



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INGRID ELAINE RODRIGUES DOMINGOS

**EFEITO DA SALINIDADE NO BIOVOLUME, CRESCIMENTO E MORFOLOGIA
DE CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE FLORAÇÕES**

NATAL-RN
2021

INGRID ELAINE RODRIGUES DOMINGOS

**EFEITO DA SALINIDADE NO BIOVOLUME, CRESCIMENTO E MORFOLOGIA
DE CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE FLORAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
em cumprimento às exigências legais, como
quesito para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Kemal Ali Ger.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Renata de Fátima
Panosso.

NATAL-RN
2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Domingos, Ingrid Elaine Rodrigues.

Efeito da salinidade no biovolume, crescimento e morfologia de cianobactérias formadoras de florações / Ingrid Elaine Rodrigues Domingos. - 2021.

43 f.: il.

Monografia (graduação) -, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Ciências Biológicas. Natal, RN, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Kemal Ali Ger.

Coorientadora: Profa. Dra. Renata de Fátima Panosso.

1. Choque salino - Monografia. 2. Mudanças climáticas - Monografia. 3. Tolerância - Monografia. 4. Ecossistemas aquáticos - Monografia. 5. Ecofisiologia - Monografia. I. Ger, Kemal Ali. II. Panosso, Renata de Fátima. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

INGRID ELAINE RODRIGUES DOMINGOS

**EFEITO DA SALINIDADE NO BIOVOLUME, CRESCIMENTO E MORFOLOGIA
DE CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE FLORAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
em cumprimento às exigências legais, como
quesito para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovado em: 06/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Kemal Ali Ger (Orientador)
Departamento de Ecologia (DECOL) - Centro de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a. Dr^a. Vanessa Becker (Membro)
Departamento de Engenharia Civil
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Aluno de Doutorado - Ewaldo Leitão de Oliveira Júnior (Membro)
University of Connecticut

NATAL-RN
2021

**Dedico a minha família e amigos
com todo amor e carinho.**

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, pois sem ele não seria possível em tempos tão difíceis e turbulentos persistir para alcançar meus sonhos e objetivos.

Aos professores do curso Ciências Biológicas - Bacharelado pelos conhecimentos e conselhos que contribuíram para minha formação profissional, além de toda paciência e determinação.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) por proporcionar toda estrutura física para a minha formação por meio das salas de aula, laboratórios, ambientes de estudo e alimentação. Ao Laboratório de Microbiologia Aquática (LAMAq) por despertar meu interesse pelos organismos planctônicos e pela infraestrutura para o desenvolvimento de vários trabalhos, inclusive este. Também gostaria de agradecer ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) pelo apoio ao longo destes 4 anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro através das bolsas de Iniciação Científica (IC) que auxiliaram nas minhas pesquisas.

A minha família, em especial, aos meus pais, Francisco e Fátima, pelo amor, carinho, ensinamentos e conselhos que foram essenciais para minha formação ética. Aos meus irmãos e ao meu namorado, agradeço por todo incentivo e auxílio perante todas as dificuldades da vida.

As minhas amigas de curso, Beatriz, Ana Clara, Yasmin sou grata por todos os momentos de descontração e alegria que vocês proporcionaram. Foram essenciais para lidar com todo o estresse da graduação. Aos amigos do LAMAq, especialmente, Nathália, pelas conversas sobre a vida, as sugestões e parcerias de trabalho.

A Ewaldo, pelos ensinamentos e por apoiar o desenvolvimento desse estudo.

A Ali e Renata, meus orientadores e amigos, por não desistirem das minhas ideias mesmo com todas as dificuldades desses últimos tempos. Gratidão por auxiliarem nos assuntos acadêmicos e por sempre acreditarem no meu potencial.

A todos, OBRIGADA!!

RESUMO

Os cenários atuais de aumento das temperaturas e diminuição das precipitações em conjunto às atividades humanas estão proporcionando o aumento da salinidade nos ecossistemas aquáticos continentais. A salinização, processo que durante anos estava associada apenas às regiões semiáridas e áridas, promove vários problemas à economia, à saúde humana e principalmente, as comunidades biológicas em rios, lagos e reservatórios. Contudo, em comparação a outros problemas ambientais, a salinização dos ecossistemas aquáticos continentais é pouco pesquisada. Inclusive, são poucos os estudos que indicam os efeitos da salinização no biovolume, crescimento e morfologia das cianobactérias. Assim, este trabalho foi desenvolvido para averiguar a resposta de duas cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii*, ao aumento repentino de salinidade. Para isso, foram analisadas as concentrações de biovolume, taxas de crescimento e morfologia. Ambas as espécies de cianobactérias foram expostas aos tratamentos com 2.5, 5 e 10 g L⁻¹ de NaCl e um controle (0 g L⁻¹) durante 12 dias. Nesse estudo, todos os parâmetros para ambas as cianobactérias foram afetados de forma negativa pelo aumento da salinidade em relação ao controle. Na morfologia, o aumento da concentração de sais promoveu uma diminuição do tamanho celular para *M. aeruginosa* e dos filamentos para *R. raciborskii*. Os resultados indicaram que *M. aeruginosa* foi capaz de crescer em salinidades entre 0 e 10 g L⁻¹, enquanto *R. raciborskii* tolerou entre 0 e 5 g L⁻¹. A salinidade exerceu uma diminuição nas concentrações de biovolume e nas taxas de crescimento de *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Além disso, *M. aeruginosa* demonstrou ser mais tolerante.

Palavras-chave: Choque salino; Mudanças climáticas; Tolerância; Ecossistemas aquáticos; Ecofisiologia.

ABSTRACT

The current scenarios of increasing temperature and decreasing precipitation, together with human activities, are causing the increase of salinity in continental aquatic ecosystems. Salinization, a process that for years was typically associated with semi-arid and arid regions, promotes various problems to the economy, human health, and especially to the biological communities in rivers, lakes, and reservoirs. However, in comparison to other environmental problems, the salinization of continental aquatic ecosystems is little researched. There are few studies indicating the effects of salinization on the biovolume, growth and morphology of cyanobacteria. Thus, this work was developed to investigate the response of two cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* and *Raphidiopsis raciborskii*, to sudden increases in salinity. To do this, biovolume concentrations, growth rate, and morphology were analyzed. Both cyanobacterial species were exposed to treatments with 2.5, 5 and 10 g L⁻¹ NaCl and a control (0 g L⁻¹) for 12 days. In this study, all parameters for both cyanobacteria were negatively affected by increasing salinity relative to the control. In morphology, the increase in salt concentration promoted a decrease in cell size for *M. aeruginosa* and filament size for *R. raciborskii*. The results indicated that *M. aeruginosa* was able to grow in salinities between 0 and 10 g L⁻¹, while *R. raciborskii* tolerated between 0 and 5 g L⁻¹. Salinity exerted a decrease in biovolume concentrations and growth rate of *M. aeruginosa* and *R. raciborskii*. In addition, *M. aeruginosa* proved to be more tolerant.

Keywords: Saline shock; Climate changes; Tolerance; Aquatic ecosystems; Ecophysiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho experimental para verificar os efeitos do aumento da salinidade nas concentrações de biovolume, crescimento e morfologia das espécies *Microcystis aeruginosa* (MC) e *Raphidiopsis raciborskii* (RR). O experimento possui os seguintes tratamentos: Controle (C), salinidades de 2.5 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹.....**8**
- Figura 2** - Delineamento experimental - O experimento foi composto por 24 frascos distribuídos aleatoriamente.**8**
- Figura 3** - Câmaras de sedimentação e microscópio invertido utilizados para determinar as contagens e as densidades celulares.....**9**
- Figura 4** - Médias das concentrações de biovolume (µm³/ml) encontradas no 5º dia de experimento para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Resultados com intervalo de confiança de 95%.....**14**
- Figura 5** - Médias das concentrações de biovolume (µm³/ml) encontradas no 12º dia de experimento para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Resultados com intervalo de confiança de 95%.....**14**
- Figura 6** - Diagrama de caixas (boxplot) mostrando a mediana, os valores máximos e mínimos, além do primeiro e terceiro quartil dos diâmetros das células de *M. aeruginosa* (µm) (n = 60). Erro padrão com intervalo de confiança de 95% (n = 60). As letras indicam diferenças significativas entre o controle e os tratamentos de acordo com o teste de Dunn.....**15**
- Figura 7** - Diagrama de caixas (boxplot) mostrando a mediana, os valores máximos e mínimos, além do primeiro e terceiro quartil dos comprimentos dos filamentos de *R. raciborskii* (µm). Erro padrão com intervalo de confiança de 95% (n = 120).....**16**
- Figura 8** – Formação de aglomerados macroscópicos nos tratamentos com salinidade 2.5, 5 e 10 g L⁻¹ da espécie *M. aeruginosa*.....**17**

