1 medium without modifications as control condition (C), in temperature of 25 °C, considered optimal for the growth of the species. To verify significant differences in chlorophyll-a concentrations, growth rates, photosynthetic activity (Fv/Fm) and heterocyte density of strains in different nutrient conditions, two-way analysis of variance (ANOVA axb) was performed. Our results showed intraspecific variations between strains at different nutrient levels, where the saxitoxin-producing strain presented a greater emphasis on its growth rate, biomass and photosynthetic rate, in N⁺, P⁺ and P⁻, in relation to the cylindrospermopsin-producing strain. , and heterocyte density, no significant differences were observed in both strains. High biomasses were observed in conditions enriched with nitrogen, phosphorus, and phosphorus limitation guarantees the success of the species, however limitations were observed in low concentrations of N⁺. Furthermore, the result of phosphorus limitation did not affect the growth of the strains, indicating a difficulty in controlling the species, requiring double nutrient control to mitigate *R. raciborskii* blooms.

Keywords: harmful cyanobacteria; eutrophication; saxitoxin; cylindrospermopsin; nitrogen; phosphor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema do delineamento experimental. Sendo concentrações de nitrato alto (N+) e baixo (N-); alto (P+) e baixo (P-) fosfato e controle (ASM-1). 17
- Figura 2 – Concentrações de clorofila-a das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01) na temperatura de 25 °C, sob concentrações de nitrato alto (N+) e baixo (N-); alto (P+) e baixo (P-) fosfato e controle (ASM-1). A) ITEP-A1 e B) CIAR..... 19
- Figura 3 – Taxas de eficiência fotossintética máxima (Fv/Fm) das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob concentrações de nitrato alto (N+) e baixo (N-); alto (P+) e baixo (P-) fosfato e controle (ASM-1). A) ITEP-A1 e B) CIAR-01..... 21
- Figura 4 – Taxas de crescimento específico (dia⁻¹) das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob altas concentrações de nitrato (N+), fosfato (P+) e baixas concentrações (N-) e (P-). A) ITEP-A1 e B) CIAR-01..... 22
- Figura 5 – Representação de densidade de heterócitos das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob altas concentrações de nitrato (N+), fosfato (P+) e baixas concentrações (N-) e (P-). A) ITEP-A1 e B) CIAR-01..... 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da ANOVA axb para as variáveis de resposta das cepas (ITEP-A1 e CIAR-01) de <i>R. raciborskii</i> pós-exposição a diferentes condições de nutrientes. Df, grau de liberdade; ns, não significativo.....	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ITEP	Instituto de Tecnologia do Pernambuco
SXT	Saxitoxina
CYN	Cilindrospermopsina
N	Nitrogênio
P	Fósforo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	<i>Origem, distribuição e características ecofisiológicas de Raphidiopsis raciborskii</i>	13
2.1.1	<i>Toxinas</i>	14
3	METODOLOGIA	16
3.1	<i>Cepas das cianobactérias</i>	16
3.2	<i>Delineamento experimental</i>	16
3.3	<i>Análise de dados</i>	17
3.4	<i>Análise estatística</i>	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
5	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

O enriquecimento de nutrientes como o nitrogênio (N) e fósforo (P) em ecossistemas aquáticos provenientes do crescimento da urbanização, intensificação das práticas agrícolas e industriais, têm acelerado o processo de eutrofização (WURSTBAUGH et al., 2019). Essas mudanças nas concentrações de nutrientes alteram os ciclos biogeoquímicos dos nutrientes e desequilibram a sua estequiometria nos ecossistemas aquáticos (VAN DE WALL et al., 2014). Além disso, há o favorecimento da dominância de cianobactérias sobre outras espécies do fitoplâncton (DERVAUX et al., 2015). As cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas, as quais acarretam inúmeros problemas de saúde aos seres humanos (FUNARI et al., 2008), podendo levar a morte a depender das concentrações e forma de exposição (CARMICHAEL et al., 2001),

A grande influência dos nutrientes sobre as florações das cianobactérias ocorre por esses nutrientes serem fundamentais na formação de biomoléculas, síntese de proteínas, enzimas e formação do DNA e RNA (CONLEY et al., 2009). Recentemente, estudos também indicaram que condições elevadas de N e ou P, promoveram florações de cianobactéria mais tóxicas (YANG et al., 2016), devido essas toxinas serem biossintetizadas por agrupamentos de genes relacionados na regulação desses nutrientes (PRESO et al., 2014; YANG et al., 2016). Suas florações também afetam a diminuição na qualidade da água, reduzindo o oxigênio dissolvido, aumentando o pH, causando a diminuição da transparência da água, e promovendo alterações no sabor e odor da mesma (YANG, et al., 2016; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; AI et al., 2020; AMORIM e MOURA, 2020).

Entre as espécies de cianobactérias formadoras de florações, *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynka) Aguilera et al., é uma diazotrófica filamentosa amplamente difundida em corpos hídricos de água doce (WILLIS et al., 2015). Foi proposto que sua origem se deu em lagos africanos, com disseminação posteriormente para a Indonésia e a América Central (Padisák, 1997). Discussões apontam que o grande sucesso dessa espécie está associado as suas características ecofisiológicas que a permite tolerar diferentes condições ambientais, que a possibilita formar florações desde regiões tropicais até as de clima temperado (RAMOS et al., 2021). Entre essas características se incluem: a capacidade de produzir heterócitos, para a fixação de nitrogênio atmosférico, sob condições limitantes (HASELKORN et al., 2007); presença de acinetos (células de resistência para condições estressantes) (PADISÁK et al., 1997), que surgem através do espessamento da parede celular para o armazenamento de nutrientes (GARG et al, 2021); possui a capacidade de estocar P; e presença de vesículas de gás

que auxiliam na fluatibilidade na coluna d'água (SILVA et al., 2020). Apresentando uma alta plasticidade fenotípica, a espécie tolera uma ampla variedade de temperaturas (Z. WANG et al., 2021), intensidades de luz (MESQUITA et al., 2019) e salinidade (PADEE et al., 2015). De fato, muitos fatores conduzem o sucesso dessa espécie, e suas respostas a gradientes nutricionais revelam mecanismos importantes para o controle de suas florações (CHORUS et al., 2021). No entanto mecanismos fisiológicos que a permite dominar sobre outras espécies a diferentes níveis de nutrientes precisam ser melhor explorado para compreensão da sua adaptabilidade ecofisiológica que lhe confere a capacidade de formar florações em uma ampla variedade de ambientes.