Figura 9 – Alterações na coloração entre os tratamentos ao final do experimento.....18

Figura 10 – Médias das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* no 5º dia de experimento ao serem expostas aos tratamentos de salinidade (g L^{-1}). Barras de erro com intervalo de confiança de 95%.....20

Figura 11 - Médias das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* no 12º dia de experimento ao serem expostas aos tratamentos de salinidade (g L^{-1}). Barras de erro com intervalo de confiança de 95%.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) no 5º dia para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) mostrando o efeito dos tratamentos em relação ao controle (Salinidade: 0 g L⁻¹, Espécie: *R. raciborskii*).....**13**

Tabela 2 – Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) no 12º dia para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) mostrando o efeito dos tratamentos em relação ao controle (Salinidade: 0 g L⁻¹, Espécie: *R. raciborskii*)..**13**

Tabela 3 – Resumo dos testes de Kruskal Wallis utilizado para identificar diferenças entre as dimensões médias das células (μm) de *M. aeruginosa* e os comprimentos dos filamentos (μm) de *R. raciborskii* nos tratamentos ao final do experimento.....**15**

Tabela 4 – Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) no 5º dia de experimento.....**19**

Tabela 5 - Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) no 12º de experimento.....**19**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C - Controle;

ITEP-A3 - Cepa de *R. raciborskii*;

LAMAq - Laboratório de Microbiologia Aquática;

LEA-04 - Cepa de *M. aeruginosa*;

MC - *Microcystis aeruginosa*;

NaCl - Cloreto de sódio;

g L⁻¹ - Gramas por litro;

GLM – Modelos Lineares Generalizados;

r – Taxa de crescimento;

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio;

RR - *Raphidiopsis raciborskii*;

UFAPE - Universidade Federal do Agreste de Pernambuco;

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte;

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora;

WC - *Wright's Cryptophyte*;

µm – Micrômetros;

µm³/ml – Micrômetros cúbicos por mililitro;

µmol – Micromol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Justificativas	4
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1. Culturas de Cianobactérias e tamanho das células	6
3.2. Delineamento experimental	7
3.3. Concentração de biovolume e taxa de crescimento	9
3.4. Morfologia	10
3.5. Análises Estatísticas	11
4. RESULTADOS	12
4.1. Concentração de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$)	12
4.2. Morfologia	15
4.3. Taxa de crescimento – <i>r</i>	18
5. DISCUSSÃO	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
APÊNDICES	31

1. INTRODUÇÃO

A crescente salinização em ecossistemas aquáticos continentais é responsável por várias alterações na diversidade biológica desses ambientes (DELAUNE et al., 2021). As mudanças climáticas promovem o aumento da evaporação e a diminuição das precipitações (GIORGI e LIONELLO, 2008), assim como as atividades antrópicas diminuem o nível de água em rios e lagos promovendo um aumento na concentração de sais (WILLIAMS, 2001). É preocupante o aumento da salinidade nesses ambientes por proporcionar vários problemas à saúde humana (VINEIS, CHAN e KHAN, 2011), assim como prejuízos à pesca e ao turismo local (WILLIAMS, 2002). Outra consequência relacionada à salinização em ambientes aquáticos continentais são mudanças nas estruturas ecológicas, como a dominância e sobrevivência por espécies tolerantes (BROCK, NIELSEN e CROSSLÉ, 2005; SEREDA et al., 2011; BEZIRCI et al., 2012; JEPPESEN et al., 2015; HINTZ e RELYEA, 2019).

As áreas semiáridas e áridas ao redor do mundo são frequentemente afetadas pelas mudanças climáticas. Essas regiões são habitadas por mais de 2,5 bilhões de pessoas, o que promove uma grande demanda por recursos hídricos (WILLIAMS, 2002; UN-EMG 2011). Um dos problemas presentes nesses ambientes, além do aumento das temperaturas e diminuição das precipitações (HUANG, GUAN e JI, 2012) é a crescente concentração de sais nos corpos aquáticos (WILLIAMS, 2002; JEPPESEN et al., 2015). Porém, esse processo não é restrito apenas para essas regiões, estudos apontam um aumento da concentração de sais em rios e lagos de regiões temperadas (DUGAN et al., 2017; KAUSHAL et al., 2018 e 2021) indicando que tal problema atinge uma escala global.

O aumento da concentração de sais tende a afetar negativamente a diversidade das espécies, além de diminuir a densidade das populações de animais, plantas e algas nos ecossistemas aquáticos (WILCOX, 1984; HART et al., 1991; NIELSEN et al., 2003; SARMA et al., 2006; SEREDA et al., 2011). Outra comunidade biológica afetada pela salinidade e que merece atenção em virtude do seu papel ecológico na ciclagem de carbono, metais e nutrientes são os microrganismos.

Na comunidade microbiana aquática continental, o fitoplâncton desenvolve o papel de produtor primário e serve de alimento para outros níveis tróficos. Alguns estudos de cascata trófica apontam a salinização como um fator positivo para o crescimento do fitoplâncton, pois promove mudanças no controle top-down através da diminuição das comunidades de

zooplâncton, seus consumidores na cadeia alimentar (HINTZ et al., 2017; LIND et al., 2018; DELAUNE et al. 2021; MOFFETT et al., 2021). Ao analisar os efeitos da salinidade apenas no fitoplâncton foi identificado mudanças na estrutura das comunidades, uma vez que as algas verdes são substituídas por cianobactérias tolerantes (CHAKRABORTY et al., 2011). A dominância de cianobactérias é um problema atual em muitos ambientes, mas principalmente em regiões secas, pois as altas temperaturas diminuem os níveis de água disponível promovendo o acúmulo de nutrientes e propiciando as florações em rios e lagos (COSTA, ATTAYDE, BECKER, 2016; ROCHA JÚNIOR et al., 2018).

A cianobactéria produtora de toxina *Microcystis aeruginosa* possui ampla distribuição geográfica sendo uma das principais espécies responsáveis pelas florações na água doce de regiões tropicais (ZURAWELL et al., 2005; HARKE et al., 2016). A salinidade já foi apontada como fator de controle para florações de *M. aeruginosa* (VERSPAGEN et al., 2006). Porém, resultados de efeito de choque salino em *M. aeruginosa* indicam que a espécie consegue tolerar, temporariamente, salinidades de até $17,5 \text{ g L}^{-1}$ (TONK et al., 2007). Ao serem expostas a elevadas concentrações de sais, as células de *M. aeruginosa* utilizam mecanismos fisiológicos e metabólicos para lidar com esse fator estressor (CHEN et al., 2015). Apesar de muitas cepas manterem as taxas de crescimento sob essas condições, elas possuem um limite de tolerância que ao ser excedido promove a lise celular (ROSS et al., 2019).

Outra espécie de cianobactéria que merece atenção em virtude do seu potencial tóxico e da sua crescente expansão mundial é *Raphidiopsis raciborskii* (ANTUNES, LEÃO e VASCONCELOS, 2015). A baixa concentração de sais ($< 4 \text{ g L}^{-1}$) é considerada um fator importante para o crescimento de *R. raciborskii* (PADISÁK, 1997; DUVAL et al., 2018). Um ponto chave nessa cianobactéria são seus mecanismos adaptativos, células diferenciadas que possibilitam a espécie habitar ambientes desfavoráveis e com as mais diversas condições (PADISÁK, 1997; BRIAND et al., 2004; ANTUNES, LEÃO e VASCONCELOS, 2015). Contudo, poucos trabalhos relacionam o efeito da salinidade nas características ecofisiológicas de cepas brasileiras de *R. raciborskii*.

No Brasil, os corpos aquáticos da região nordeste são vulneráveis as florações de cianobactérias (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2012), pois as altas temperaturas e a grande concentração de nutrientes associadas aos períodos de seca favorecem esse processo (PAERL & HUISMAN, 2008; COSTA, ATTAYDE, BECKER, 2016; ROCHA JÚNIOR et al., 2018). Porém, poucos estudos relacionam o aumento da salinidade nessas regiões como

um fator ambiental que favorece as formações de florações de cianobactérias. No estado do Rio Grande do Norte, *Microcystis spp.* e *R. raciborskii* são dominantes nas comunidades fitoplanctônicas dos reservatórios (COSTA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2015; BRASIL et al., 2016; MOURA et al., 2018).

Em comparação aos outros problemas ambientais, a salinização em ecossistemas aquáticos é pouco pesquisada, contudo com o avanço da ciência essa problemática está ganhando mais atenção (CANEDO-ARGUELLES, 2020). Apesar desse aumento nas pesquisas, poucos estudos investigam o efeito da salinidade no biovolume, crescimento e morfologia de cianobactérias. Compreender os efeitos da salinidade no fitoplâncton permite idealizar e priorizar planos de manejo para conservação dos ecossistemas aquáticos continentais. Assim, este trabalho experimental foi desenvolvido para investigar a tolerância de duas cianobactérias à salinidade. Por meio das hipóteses de que o aumento da concentração de NaCl promove a redução das concentrações de biovolume e das taxas de crescimento, além de promover alterações na morfologia das espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*, e que entre essas cianobactérias *M. aeruginosa* é mais tolerante.

1.1. Justificativas

As mudanças climáticas associadas às ações antrópicas estão promovendo um aumento na concentração de sais nos ecossistemas aquáticos de água doce. Durante anos o processo de salinização era restrito apenas as regiões áridas e semiáridas, porém já foi identificado em vários rios e lagos ao redor do mundo e merece maior atenção, pois pode gerar vários efeitos negativos nas comunidades biológicas dos corpos aquáticos continentais. Entre os efeitos é possível destacar uma diminuição da diversidade de espécies e aumento da população dos organismos tolerantes. Apesar da seriedade, a salinização é amplamente negligenciada em comparação a outros problemas ambientais.

Além do aumento da concentração de sais, os corpos aquáticos continentais das regiões tropicais são susceptíveis aos processos de florações de cianobactérias tóxicas. Pois, esses ambientes apresentam altas temperaturas e baixas precipitações reduzindo o nível de água disponível e aumentando a concentração de nutrientes (eutrofização). As cianobactérias *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* são espécies comuns em florações de corpos aquáticos tropicais de água doce. Porém, poucos trabalhos investigam como a salinidade pode afetar a morfologia, o crescimento e o biovolume dessas espécies.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido para indicar e comparar os efeitos da salinização em cianobactérias com potencial de formação de florações, como as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Esse estudo permite identificar através da tolerância como a variação de salinidade afeta as espécies e pode ser utilizado para auxiliar em projetos de controle de florações dessas cianobactérias em corpos aquáticos que estão passando pelo processo de salinização.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a tolerância entre as espécies de cianobactérias *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* quando expostas a um aumento repentino de salinidade.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os impactos da salinidade nas concentrações de biovolume das cianobactérias;
- Identificar os efeitos do aumento da salinidade na morfologia e na taxa de crescimento das cianobactérias;
- Comparar os efeitos da salinidade entre as espécies.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Culturas de Cianobactérias e tamanho das células

A cepa da espécie *Microcystis aeruginosa* (LEA-04) foi isolada do reservatório de Itumbiara, Goiás (Brasil) em 2005 e cedida pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Já a cepa de *Raphidiopsis raciborskii* (ITEP-A3) foi retirada da Barragem Riacho do Pau e fornecida pela Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), Garanhuns, Pernambuco (Brasil) (GUGGER et al., 2005). As cepas são de origem de água doce e foram cultivadas como semiculturas em frascos de erlenmeyer a 23 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), preenchidos com meio *Wright's Cryptophyte* (WC) (Apêndice 1) sob intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em um ciclo de 12:12 horas claro/escuro. Ainda é válido ressaltar que ambas as cepas estão sendo cultivadas em laboratório há anos e por várias gerações. Os cultivos foram mantidos em crescimento exponencial por meio de diluições a partir da adição de WC e agitados frequentemente para evitar a formação de aglomerados de filamentos e sombreamento.

As células da cepa de *M. aeruginosa* utilizadas no experimento possuem o formato esferoide com organização simples ou aos pares. Já as células de *R. raciborskii* se apresentam em filamentos retos ou curvos e longos.

3.2. Delineamento experimental

O experimento para verificar os efeitos da salinidade nas concentrações de biovolume, morfologia e taxa de crescimento das cianobactérias *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aquática (LAMAq), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (Brasil) em julho de 2021. Em virtude da pandemia, todas as cepas do LAMAq, inclusive, as utilizadas nesse experimento foram colocadas em um ambiente com baixa luminosidade, área sombreada e com intensidade luminosa menor do que $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para retardar a taxa de crescimento exponencial. Antes do início do experimento, ambas as cepas foram expostas gradualmente a luminosidade para retornar ao crescimento exponencial mais rápido. Para decidir o tempo de duração do experimento e a concentração inicial dos cultivos foram observadas as curvas de crescimento das espécies e a partir das informações obtidas foi possível montar um estudo experimental.

A preparação dos meios de culturas com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) ocorreu a partir da adição desse sal ao meio WC que em seguida foram esterilizados em uma autoclave vertical (Modelo AV-76, PHOENIX). A quantidade de NaCl adicionada aos tratamentos foi mensurada com o auxílio de uma balança de precisão. As salinidades nos meios de cultura foram determinadas a partir de um refratômetro no início do experimento e medidas em gramas por litro (g L^{-1}). Após a esterilização dos meios, a salinidade foi novamente medida com o auxílio do refratômetro para verificar as concentrações de NaCl e descartar uma possível evaporação dos meios de cultura.

O experimento teve duração de 12 dias e as cepas foram expostas a 3 tratamentos de salinidade: 2.5 g L^{-1} , 5 g L^{-1} , 10 g L^{-1} de NaCl e um controle (0 g L^{-1}), apenas com meio WC. Durante o experimento foram realizadas amostragens no 5º e 12º dia para analisar as concentrações de biovolume e as taxas de crescimento. Já os aspectos morfológicos foram analisados em amostras do último dia. Cada tratamento e o controle foram reproduzidos em triplicatas gerando um total de 24 erlenmeyers, com 12 frascos por espécie. Os erlenmeyers com capacidade de 125 ml foram preenchidos com 75 ml de meio WC e os cultivos foram iniciados com as concentrações de biovolume de $27674102 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ da cepa de *M. aeruginosa* e $17431455 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ da cepa de *R. raciborskii*. Todas as réplicas foram mantidas sob as mesmas condições de luz, fotoperíodo e temperaturas supracitadas (Figura 1 e 2). Durante o

experimento também foi realizado um controle qualitativo para acompanhar um possível crescimento ou aparecimento de contaminações, como fungos e flagelados.

Figura 1. Desenho experimental para verificar os efeitos do aumento da salinidade nas concentrações de biovolume, crescimento e morfologia das espécies *Microcystis aeruginosa* (MC) e *Raphidiopsis raciborskii* (RR). O experimento apresentou os seguintes tratamentos: Controle (C), salinidades de 2.5 g L^{-1} , 5 g L^{-1} e 10 g L^{-1} .