Raphidiopsis raciborskii foi relatada como produtora das cianotoxinas saxitoxina (STX) e cilindrospermopsina (CYN). A CYN, alcalóide tricíclico, é uma hepatoxina, que atua bloqueando a síntese protéica, causando insuficiência hepática e renal, também nos tecidos intestinal, sistema vascular e muscular (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2012). Já as SXT, são classificadas como neurotoxinas, inibindo a condução elétrica das células, por bloquear os canais de sódio das mesmas (THOTTUMKARA et al., 2014). Essas toxinas podem levar a morte de animais domésticos, selvagens e seres humanos (GRIFFITHS et al., 2003; BRIAND et al., 2008; MEREL et al., 2013; CODD et al., 1999; BURATTI et al.; HUANG; ZIMBA et al., 2019), mas também atuam como substâncias aleloquímicas, que podem inibir e/ou estimular o crescimento de espécies concorrentes, sendo uma resistência química que pode gerar implicações ecológicas nos ecossistemas (Z. WANG et al., 2021). Até a presente data, foi observado que a SXT é encontrada em cepas da América do Sul, enquanto de CYN em cepas australianas. Cepas norte-americanas ainda estão sendo investigadas quanto a produção de CYN, enquanto as cepas europeias têm capacidade de produzir neurotoxinas diferentes, ainda não descritas (MESQUITA et al., 2019)

Respostas a condições ambientais podem ser diferentes entre as espécies, como observado no estudo de Xião et al., (2017), onde foram vistos em condições de luz e temperatura foi verificado maior variabilidade intraespecífica do que interespecíficas em cepas de *R. raciborskii*. Ainda outros estudos mostraram que a variação nas proporções de N e P, podem promover a dominância de cepas tóxicas sobre as não tóxicas (BURFORD et al., 2014), sendo os efeitos dessas perturbações importantes para alterações no processo de sucessão das cepas de *R. raciborskii* (WILLIS et al., 2019), embora tais mecanismos ainda não estão completamente compreendidos. Frente a diferentes mecanismos adaptativos da espécie *R. raciborskii*, entender suas respostas a gradientes nutricionais pode fornecer informações importantes sobre a ecologia e toxicidade da espécie, o que é extremamente importante para

compreensão da expansão desta espécie, que representa é um perigo crescente para o ecossistema e saúde mundial (RAMOS et al., 2021). Até então, não foram feitos estudos que demonstre a comparação entre cepas produtora de saxitoxina e cepas produtora de cilindropermopsina.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a variação intraespecífica de cepas da cianobactéria *R. raciborskii* produtoras das cianotoxinas saxitoxina e cilindropermopsina em diferentes condições e níveis nutricionais. Nossas hipóteses são: (i) o aumento de nutrientes, promoverá aumento nas repostas fisiológicas (biomassa, eficiência fotossintética e taxa de crescimento) em ambas as cepas de *R. raciborskii*, no entanto, (ii) variações intraespecíficas as mudanças nutricionais refletem a plasticidade fenotípica da espécie, em que a cepa produtora de SXT apresentará melhores respostas fisiológicas (biomassa, eficiência fotossintética, taxa de crescimento e densidade de heterócitos) do que a cepa produtora de CYN em condições de altas e baixas concentrações de nutrientes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Ecossistemas aquáticos de todo o mundo vem sendo expostos a uma grande carga de nutrientes, induzida por atividades antropogênicas consequentes do crescimento populacional, industrial e agropecuário (HOWARTH et al., 2002). Este aumento nas concentrações de nutrientes ocasiona o processo de eutrofização, cuja palavra vem de origem grega *eu*, “bem” e *trophein* de “nutrir”, ou seja, rico em nutrientes (SMITH et al., 2009). Uma das consequências de tal processo é o crescimento exacerbado de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas, e isso ocorre porque nutrientes essenciais como nitrogênio (N) e fósforo (P), são necessários para a síntese de proteínas e P utilizado para a transferência de energia, formação do DNA e RNA, sendo, portanto, importantes para o crescimento populacional (CONLEY et al., 2009).

Entre as consequências associadas as florações de cianobactérias estão o aumento de turbidez da água que suprime o crescimento das macrófitas aquáticas, a depleção de oxigênio através da degradação microbiana, que induz a hipóxia e anóxia, levando a morte de peixes e invertebrados bentônicos (HUISMAN et al., 2018). Como também, produzem compostos no qual modifica sabor e odor da água, diminuindo sua utilidade em atividades recreativas como também, o uso de reservatórios para se ter água potável (PAERL et al., 2013)

2.1 Origem, distribuição e características ecofisiológicas de *Raphidiopsis raciborskii*

Raphidiopsis raciborskii é uma cianobactéria filamentosa inicialmente descrita por Woloszynka nos anos de 1899-1900, em lagos africanos onde dispersou para a Indonésia e América Central (PADISÁK, 1997). Posteriormente, irradiou para a Austrália, por meio do Oceano Pacífico para a América de Norte e do Sul, continuando para Ásia Central e Europa (VICO et al., 2020). Sua distribuição e capacidade de invasão está associada a alta plasticidade fenotípica, que é uma mudança de um fenótipo expresso por um genótipo em função das mudanças ambientais (WHITMAN, 2009), a permite a tolerar a uma grande variedade de ambientes, estando presente em climas tropicais até regiões temperadas (RAMOS et al., 2021). Cepas de *R. raciborskii* foram descritas como tolerantes a baixa e alta intensidade de luz, e uma alta gama de temperaturas 10°C a 37°C (BONILLA et al, 2012). Além disso, fatores relacionados ao aquecimento global, como elevação das temperaturas, mudanças nas precipitações, maiores períodos de seca e aumento de carga de nutrientes podem favorecer sua proliferação (HAAKONSSON et al., 2017). A espécie apresenta células especializadas como

os acinetos, que em condições estressante, se originando de uma célula vegetativa se espessa a parede celular, basicamente funciona como armazenamento de nutrientes em condições estressantes (PADISÁK, 1997). Esta cianobactéria também é capaz de fixar nitrogênio atmosférico em baixas condições deste nutriente, através de uma célula adaptativa chamada heterócito, mas para que esse processo ocorra é necessária uma condição anaeróbica, onde a nitrogenase, complexo enzimático que permite a fixação de nitrogênio ocorre sem o contato com o oxigênio que está sendo assimilado nas demais células vegetativas (HERRERO et al., 2001). Por fim, *R. raciborskii* também apresentam vesículas de gás que ajudam na regulação de sua flutuabilidade auxiliando na aquisição de nutrientes no fundo do ecossistema e absorção de luz na superfície da coluna d'água (CAREY et al., 2011).