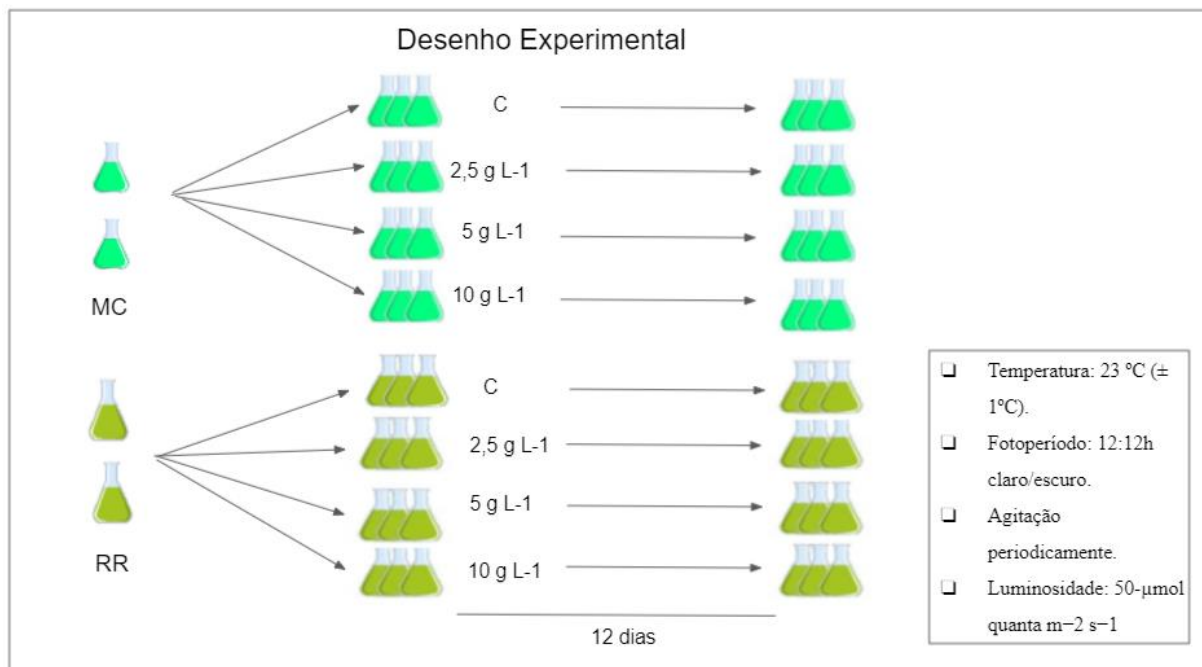


Figura 2. Delineamento experimental - O experimento foi composto por 24 frascos distribuídos aleatoriamente.

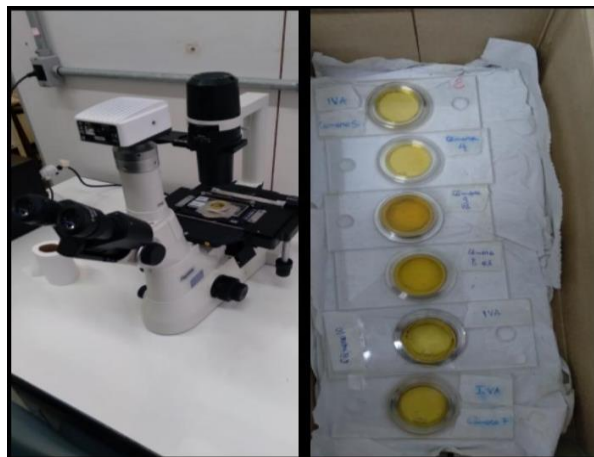


3.3. Concentração de biovolume e taxa de crescimento

Antes de iniciar as contagens e medições dos indivíduos foi necessário concentrar as amostras utilizando o método de sedimentação. A escolha da sedimentação foi baseada pelo fato de ser um dos métodos de concentrações mais confiáveis e que possibilitam a visualização das estruturas. As amostras foram preservadas utilizando lugol a 1% e adicionadas às câmaras de Utermohl com capacidade de 2 ml e 5 ml, dependendo da concentração das amostras (UTERMOHL, 1958). Para cada centímetro de amostra sedimentado foi esperado cerca de 3 horas (LUND et al., 1958; MARGALEF, 1983).

O material foi analisado com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon ECLIPSE TS-100) para determinar a densidade celular e dos filamentos. Os organismos foram quantificados através de transectos horizontais (UEHLINGER, 1964) com erro menor do que 10%, a um coeficiente de segurança de 95% (LUND et al., 1958). Houve variação no número de campos contados entre os tratamentos, assim como foi necessário realizar diluições para as amostras mais concentradas. Foi utilizada como critério a contagem de no mínimo 400 células e filamentos para ambas as cepas. Os valores das densidades foram calculados de acordo com a metodologia de Utermohl e colaboradores (1958).

Figura 3. Câmaras de sedimentação e microscópio invertido utilizados para determinar as contagens e as densidades celulares.



O biovolume individual (μm^3) das cianobactérias foi obtido a partir da transformação das células e filamentos em modelos geométricos tridimensionais com formatos semelhantes (HILLEBRAND et al., 1999). Para completar o cálculo de biovolume individual de *R. raciborskii* também foi necessário medir 40 filamentos por réplica com o auxílio de uma ocular milimetrada. Na conversão dos valores mensurados para *R. raciborskii* em comprimento real foi preciso multiplicar as unidades pelo fator de conversão 5 (Objetiva de 20X).

Para determinar as concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$), os valores de biovolume individual das células e filamentos foram multiplicados pelos valores de abundância obtidos em cada réplica. A partir das concentrações de biovolume foi possível determinar as taxas de crescimento (r) para ambas as espécies entre 0 e 5º dia, e entre 0 e 12º dia de experimento. Para isso foi utilizado à fórmula:

$$r = \ln\left(\frac{Cf}{Ci}\right)/t$$

Onde:

Cf = Concentração final

Ci = Concentração inicial

t = Tempo, em dias

3.4. Morfologia

Para a morfologia das cianobactérias foram medidos os comprimentos de 40 filamentos por réplica para a espécie *R. raciborskii*, já para *M. aeruginosa* foram medidos os diâmetros de 20 células por réplica. Ambas as medições foram realizadas com o auxílio de uma ocular milimetrada ao final do experimento (12º dia).

3.5. Análises Estatísticas

Os efeitos da salinidade nas concentrações de biovolume, morfologia e crescimento das cianobactérias foram analisados no software *R Studio* (R CORE TEAM, 2019). Antes de iniciar, os valores foram logaritmizados e analisados pelo teste de Shapiro Wilk e Levene. Todos os dados desse experimento não seguem uma distribuição normal. Para a morfologia das espécies foram analisadas as variáveis dependentes, comprimento dos filamentos para *R. raciborskii* e diâmetro das células para *M. aeruginosa*. Ambos os parâmetros morfológicos foram analisados através do teste de Kruskal Wallis e posteriormente, pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni para verificar quais tratamentos são significativamente diferentes. Já para as variáveis dependentes, concentrações de biovolume e taxas de crescimento, foram realizadas análises de GLMs - Modelos Lineares Generalizados para verificar os efeitos das concentrações de NaCl (variáveis independentes) nas espécies. Através dos GLMs também foi possível averiguar se as espécies responderam de formas distintas ou semelhantes ao aumento da salinidade e as interações entre as espécies e cada tratamento.

4. RESULTADOS

4.1. Concentração de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$)

Os resultados indicaram que conforme houve um aumento da salinidade ocorreu uma diminuição nas concentrações de biovolume e nas taxas de crescimento, além de alterações morfológicas em ambas as cianobactérias exploradas. Inclusive, *M. aeruginosa* mostrou ser mais tolerante à exposição repentina a alta salinidade em comparação à *R. raciborskii*. Outro resultado importante foi a exposição de *R. raciborskii* a salinidade de 10 g L^{-1} . Nos dois dias de amostragem (5° e 12° dia de experimento) não foram visualizados filamentos da espécie nessa salinidade, apenas fragmentos celulares.

As análises estatísticas para as concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) no 5° dia demonstraram que a salinidade de 2.5 g L^{-1} afetou negativamente ambas as espécies e esse efeito foi intensificado conforme aumentou a salinidade. Para o fator espécie, o valor de p foi igual a 0.121 indicando que no 5° dia não houve diferenças significativas entre as concentrações de biovolume para as duas espécies de cianobactérias (Tab. 1). Isto é, no geral para *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*, os valores de biovolume no 5° dia foram similares (Fig. 4). As interações entre as salinidades e espécies mostraram que nos tratamentos de 5 e 10 g L^{-1} de NaCl, as espécies reagiram de maneiras diferentes para cada concentração de salinidade (Tab. 1). Ou seja, ao comparar o controle com cada salinidade em ambas as cianobactérias, o efeito foi mais intenso em *R. raciborskii* (Fig. 4). Ao comparar o controle e a salinidade 2.5 g L^{-1} em *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*, a linha que refere-se as concentrações de biovolume para *R. raciborskii* possui uma maior velocidade de decaimento em comparação a espécie *M. aeruginosa* (Fig. 4). E o mesmo padrão ocorre ao comparar os outros tratamentos com o controle. Em ambos os dias de amostragem no tratamento de 10 g L^{-1} de NaCl não houve a formação de biovolume para a espécie *R. raciborskii* (Fig. 4 e 5).

Os resultados do GLM para as concentrações de biovolume no 12° dia indicaram que o tratamento de 2.5 g L^{-1} afetou negativamente as cianobactérias, assim como os tratamentos de 5 e 10 g L^{-1} de NaCl. Mesmo ambas as espécies sendo afetadas pelo aumento de NaCl, diferente do 5° dia, as concentrações de biovolume foram distintas entre as espécies ($p < 0.001$) (Tab. 2). Os valores das interações apontaram que no 12° dia, as espécies reagiram de maneiras diferentes nas comparações entre o controle e as concentrações de salinidade. Na interação do tratamento de 2.5 g L^{-1} e o controle, o efeito foi mais intenso na espécie *M. aeruginosa* ($p =$

0.067), pois a velocidade de decaimento da linha que representa essa espécie é maior em comparação a *R. raciborskii*. Porém, nas interações dos tratamentos com salinidade de 5 e 10 g L⁻¹ com o controle, o efeito negativo da salinidade foi mais intenso na espécie *R. raciborskii* ($p = 0.106$; $p < 0.001$, respectivamente) (Tab. 2).

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) no 5º dia para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) mostrando o efeito dos tratamentos em relação ao controle (Salinidade: 0 g L⁻¹, Espécie: *R. raciborskii*).

Fator	Estimate	Standard Erro	p
(Intercept)	19.1492	0.1359	<0.001
Salinidade 2.5	-0.6740	0.1921	0.002
Salinidade 5	-1.5880	0.1921	<0.001
Salinidade 10	-3.1490	0.1921	<0.001
Espécie RR	-0.3146	0.1921	0.121
Salinidade 2.5*Espécie RR	-0.4399	0.2717	0.125
Salinidade 5* Espécie RR	-2.3551	0.2717	<0.001
Salinidade 10*Espécie RR	-15.6856	0.2717	<0.001

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) no 12º dia para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) mostrando o efeito dos tratamentos em relação ao controle (Salinidade: 0 g L⁻¹, Espécie: *R. raciborskii*).

Fator	Estimate	Standard Erro	p
(Intercept)	20.0425	0.1650	<0.001
Salinidade 2.5	-0.8340	0.2334	<0.001
Salinidade 5	-2.3104	0.2334	<0.001
Salinidade 10	-3.0837	0.2334	<0.001
Espécie RR	-2.7033	0.2334	<0.001
Salinidade 2.5*Espécie RR	0.6478	0.3301	0.067
Salinidade 5* Espécie RR	-0.5638	0.3301	0.106
Salinidade 10*Espécie RR	-14.2554	0.3301	<0.001

Figura 4. Médias das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) encontradas no 5º dia de experimento para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Resultados com intervalo de confiança de 95%.

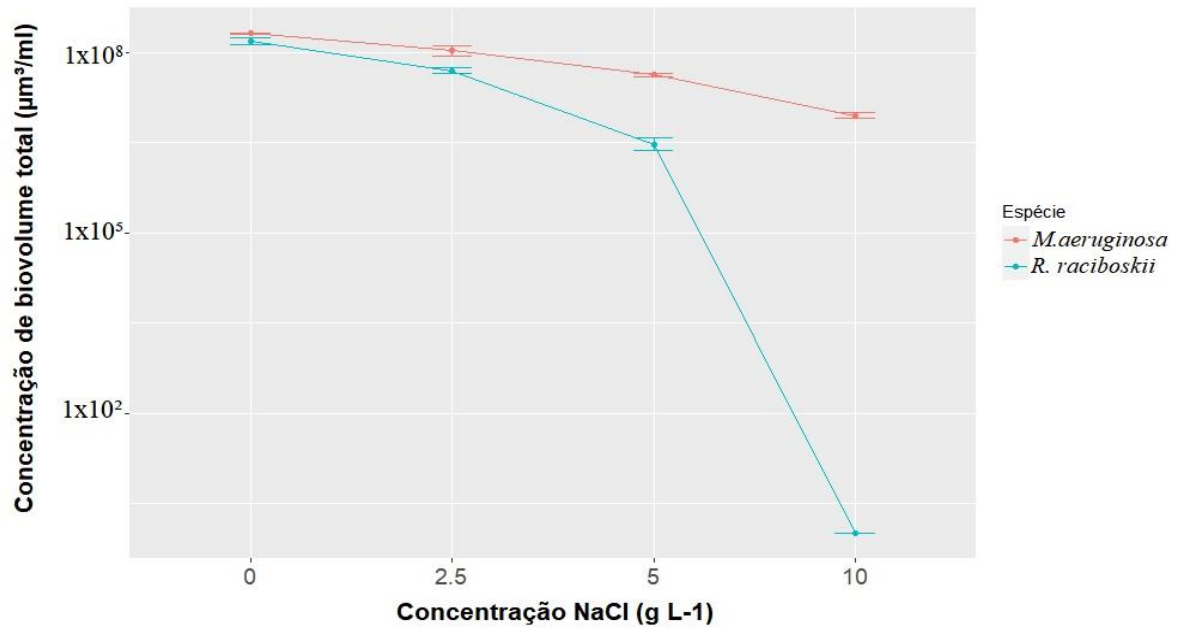
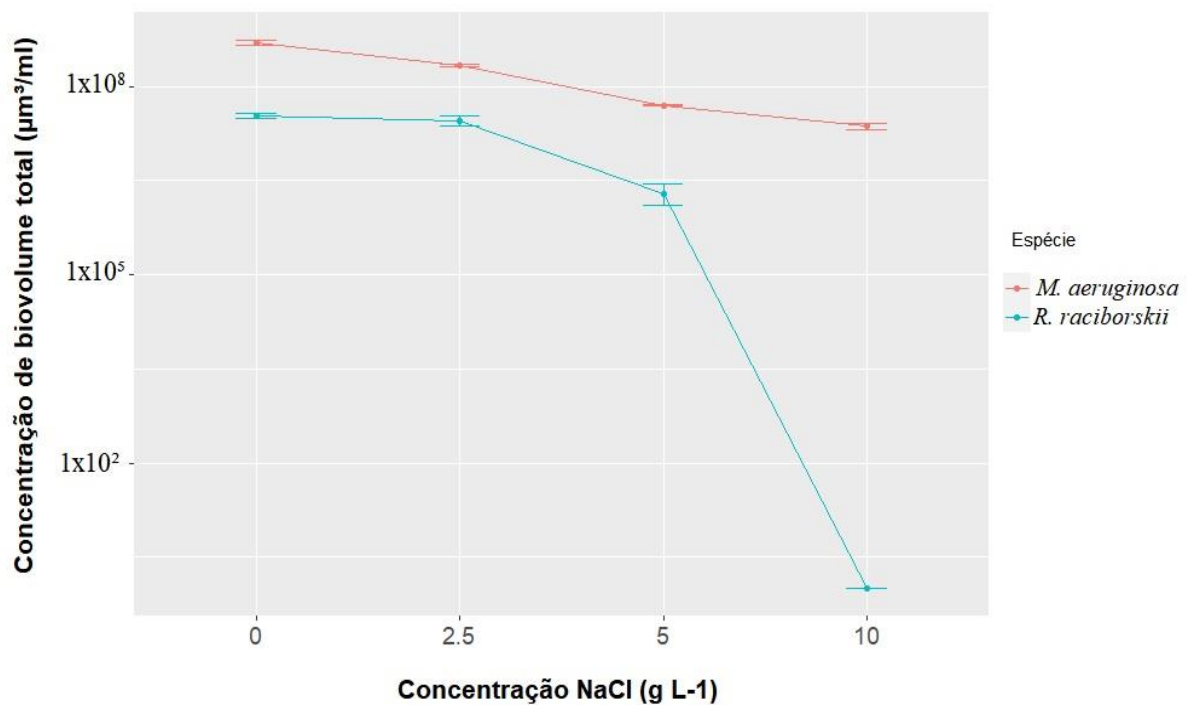


Figura 5. Médias das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) encontradas no 12º dia de experimento para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Resultados com intervalo de confiança de 95%.