2.1.1 Toxinas

Outra característica associada a dominância de *R. raciborskii* nos ecossistemas é a capacidade de produzir cianotoxinas sendo, as saxitoxina (STXs) e cilindrospermopsina (CYN), as quais podem atuar como compostos alelopáticos inibindo o crescimento de espécies concorrentes (BURFORD et al, 2016). A SXT é uma neurotoxina conhecida por paralisar moluscos (PSP), produzidas por cepas da espécie em regiões da América do Sul (BURFORD et al, 2016), e atuam como um agente paralítico que inibe a condução elétrica nos canais de sódio (THOTTUMKARA et al., 2014) e podem acarretar na morte de animais e seres humanos (MESQUITA et al., 2019). A CYN, é um alcalóide, hepatóxico, produzidas por cepas na Oceania, Ásia e Europa (VICO et al., 2020), efeitos de intoxicação por esta cianotoxina foram descritos além do fígado, nos rins, pulmões, coração e timo (MESSINEO et al., 2008).

A intoxicação paralítica por marisco (PSP), ocorre pela ingestão de frutos do mar contaminados, sendo uma doença grave por afetar o sistema neurovegetativo humano e paralisar os músculos podendo levar a morte (PENNA et al., 2015), ainda não houve casos de mortes. Pedrosa et al. (2020) relataram em seus estudos que SXT teve um efeito sinérgico nas infecções do ZIKA vírus, dobrando a quantidade de morte das células neurais em camundongos ao ingerirem água contaminada antes e durante a gravidez, causando anormalidades no feto. Isso implica que a ingestão do consumo de água com altas concentrações de SXT em regiões do Nordeste do Brasil, provavelmente acarretou casos de microcefalia do agravamento da ZIKA, contudo ainda não se sabe efeitos da toxina na saúde neurológica por longos períodos. O estudo de Scarlett et al. (2020) mostrou que cepas produtoras de cilindrospermopsina possui um alto potencial, em causar um estresse oxidativo, no qual aumenta as quebras na cadeia de

DNA, diminuindo a sua apoptose celular natural do corpo, nos hepatócitos de mamíferos ou os próprios linfócitos sanguíneos, alterando o metabolismo e patologia no fígado, pela exposição a toxina. A primeira descrição de CYN, foi após um surto de hepatoenterite, na Austrália em 1979, onde afetou 148 pessoas, apresentando gastroenterite, necessitando de hospitalização (MOREIRA et al., 2013).

Alguns autores consideram que a grande dominância da espécie *R. raciborskii* ocorre devido sua alta variedade intrapopulacional de cepas (BURFORD et al., 2016; WILLIS et al., 2016). Variações em suas características fisiológicas e morfológicas são importantes mecanismos para conseguirem se adaptarem ao ambiente (XIÃO et al., 2017). Willis et al. (2016) mostraram em seu estudo que em condições ambientais de alta, média e baixa concentração de N e P ocorre a variação intraespecífica da espécie, com grande efeito na taxa de crescimento e morfologia. Além disso, nenhuma das cepas exibiu suas proporções de taxa de crescimento e características morfológicas idênticas.

Estudos apontam que o que impulsiona o domínio da espécie *R. raciborskii* é a sua grande plasticidade fenotípica para se adaptar em condições variáveis de nutrientes (XIAO et al., 2020). Entender a ecologia da espécie é vital para o desenvolvimento de planos de manejo eficazes para conter essas florações, estratégias de mitigação e controle, uma vez que sua toxicidade representa riscos à saúde humana e de outros animais. Assim, se faz necessário um aprofundamento dos estudos sobre as respostas fisiológicas dessa espécie em diferentes condições nutricionais, para entender os mecanismos utilizados pela espécie e ajudar na gestão sustentável dos corpos hídricos.

3 METODOLOGIA

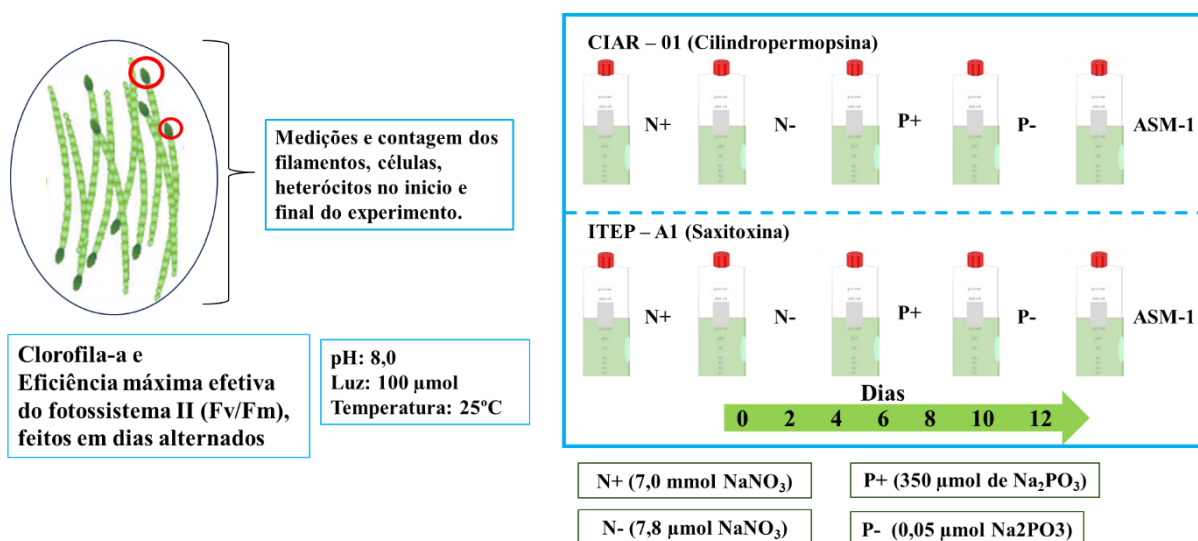
3.1 Cepas das cianobactérias

A linhagem de *R. raciborskii* produtora de saxitoxina (ITEP-A1) foi obtida da coleção de culturas do Instituto de Tecnologia do Pernambuco, e a cepa produtora de cilindrospermopsina (CIAR-01) foi obtida do Laboratório de Qualidade de Água da Universidade Federal do Ceará. Ambas as cepas foram mantidas em meio de cultura ASM-1 (pH 8,0), sob condições ambientais controladas (100 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{S}^{-1}$ de irradiância e fotoperíodo 12:12 de ciclo claro:escuro).

3.2 Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados em monoculturas, ou seja, os efeitos sobre as cepas foram testados de forma individual. Os experimentos compreenderam a exposição das cepas toxigênicas de *R. raciborskii* produtoras de saxitoxina e cilindrospermopsina a diferentes níveis de nutrientes, considerando três réplicas para cada tratamento (Figura 1). Os experimentos foram realizados na temperatura de 25°C, considerada uma temperatura ótima para a espécie (WANG et al., 2021), em cinco diferentes condições nutricionais, no qual simulando condições eutróficas, foi utilizada meio ASM-1 alterados com altas concentrações de nitrato (N+) (7 mmol NaNO_3 ; Marinho et al., 2013) e fosfato (P+) (350 μmol de Na_2PO_3 ; PASSARGE, 2006) simulando condições ricas em N e P, e para condições oligotróficas, limitação de nitrato (N-) (7,8 μmol) e fosfato (P-) (0,05 μmol), conforme Chia et al. (2018). As culturas controles de ambas as linhagens foram sendo mantidas no meio ASM-1 não modificado.

Figura 1. Esquema do delineamento experimental. Sendo concentrações de nitrato alto (N+) e baixo (N-); alto (P+) e baixo (P-) fosfato e controle (ASM-1).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

As culturas foram previamente aclimatadas até a obtenção do início da fase exponencial das cepas (5 dias), sendo incubadas em fase de crescimento exponencial com um biovolume inicial de $4,0 \times 10^6 \mu\text{M}^3 \text{mL}^{-1}$. Para os meios com limitação de fosfato, as culturas foram previamente inoculadas e aclimatadas durante cinco dias em meio sem fosfato para garantir o consumo do nutriente antes estocado.

Os experimentos foram mantidos em uma câmara germinadora (modelo SSGF-342L), para se garantir controle de luz, temperatura e condições estéreis. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer (200 ml). Os frascos foram dispostos e alterados diariamente em relação à fonte de luz, para garantir o mesmo nível de iluminação, e agitadas de forma manual em intervalos de 8 horas para não haver precipitação de células. Os experimentos ocorreram durante dozes dias, onde foram retiradas em dias alternadas (0, 2, 4, 6, 8, 10, e 12) amostras para medições das concentrações de clorofila-a (representando a biomassa) e eficiência máxima efetiva do fotossistema II (Fv/Fm). A densidade células vegetativas e de heterócitos foram determinadas usando uma câmara de contagem, considerando a dimensão média de 20 indivíduos, amostradas no início e fim de cada experimento.

3.3 Análise de dados

Foram determinadas as concentrações de clorofila-a (Cl-a) ($\mu\text{g L}^{-1}$) (biomassa) e a eficiência máxima do fotossistema II (ϕ PSII) (F_v/F_m) *in vivo*, com o uso do fluorômetro modulado por amplitude de pulso PHYTO-PAM e seu software Phyto-Win (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha).

A densidade células (mL^{-1}) dos heterócitos e filamentos foram quantificados através de uma câmara de contagem Brightline Neubauer melhorada, considerando a dimensão média de 20 indivíduos.

As taxas de crescimento (μ ; dia^{-1}) e inibição foram calculadas de acordo com a fórmula de regressão exponencial (Wood et al., 2005):

$$\text{Taxa de crescimento } (\mu; \text{day}^{-1}) = (\ln(Nt) - \ln(Nt_0)) / t - t_0$$

Onde, N representa o valor da biomassa no tempo final (t) e no tempo inicial (t_0).

3.4 Análises estatísticas

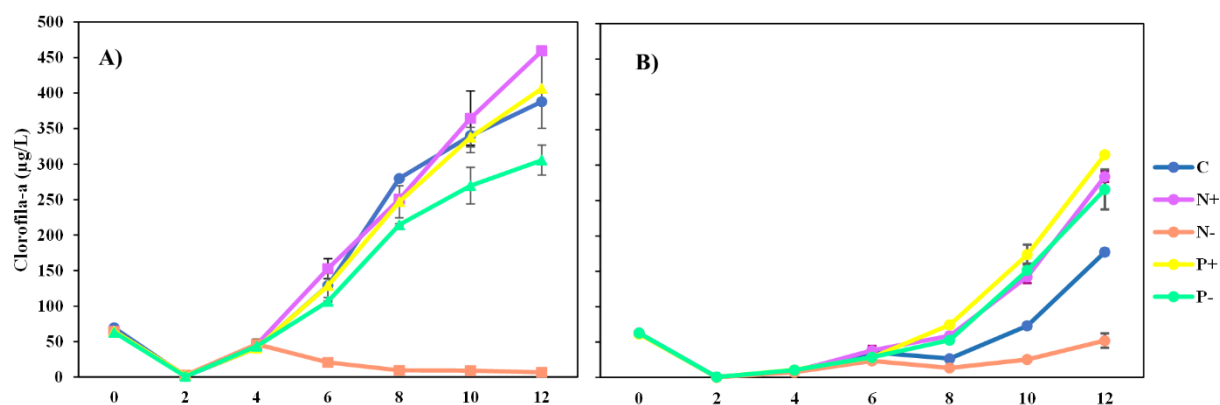
Para verificar a existência de diferenças significativas nas concentrações de clorofila-a, a biomassa, taxas de crescimento e atividade fotossintética (F_v/F_m) das cepas em diferentes condições de nutrientes foram realizadas Análises de variância de dois fatores (ANOVA axb), considerando as interações entre o tempo de incubação e o nutriente exposto. Quando verificadas diferenças significativas nos testes de ANOVA, foi realizado a teste *a posteriori* de Tukey para comparação múltipla das médias. Como pré-requisitos dessas análises de normalidade e homogeneidade das variâncias são avaliados com os testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respectivamente, no software R para Windows.

4 RESULTADOS

Nossos resultados mostraram uma alteração significativa nas concentrações de clorofila-a das cepas de *R. raciborskii* nos diferentes tipos de nutrientes e tempo de incubação ($p < 0,01$; Fig.2; Tabela 1). A cepa produtora de saxitoxina (ITEP-A1) demonstrou maior concentração de biomassa, em todas as concentrações de nutrientes testadas, exceto em limitação de nitrato, onde houve uma inibição significativa. Ao contrário da cepa produtora de cilindrospermopsina, suas concentrações de clorofila-a não apresentaram baixos valores em limitação de nitrogênio, demonstrando que a cepa possui uma maior tolerância fisiológica (Fig.2).

Os maiores valores de clorofila-a da cepa ITEP-A1 ocorreram no dia 12, sob altas concentrações de nitrato (459,4 $\mu\text{g/L}$), fosfato (406,4 $\mu\text{g/L}$), sendo as menores concentrações verificadas sob limitação de nitrato (10 $\mu\text{g/L}$), no último dia. Como também na cepa CIAR-01, foram observadas influências significativas do tempo de incubação ($p < 0,001$), no entanto, mesmo não visto influências tão significativas em relação a variação de nutrientes, foram observados valores mais altos de clorofila-a, em altas concentrações de fosfato (315,1 $\mu\text{g/L}$) e nitrato (284 $\mu\text{g/L}$), observando limitação na concentração em baixos níveis de nitrato (52,1 $\mu\text{g/L}$), ambos no dia 12 (Fig.2).