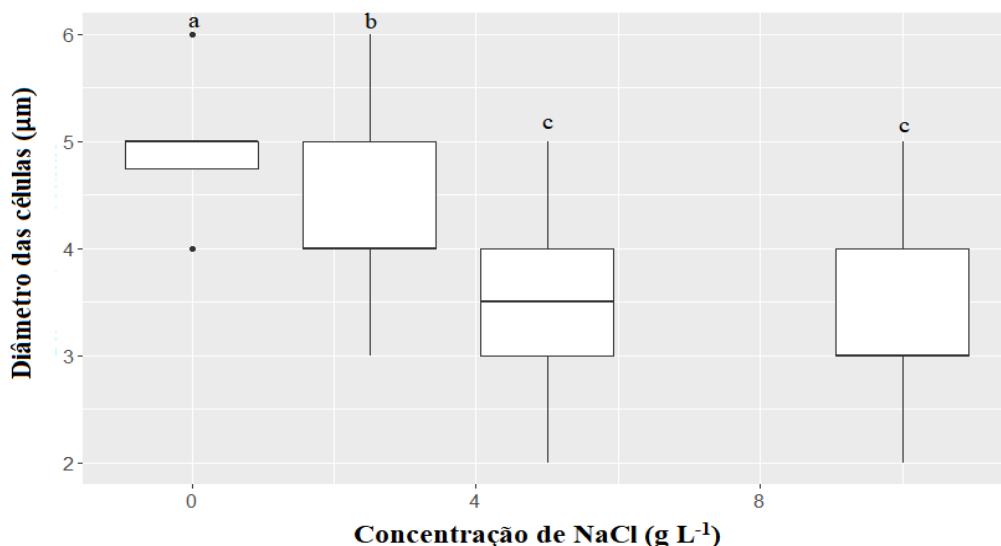
4.2. Morfologia

O diâmetro médio das células de *M. aeruginosa* ($n = 60$) foi inversamente proporcional ao aumento de salinidade, com a maior média no controle e a menor no tratamento de 10 g L^{-1} , indicando que a salinidade teve um efeito negativo no tamanho celular. A diminuição do diâmetro médio das células ocorreu a partir do tratamento de 2.5 g L^{-1} . O teste de Kruskal Wallis indicou diferenças significativas nas médias dos diâmetros das células de *M. aeruginosa* entre os tratamentos ($p < 0.001$) (Tab. 3). E o teste de Dunn mostrou que entre as concentrações de 5 g L^{-1} e 10 g L^{-1} não houve diferenças significativas (Fig. 6).

Tabela 3. Resumo dos testes de Kruskal Wallis utilizados para identificar diferenças entre as dimensões médias das células (μm) de *M. aeruginosa* e os comprimentos dos filamentos (μm) de *R. raciborskii* nos tratamentos ao final do experimento.

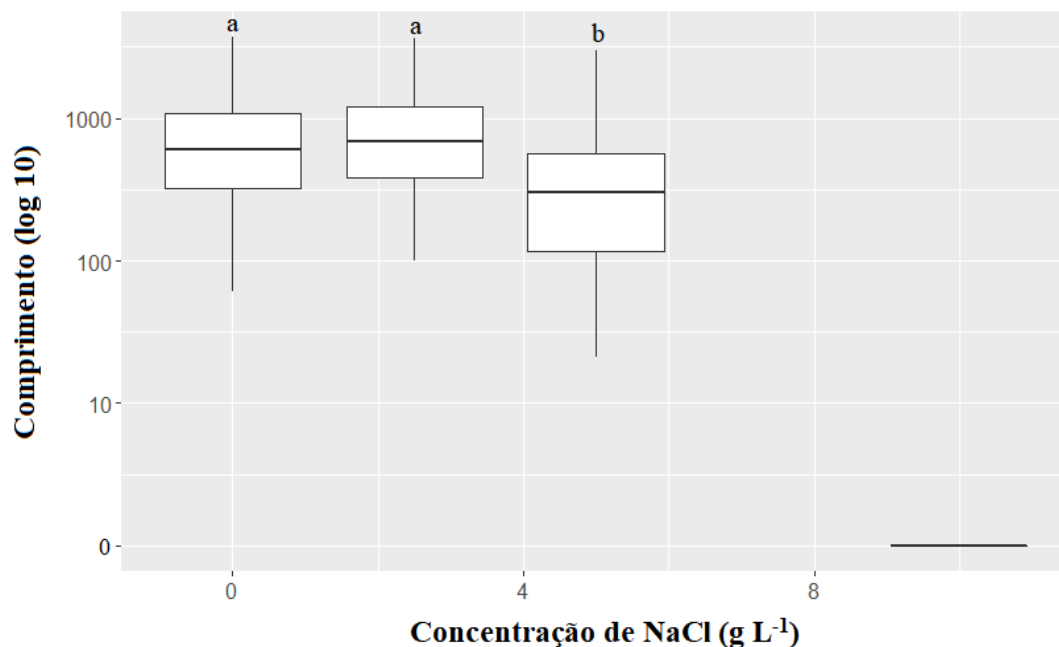
Fator	Df	X^2	p
Diâmetro das células – MC	3	121.97	<0.001
Comprimentos dos filamentos - RR	3	191.93	<0.001

Figura 6. Diagrama de caixas (boxplot) mostrando a mediana, os valores máximos e mínimos, além do primeiro e terceiro quartil dos diâmetros das células de *M. aeruginosa* (μm) ($n = 60$). Erro padrão com intervalo de confiança de 95% ($n = 60$). As letras indicam diferenças significativas entre o controle e os tratamentos de acordo com o teste de Dunn.



O comprimento médio dos filamentos de *R. raciborskii* no controle e nas salinidades de 2.5, 5 e 10 g L⁻¹ de NaCl foram 788, 838, 417 e 0 μm, respectivamente (n = 120 por salinidade). Os resultados apresentaram um discreto aumento no tratamento de 2.5 g L⁻¹ no comprimento dos filamentos (Fig. 7). Porém, a partir da concentração de 5 g L⁻¹ ocorre uma diminuição do comprimento dos filamentos e no tratamento de 10 g L⁻¹ os filamentos não são observados mostrando um efeito deletério dessa concentração na espécie *R. raciborskii* (Fig. 7). O teste de Kruskal Wallis mostrou que as médias dos tratamentos são diferentes ($p < 0.001$) (Tab. 3). Já o teste post-hoc de Dunn indicou que a média do controle e do tratamento 2.5 g L⁻¹ não diferem significativamente, mas ao comparar o tratamento de 2.5 g L⁻¹ com o de 5 g L⁻¹ existem diferenças ($p < 0.001$) (Fig. 7).

Figura 7. Diagrama de caixas (boxplot) mostrando a mediana, os valores máximos e mínimos, além do primeiro e terceiro quartil dos comprimentos dos filamentos de *R. raciborskii* (μm). Erro padrão com intervalo de confiança de 95% (n = 120).



Outro resultado importante e verificado nos primeiros dias após o início do experimento, por meio de análises visuais, foi a presença de aglomerados macroscópicos de células nos tratamentos com as concentrações de 2.5, 5 e 10 g L⁻¹ de NaCl da cianobactéria *M. aeruginosa*. Os controles dessa espécie apresentaram uma coloração homogênea dos cultivos (Fig. 8). Ao término do experimento foram constatadas diferenças na coloração entre os tratamentos da cianobactéria *M. aeruginosa*. Os frascos do controle apresentaram uma forte coloração esverdeada que foi clareando conforme houve o aumento da salinidade (Fig. 9). Já para *R. raciborskii* não houve diferenças de coloração entre os tratamentos.

Figura 8. Formação de aglomerados macroscópicos nos tratamentos com salinidade 2.5, 5 e 10 g L⁻¹ da espécie *M. aeruginosa*.