Figura 2. Concentrações de clorofila-a das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob concentrações de nitrato alto (N+) e baixo (N-); alto (P+) e baixo (P-) fosfato e controle (ASM-1). A) ITEP-A1 e B) CIAR.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 1. Resultados da ANOVA axb para as variáveis de resposta das cepas (ITEP-A1 e CIAR-01) de *R. raciborskii* pós-exposição a diferentes condições de nutrientes. Df, grau de liberdade; ns, não significativo.

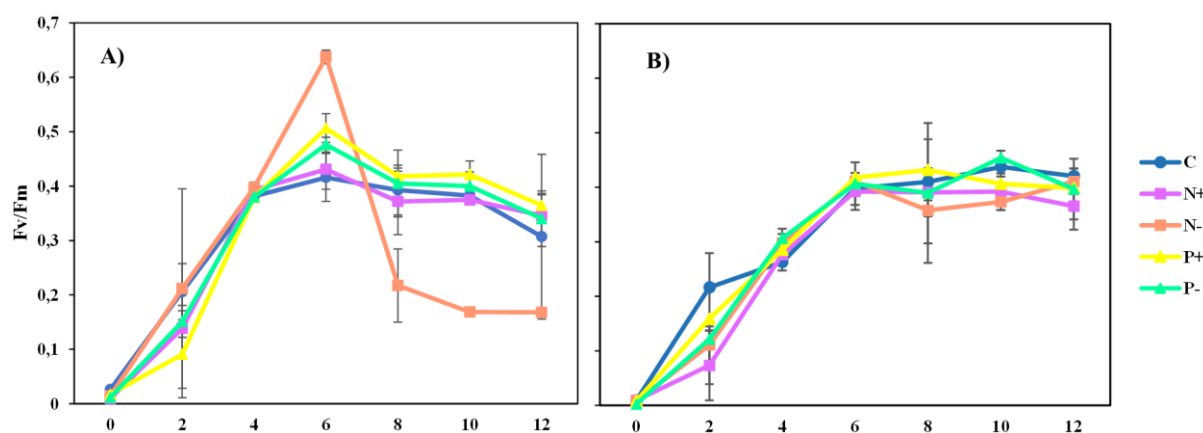
Fatores	Clorofila-a			Taxa de crescimento			Fv/Fm			Densidade de heterócitos		
	df	F	P	df	F	p	df	F	p	df	F	P
Nutrientes (ITEP-A1)	4	41,08	<0.001	4	0,22	ns	4	0,502	ns	4	7,16	<0.001
Dias (ITEP-A1)	1	446,75	<0,001	1	72,19	<0.001	1	40,80	<0.001	1	16,33	<0.006
Nutrientes:Dias (ITEP-A1)	4	38,78	<0.001	4	0,66	ns	4	1,99	ns	4	7,16	<0.009
Nutrientes (CIAR-01)	4	5,74	<0,001	4	0,22	ns	4	0,59	ns	4	2,16	ns
Dias (CIAR-01)	1	101,19	<0.001	1	98,67	<0.001	1	227,2	<0.001	1	3,59	ns
Nutrientes:Dias (CIAR-01)	4	8,170	<0.001	4	0,083	ns	4	0,03	ns	4	2,37	ns

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Valores da taxa de eficiência fotossintética quântica máxima (Fv/Fm) foram influenciadas pelo tempo de incubação e variação de nutrientes de forma significativa em ambas as cepas ($p < 0,001$) (Tabela 1). Houve uma variação intraespecífica entre as cepas, no qual CIAR-01 teve uma maior tolerância a variação de nutrientes em limitação de nitrato do que ITEP-A1 (Fig. 3). Porém foram observados valores máximos de Fv/Fm variaram de 0,4 a 0,6, na cepa ITEP-A1, aumentando gradualmente com o passar dos dias, exceto sob limitação de nitrato, onde foram registrados valores máximos de 0,4, indicando uma inibição na sua atividade fotossintética (Fig. 3A).

Para a cepa produtora de cilindrospermopsina (CIAR-01), também houve variação significativa na variação de nutrientes e dias. Foram observados aumentos em sua atividade fotossintética, com valores máximos a 0,4 em ambos níveis e tipos de nutrientes testados (Fig. 3B).

Figura 3. Taxas de eficiência fotossintética máxima (Fv/Fm) das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob concentrações de nitrato alto (N+) e baixo (N-); alto (P+) e baixo (P-) fosfato e controle (ASM-1). A) ITEP-A1 e B) CIAR-01.

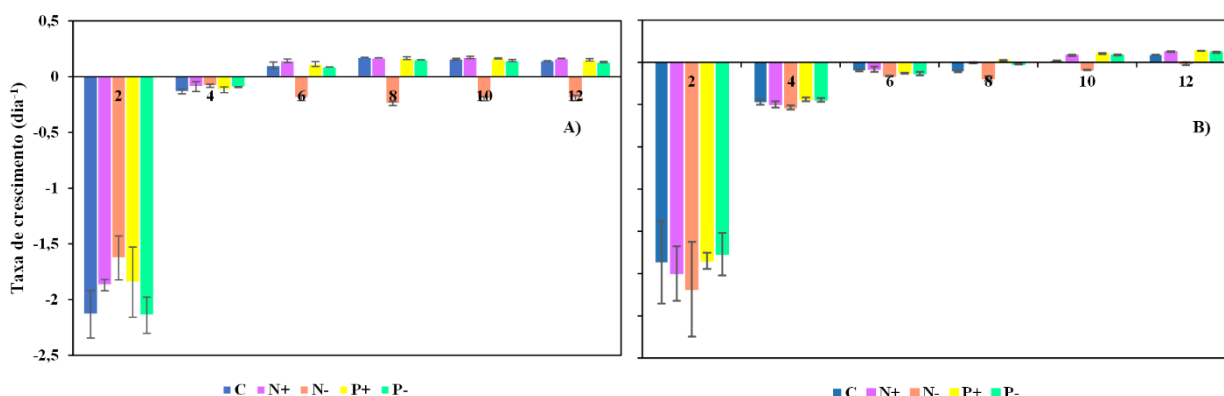


Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Com relação as taxas de crescimento específico, foram observados influência significativa em relação aos tipos de nutrientes e dias ($p < 0,05$; Tabela 1). Verificamos que a cepa ITEP-A1 apresentou inibições no seu crescimento no segundo e quarto dia, tendo em seguida um aumento de seu crescimento nas diferentes concentrações e tipos de nutrientes, com maiores valores registrados no oitavo dia, sob alta concentração de nitrato ($0,17 \text{ day}^{-1}$) e fosfato ($0,16 \text{ day}^{-1}$). Porém em limitação de nitrato foi observado inibição do seu crescimento da cepa ao longo de todos os dias de incubação. Na cepa CIAR-01 notou-se uma influência significativa sobre a sua taxa de crescimento ao longo do tempo de exposição e níveis de nutrientes ($p < 0,05$;

Tabela 1). Valores negativos foram observados nos dias iniciais dos experimentos, principalmente em condições limitantes de nitrato ($2,68 \text{ day}^{-1}$), no segundo dia. Enquanto maiores taxas foram verificadas no último dia de experimento, em altas concentrações de fosfato ($0,13 \text{ day}^{-1}$) seguido de nitrato ($0,12 \text{ day}^{-1}$) (Fig.4).

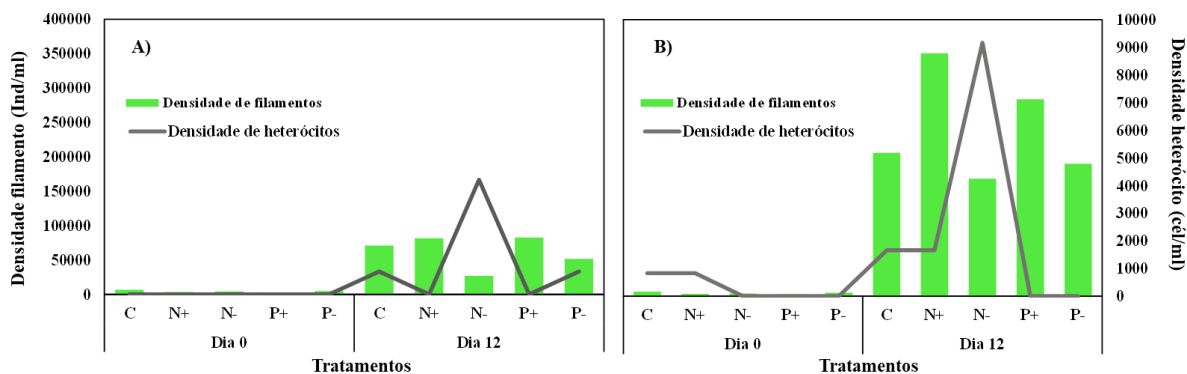
Figura 4. Taxas de crescimento específico (dia^{-1}) das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob altas concentrações de nitrato (N+), fosfato (P+) e baixas concentrações (N-) e (P-). A) ITEP-A1 e B) CIAR-01.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Em relação a densidade de heterócitos, foi observado que a maior produção de ambas as cepas ocorreu em limitação de nitrato, sendo a variação significativa para ITEP-A1 considerando os dias, nutrientes e interação entre esses fatores. Para a cepa CIAR, embora maiores densidades de heterócitos tenham sido registradas no último dia de experimento, especialmente sob limitação de N, os resultados da ANOVA, não mostraram diferenças significativas quanto as interações testadas. Entretanto, verificamos que, maiores concentrações de heterócitos foram observados na cepa produtora de cilindropermopsina (CYN) no dia 12, principalmente, em limitação de nitrato ($9166,7 \text{ Ind/ml}$), do que em cepas produtoras de saxitoxinas ($4166,7 \text{ Ind/ml}$) (Fig. 5).

Figura 5. Densidade de filamentos e heterócitos das cepas de *R. raciborskii* (ITEP-A1 e CIAR-01), sob as diferentes condições nutricionais. A) ITEP-A1 e B) CIAR-01.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que maiores concentrações de nutrientes proporcionou uma melhor resposta fisiológica (biomassa, crescimento e taxa fotossintética), em *R. raciborskii* produtoras de saxitoxina e cilindrospermopsina, confirmando nossa primeira hipótese testada. Como também, foram observadas variações intraespecíficas em ambas as cepas, onde a cepa produtora de saxitoxina apresentou um maior destaque em sua taxa de crescimento, biomassa e taxa fotossintética, contudo, a densidade de heterócitos não houve variação significativa não corroborando com nossa segunda hipótese. Os resultados obtidos mostraram que em meio com maiores concentrações de N e P as cepas de *R. raciborskii* foram favorecidas, isso pode estar associado ao fato dessas moléculas serem importantes na formação de RNA e DNA, como também moléculas importantes para sua fotossíntese, que favorecem seu crescimento (CONLEY et al., 2009).

Em ambas as cepas de *R. raciborskii*, a baixa concentração de fosfato não alterou de forma significativa o seu crescimento, o que pode estar relacionado a capacidade de clivar moléculas orgânicas de fósforo (LEI et al., 2021) e de armazenar o fósforo, podendo utilizar as reservas deste nutriente sob condições de estresse. Nossos resultados se assemelham com os observados por Guedes et al., (2019), em que foi verificado que mesmo em limitação de P, populações da espécie manteve o crescimento mesmo após 10 dias de limitação do nutriente. Também foi verificado em estudo de Aubriot et al., (2017) que altas concentrações de nitrato garante o estabelecimento da espécie em condições limitantes de fosfato, pois o sistema de captação de fosfato é feito através de proteínas que utilizam nitrogênio em sua composição, indicando que apenas a limitação de fosfato não é suficiente para conter as florações da espécie, como foi observado em nossos resultados que a limitação de P não inibiu suas respostas fisiológicas.

Contudo, em limitações de nitrogênio foi observado uma forte inibição entre as cepas em seu crescimento, no entanto, uma maior inibição foi vista na cepa produtora de SXTs do que na produtora de CYNs, como também, observado uma maior proporção de heterócitos no último dia nesse nutriente, em comparação aos outros nutrientes, isso porque, apesar da espécie apresentar capacidade de formar heterócitos, a fixação de N_2 é apontado em estudos como um processo que exige mais energia para sua assimilação (BURFORD et al., 2014).

A fixação de nitrogênio atmosférico não suporta uma alta taxa de crescimento sob limitação de N, e representa menos de 10% do total de N, necessário para suas atividades celulares (LU et al., 2022). Foi demonstrado também que ambientes limitados em N, sejam mais suscetíveis à proliferação de cianobactérias fixadoras (MENDES et al., 2022). Mostrando que existe uma forma de adaptação da espécie a estresses ambientais, levando a dominância o de melhor *fitness* ecológico (ZHENG et al., 2023). O estudo feito por Willis et al., (2016), demonstrou que vários ecótipos da espécie *R. raciborskii* foram identificados em todo o mundo, sendo em altas ou limitação na concentração de nutrientes, destacando que esses ecótipos podem variar em sua magnitude de respostas fisiológicas, levando a dominância aquele que se adapta melhor ao ambiente.