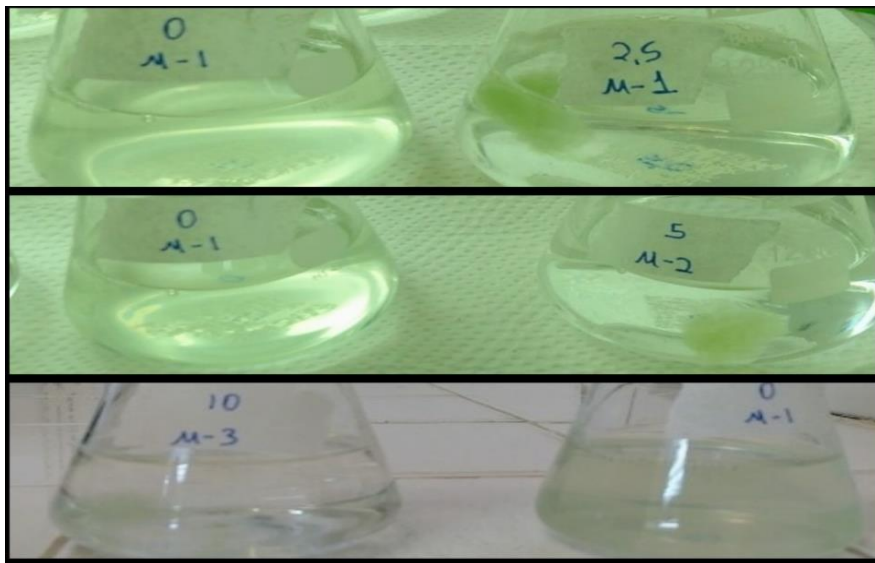
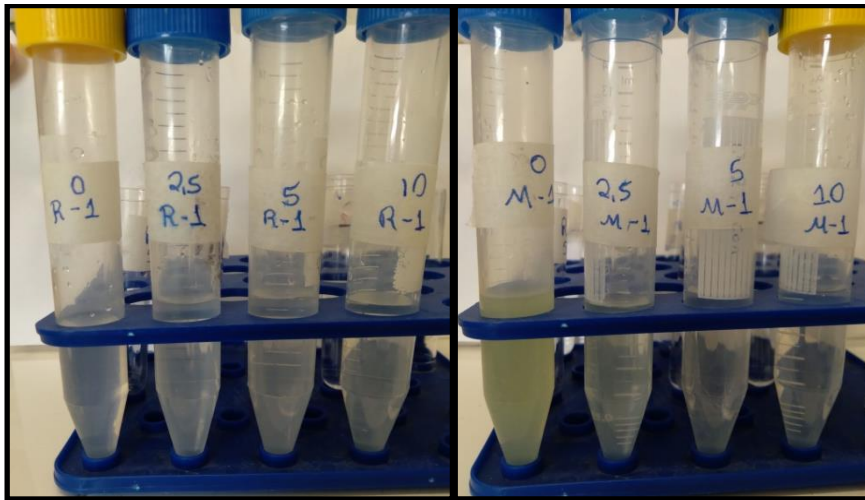


Figura 9. Alterações na coloração entre os tratamentos ao final do experimento.



4.3. Taxa de crescimento – r

As análises do GLM para as taxas de crescimento no 5º dia apontaram que a concentração de 2.5 g L^{-1} de NaCl afetou de forma negativa as espécies e conforme houve o aumento da salinidade o efeito negativo é intensificado. O fator espécie mostrou que a taxa de crescimento foi semelhante para as duas espécies, pois não houve diferenças significativas ($p = 0.146$) (Tab. 4). Os resultados das interações entre as salinidades e os tratamentos para o 5º dia indicaram que os efeitos da salinidade foram similares entre o controle e a salinidade de 10 g L^{-1} para as duas espécies (Tab. 4). Já as comparações entre o controle e as salinidades de 2.5 e 5 g L^{-1} evidenciaram um efeito mais intenso em *R. raciborskii* nas duas situações (Tab. 4 e Fig. 10). Para a espécie *R. raciborskii*, ao observar os valores do controle e dos tratamentos 2.5 e 5 g L^{-1} é possível constatar uma maior velocidade de decaimento em comparação a *M. aeruginosa* (Fig. 10). As maiores taxas de crescimento foram obtidas no controle e as menores no tratamento de 10 g L^{-1} (Fig. 10). Além do mais, para *R. raciborskii* o crescimento é interrompido a partir do tratamento de 5 g L^{-1} , enquanto para *M. aeruginosa* é a partir da concentração de 10 g L^{-1} (Fig. 10).

As taxas de crescimento das cianobactérias no 12º dia mostraram que conforme existiu uma mudança de tratamento e aumento da salinidade houve um forte efeito negativo. Porém, no 12º dia as espécies apresentaram taxas de crescimento diferentes ($p < 0.001$) (Tab. 5). Os resultados das interações obtidas no GLM indicaram que os efeitos da salinidade foram mais severos na espécie *M. aeruginosa*, ao comparar todos os tratamentos com o controle (Tab. 5).

A taxa de crescimento de *M. aeruginosa* apresentou uma velocidade de decaimento maior em comparação a espécie *R. raciborskii* (Fig. 11). No 12º dia, os crescimentos para ambas as espécies foram interrompidos nos mesmos tratamentos observados no 5º dia. Porém, a taxa de crescimento de *R. raciborskii* foi menor do que em *M. aeruginosa* em todas as salinidades, inclusive no controle (Fig. 11).

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) no 5º dia de experimento.

Fator	Estimate	Standard Erro	<i>p</i>
(Intercept)	0.33835	0.01525	<0.001
Salinidade 2.5	-0.10199	0.02157	<0.001
Salinidade 5	-0.25689	0.02157	<0.001
Salinidade 10	-0.33835	0.02157	<0.001
Espécie RR	0.03294	0.02157	0.146
Salinidade 2.5*Espécie RR	-0.07286	0.03050	0.029
Salinidade 5* Espécie RR	-0.11440	0.03050	<0.001
Salinidade 10*Espécie RR	-0.03294	0.03050	0.296

Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos a partir do GLM das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* (MC) e *R. raciborskii* (RR) no 12º de experimento.

Fator	Estimate	Standard Erro	<i>p</i>
(Intercept)	0.216848	0.006747	<0.001
Salinidade 2.5	-0.057551	0.009541	<0.001
Salinidade 5	-0.168346	0.009541	<0.001
Salinidade 10	-0.216244	0.009541	<0.001
Espécie RR	-0.163097	0.009541	<0.001
Salinidade 2.5*Espécie RR	0.043156	0.013493	0.005
Salinidade 5* Espécie RR	0.114595	0.013493	<0.001
Salinidade 10*Espécie RR	0.162493	0.013493	<0.001

Figura 10. Médias das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* no 5º dia de experimento ao serem expostas aos tratamentos de salinidade (g L^{-1}). Barras de erro com intervalo de confiança de 95%.