Em relação a taxa fotossintética, observou-se uma variação intraespecífica entre as cepas, sendo a produtora de CYN mais tolerante à limitação de nitrato em comparação com a produtora de SXT. A inibição das taxas fotossintéticas sob limitação de nitrato que demonstra a redução na atividade fotossintética, por conta do estresse que reduz a síntese de ATP e NADPH⁺ e regeneração do NADPH (LI e SUN et al., 2016).

Os resultados indicam que cepas produtoras de saxitoxina podem ser favorecidas em ambientes com de altas concentrações de nutrientes. A maior concentração de biomassa foi observada na cepa produtora de SXT, em comparação a produtora CYN, em altas concentrações e limitação de fósforo, sugere uma adaptação vantajosa, especialmente em ambientes ricos em nutrientes. O tratamento duplo de nutrientes são métodos mais eficazes para o controle da espécie, pois a redução de nutrientes individuais pode levar a alteração da proporção de outros nutrientes no ambiente (PAERL et al., 2013), favorecendo cepas que possuem melhores respostas fisiológicas.

A espécie por ser produtora de toxinas, se faz necessário a avaliação detalhada das interações intraespecíficas sobre essa produção de toxinas. Além disso, observado as variações intraespecíficas através de diferentes condições nutricionais, são necessários mais estudos explorando a produção de toxinas, sua variabilidade genética, bem como a avaliação sobre um maior número de cepas de regiões distintas para melhor compreensão da ecologia da espécie.

5 CONCLUSÃO

Concluimos que altas concentrações de nutriente tiveram respostas fisiológicas (biomassa, eficiência fotossintética e taxa de crescimento) significativas, em ambas as cepas da espécie *R. raciborskii*, confirmando a nossa primeira hipótese. Como também, a cepa produtora de SXT apresentou maior vantagem competitiva, pois sua taxa de crescimento apresentou aumento a partir do sexto dia de experimento, enquanto a cepa produtora de CYN teve aumento de sua taxa de crescimento, mas tardio, a partir do décimo dia de experimento. Enquanto a densidade de heterócitos não houve uma variação significativa, não corroborando com nossa segunda hipótese. Então, foram vistas variações intraespecíficas entre as cepas de *R. raciborskii*, que podem ser mecanismos utilizados para o sucesso ecológico da espécie. A alta concentração de nutrientes (N e P) garantem a dominância da espécie em corpos hídricos, sendo uma preocupação global pela espécie ser potencialmente produtora de cianotoxinas.

Observado a variação das cepas em resposta a limitação de nutrientes, indica a diversidade genética e ecofisiológica dentro da espécie de *R. raciborskii*. Como em limitação de fósforo, pode ser percebido seus mecanismos adaptativos que permitem seu desempenho fisiológico. E em limitação de nitrogênio, a cepa produtora de CYN ter uma maior tolerância a esta condição, como também a produção maior de heterócitos, diferente da cepa produtora de SXT. Cada cepa pode representar adaptações às condições específicas do ambiente, resultando em diferentes perfis de resposta a variações nutricionais. Podendo ser resultado da sua evolução e suas restrições seletivas que enfrentam em seus ambientes nativos.

Por fim, considerando a produção de cianotoxinas pelas cepas de *R. raciborskii*, destaca-se a relevância para a saúde pública. Recomenda-se a implementação de sistemas de monitoramento da qualidade da água, o controle duplo de nutrientes, para proteger a saúde da população que utiliza esses recursos hídricos, como também da biota do ambiente aquático. Se faz necessários mais estudos para a compreensão sobre a interação de nutrientes com outros fatores ambientais atuando sinergicamente, também afeta a produção de cianotoxinas, sua variabilidade genética, bem como a avaliação sobre um maior número de cepas de regiões, tóxicas e não tóxicas distintas para melhor compreensão da ecologia da espécie.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, C. A.; DANTAS, Ê. W.; DO NASCIMENTO MOURA, A. 2020. Modeling cyanobacterial blooms in tropical reservoirs: The role of physicochemical variables and trophic interactions. **Ciência do Ambiente Total**, 744, 140659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140659>
- AUBRIOT, L., BONILLA, S. 2018. Regulation of phosphate uptake reveals cyanobacterial bloom resilience to shifting N: P ratios. **Freshw. Bio**, 63, 318–329. <https://doi.org/10.1111/fwb.13066>.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A.N.; ARAGÃO-TAVARES, N.K.; CORDEIRO ARAÚJO, M.K. 2014. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.** 86 (1), 297–310. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201302512>.
- BIN YANG, YU-JIAO, J., HE W., LIU, W., Xiang-Zhen KONG, X., JORGENSEN, S., XU, F. The tempo-spatial variations of phytoplankton diversities and their correlation with trophic state levels in a large eutrophic Chinese lake. **Ecological Indicators**. Volume 66. 2016. Pages 153-162, ISSN 1470-160X. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.01.013>.
- BURFORD, M. A, BEARDALL, J., WILLIS, A., OORR, PT., MAGALHÃES, VF., RANGEL, LM., NEILAN, BA. 2016. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Harmful Algae** 54:44–53
- BURFORD, M. A.; DAVIS, W. T.; ORR, T. P.; SINHA, R.; WILLIS, A.; NEILAN A. B. Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 1, p. 135–148. doi: 10.1111/1574-6941.12341
- CAREY, C. C.; IBELINGS W. B.; HOGGMANN P. E.; HAMILTON P. D.; BROOKES D. J. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1394–1407, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.waters.2011.12.016>
- CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ. Health Perspect.** 109, 663–668. doi: 10.1289/ehp.01109663
- CIRÉS, S., DELGADO, A., GONZÁLEZ-PLEITER, M., QUESADA, A. 2017. Temperature influences the production and transport of saxitoxin and the expression of sxt genes in the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile*. **Toxins** 9:322. 10.3390/toxins9100322
- DONEY, S. C, FABRY VJ, FEELY RA, KLEYPAS JA, 2009. Ocean acidification: the other CO2 problem. **Rev. Sea. Sci.** 1, 169-192. DOI: 10.1146/annurev.marine.010908.163834
- ELMERICH, C., NEWTON, W.E. (eds) Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, vol 5. **Springer**, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-3546-2_11

FUNARI, E., TESTAI, E. 2008. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure, **Critical Reviews in Toxicology**, 38:2, 97-125, DOI: [10.1080/10408440701749454](https://doi.org/10.1080/10408440701749454)

GRIFFITHS, D. J.; SAKER, M. L. 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environ Toxicol**, 18, 78–93. DOI: 10.1002/tox.10103.

HASELKORN, R. 2007. Heterocyst differentiation and nitrogen fixation in cyanobacteria. **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**, v. 5, p. 233-255. Fonte: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=hiEkEBII-Y8C&oi=fnd&pg=PA233&ots=fUGAvRrvsd&sig=4ikC5T3_sbGZLpSLuSxYqU0a0g#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 16 out. 2023.

HAWKINS PR, RUNNEGAR M. T.; JACKSON A. R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Appl Environ Microbiol**. 1985;50:1292–5. doi: 10.1128/aem.50.5.1292-1295.1985.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E. 2001. Nitrogen Control in Cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 411–425. doi: 10.1128/JB.183.2.411-425.2001.

HOWARTH, R.W., A. SHARPLEY, D. WALKER. 2002. Sources of nutrient pollution to coastal waters in the United States: Implications for achieving coastal water quality goals. **Estuaries** 25:656-676. <http://www.jstor.org/stable/1353025>.

HUISMAN, J., CODD, G.A., PAERL, H.W. et al. Cyanobacterial blooms. **Nat Rev Microbiol** 16, 471–483 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

IPCC - Climate Change (2012) The physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. **Agenda** 996. Cambridge University Press, Cambridge.

KENDALL R. SCARLETT, S, K., LOVIN, M. L, SAURABH CHATTERJEE, J. THAD SCOTT, BRYAN W. Brooks Global scanning of cylindrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards, **Science of The Total Environment**, Volume 738, 2020, 139807, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139807>.

LI, J.; SUN, X. 2016. Effects of different phosphorus concentrations and N/P ratios on the growth and photosynthetic characteristics of *Skeletonema costatum* and *Prorocentrum donghaiense*. **Chinese Journal of Oceanology and limnology**, 34(6), 1158-1172. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-5169-z>.

LU, Z.; CHEN, S. J.; XIAO, L.; LEI, L.; HAN, B.; PAERL, W. H.; PAERL W. H. 2022. Cyanophycin accumulated under nitrogen-fluctuating and high-nitrogen conditions facilitates the persistent dominance and blooms of *Raphidiopsis raciborskii* in tropical waters. **Water Research**, v. 214, p. 118215. <https://doi.org/10.1016/j.waters.2022.118215>

MESQUITA, M. C, LÜRLING M, DORR F, PINTO E, MARINHO MM (2019). Combined effect of light and temperature on the production of saxitoxins in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Toxins** 11:38. doi: 10.3390/toxins11010038.

MENDES, C, F., SEVERIANO, J, S., MOURA, G, C., SILVA, R, D., MONTEIRO F, M., LUCENA, J, E. The reduction in water volume favors filamentous cyanobacteria and heterocyst production in semiarid tropical reservoirs without the influence of the N:P ratio, **Science of The Total Environment**, Volume 816, 2022,151584, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151584>.

MESSINEO, V.; MELCHIORRE, S.; CORDIA D. A.; GALLO, P.; BRUNO, M. 2009. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. **Environmental Toxicology**, p. NA-NA. doi: 10.1002/tox.20469.

MICHELE A. BURFORD, TIMOTHY W. D, PHILIP T. ORR, RATI SINHA, ANUSUYA WILLIS, BRETT A. NEILAN, Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 89, Issue 1, July 2014, Pages 135–148, <https://doi.org/10.1111/1574-6941.1234>.

MOREIRA, C.; AZEVEDO, J.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V. 2013. Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 114, Issue 3, Pages 605–620, <https://doi.org/10.1111/jam.12048>

PAERL, H.W., OTTEN, T.G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. **Microb Ecol** 65, 995–1010 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>

PADE N, HAGEMANN M. Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. **Life**. 2015; 5(1):25-49. <https://doi.org/10.3390/life5010025>

PENNA, A., PERINI, F., DELL' AVERSANO, C., CAPELLACCI, S., TARTAGLIONE L., GIACOBBE, M., CASABIANCA, S., FRAGA, S., CIMINIELLO, P., SCARDI, M. The sxt Gene and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins as Markers for the Monitoring of Toxic Alexandrium Species Blooms. **Environ. Sci. Technol.** 2015, 49, 24, 14230–14238. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03298>

SMIL, V. 2001. Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food. **The MIT Press**, Cambridge, United Kingdom. DOI: 10.1017/S0007087402364616.

SMITH, V. H. & SCHINDLER, D. W. 2009. Eutrophication science: where do we go from here?. **Trends in Ecology and Evolution** 24: 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.11.009>

THONGDAM, S.; KUSTER, A.C.; HUSER, B.J.; KUSTER, A.T. 2021. Low Dose Coagulant and Local Soil Ballast Effectively Remove Cyanobacteria (*Microcystis*) from Tropical Lake Water without Cell Damage. **Water**, 13, 111. <https://doi.org/10.3390/w13020111>

SEITZINGER, S.P., HAVENS, K.E., LANCELOT, C., LIKENS, G.E., 2009. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. **Science** 323, 1014-1015. DOI: 10.1126/science.1167755

THOTTUMKARA, A. P.; PARSONS, W. H.; DU BOIS, J. Saxitoxin. 2014. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 23, p. 5760–5784. Doi: 10.1002/anie.201308235

VAROL, M. 2020. Spatiotemporal changes in surface water quality and phosphorus content of sediments from a large reservoir in Turkey. **Environmental Pollution** 111, 259, 113860. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113860.

WAYNE W. CARMICHAEL. 2001. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”, **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, 7:5, 1393-1407, DOI: 10.1080/20018091095087

WAGNER, D. N, QUACH. E, BUSCHO. S, RICCIARDELLI, A. 2021 Nitrogen form, concentration, and micronutrient availability affect microcystin production in cyanobacterial blooms. DOI: 10.1016/j.hal.2021.102002

WHITMAN, W. D.; AGRAWAL A. A. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important. **Phenotypic plasticity of insects: Mechanisms and consequences**, p. 1-63, DOI: 10.1201/b10201

WILLIS, A.; CHUANG W. A; WOODHOUSE N. J.; NEILAN, A. B.; BURFORD, A. M. 2016. Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Toxicon**, v. 119, p. 307–310. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.07.005.

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). 2015. **Harmful Algae**, 47, 27–34. doi:10.1016/j.hal.2015.05.011.

WURTSBAUGH, W. A., PAERL, H. W.; DODDS, W. K. 2019. Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. **WIREs Water**, 6(5), e1373. <https://doi.org/10.1002/wat2.1373>.

ZHU, Y. P., ZHANG, H. P., CHEN, L., & ZHAO, J. F. 2008. Influence of the South–North Water Diversion Project and the mitigation projects on the water quality of Han River. **Science of The Total Environment**, 406(1-2), 57–68. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.08.008

ZHANG, W; LIU, J.; XIAO, Y.; ZHANG, Y.; YU, J. Y.; ZHENZHENG; LIU, W. 2022. The impact of Cyanobacteria blooms on the aquatic environment and human health. **Toxins**, v. 14, n. 10.10.3390/toxins14100658.