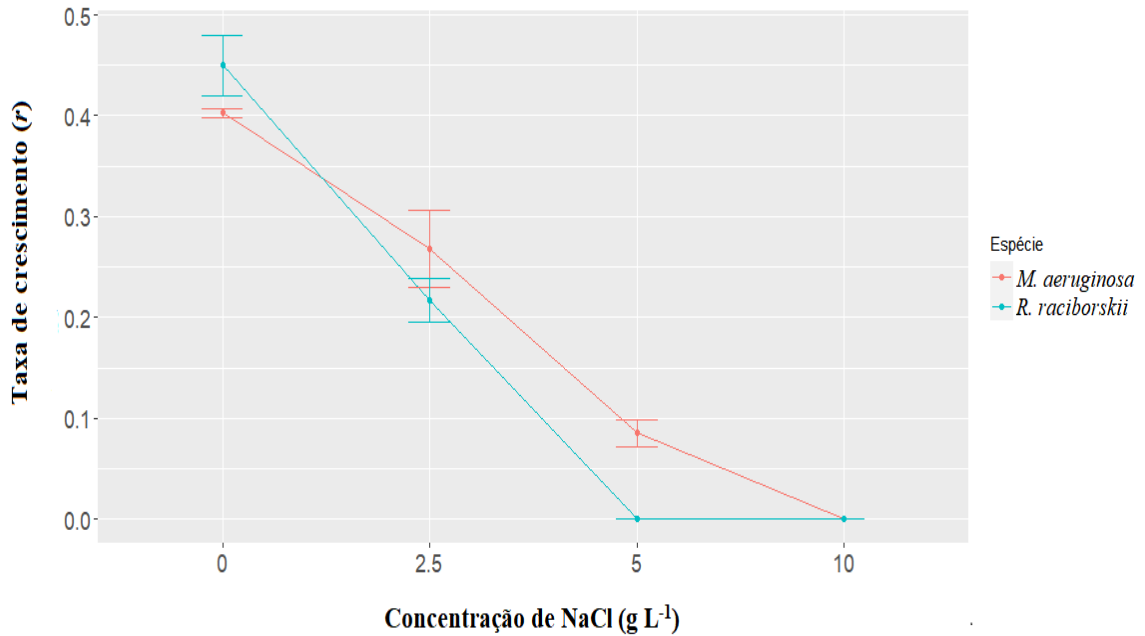
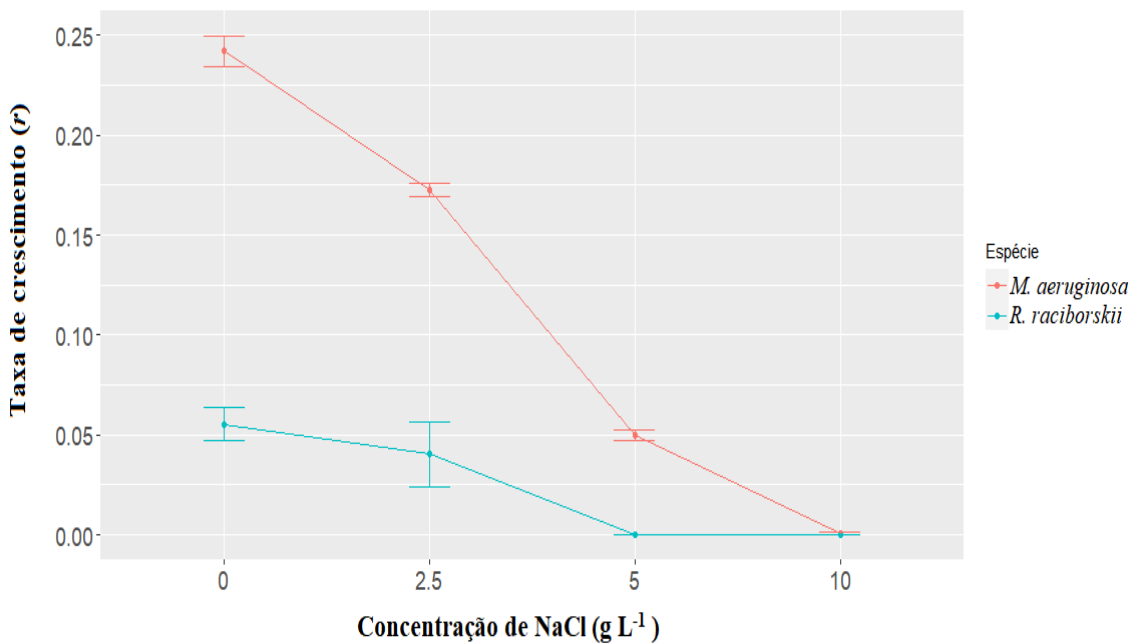


Figura 11. Médias das taxas de crescimento (r) para as espécies *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* no 12º dia de experimento ao serem expostas aos tratamentos de salinidade (g L^{-1}). Barras de erro com intervalo de confiança de 95%.



5. DISCUSSÃO

Apesar de *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* estarem associadas ao processo de florações em ambientes de água doce, este experimento indicou que as cepas utilizadas podem apresentar uma tolerância a ambientes com diferentes concentrações de NaCl. No geral, a salinidade exerceu um efeito negativo em todos os parâmetros utilizados no experimento: taxa de crescimento, concentração de biovolume e morfologia. Contudo, as cianobactérias responderam de formas diferentes ao aumento da concentração de NaCl. Enquanto, *M. aeruginosa* tolerou entre 0 e 10 g L⁻¹, *R. raciborskii* conseguiu se desenvolver entre 0 e 5 g L⁻¹ apontando a espécie do gênero *Microcystis* como mais tolerante.

As análises das concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) e taxa de crescimento (r) a partir do 5º dia de experimento mostraram que tanto para *R. raciborskii* como para *M. aeruginosa*, houve uma diminuição dos valores indicando que ambas as espécies são afetadas negativamente pelo aumento da concentração de NaCl. Porém, as interações dos GLMs para ambos os parâmetros confirmam que no 5º dia, os efeitos foram mais intensos em *R. raciborskii* por meio de comparações entre os controles e os tratamentos. No 12º dia, os resultados apontaram que as espécies responderam de formas distintas, ou seja, os valores para as concentrações de biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) e taxa de crescimento (r) foram diferentes entre as espécies. E as interações entre as espécies e as salinidades presentes no GLM para as concentrações de biovolume indicaram que no 12º dia o efeito da salinidade foi mais intenso em *R. raciborskii*. As interações para as taxas de crescimento encontradas no GLM apontaram que no 12º dia foi observado um efeito negativo mais intenso em *M. aeruginosa*. Esse efeito obtido na taxa de crescimento do 12º dia estava associado ao fato dos valores de crescimento para a espécie *R. raciborskii* estarem baixos, mesmo no controle, indicando que os cultivos já haviam passado da fase de crescimento exponencial e estavam em decaimento.

O aumento da salinidade já foi apontado como um processo que não estimula o crescimento de *M. aeruginosa* (TONK et al., 2007). Inclusive, a taxa de crescimento dessa espécie pode ser afeta pela salinidade de diferentes maneiras de acordo com a origem da cepa. Georges Des Aulnois e colaboradores (2020) indicaram em seu trabalho de condutividade com *M. aeruginosa* que o efeito de choque salino na taxa de crescimento para a cepa de água doce promoveu uma diminuição significativa a partir da salinidade de 3,4, enquanto a cepa de água salobra foi a partir da salinidade de 8,4. A baixa concentração de nitrogênio nos cultivos já foi indicada como um fator que favorece o aumento da tolerância de *M. aeruginosa*, pois permite

o acúmulo de carboidratos diminuindo os danos causados as células pelo estresse salino (LI et al., 2021). Os resultados encontrados no presente estudo, junto a outros trabalhos, apontam a variabilidade intraespecífica e os mecanismos evolutivos como fatores-chave para explicar os diferentes valores de tolerância de *M. aeruginosa* à salinidade (GEORGES DES AULNOIS et al., 2020). A exposição de *M. aeruginosa* ao estresse salino além de promover um retardo no crescimento e mudanças na morfologia, é responsável por alterar a transcrição de vários genes, inibir a fotossíntese e o transporte de elétrons. Assim como, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos à membrana das células e permite a liberação de toxinas para os corpos aquáticos (CHEN et al., 2015). A produção e o acúmulo de ROS também foi observado em *R. raciborskii* quando exposto a um aumento na concentração de NaCl (HOULIEZ et al., 2021).

A taxa de crescimento para a espécie *R. raciborskii* também decresceu a partir da salinidade de 2.5 g L⁻¹ e nos tratamentos com 5 e 10 g L⁻¹ de NaCl a taxa de crescimento foi igual a zero. Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo, o qual indica a tolerância de uma cepa de regiões temperadas de *R. raciborskii* a concentrações de até 4 g L⁻¹ de NaCl e em concentrações maiores do que esse valor, a taxa de crescimento é interrompida (MOISANDER, MCCLINTON e PAERL, 2002). Houliez e colaboradores (2021) evidenciaram em seu trabalho que o aumento na concentração de NaCl promoveu uma diminuição na taxa de crescimento. A ausência de filamentos no tratamento de 10 g L⁻¹ de NaCl corrobora a ideia de que *R. raciborskii* não tolera grandes salinidades e possuem preferência por ambientes com baixa concentração de sais (PADISAK, 1997). Ainda é válido ressaltar que este é um dos poucos trabalhos que relatam o efeito do aumento da concentração de NaCl em uma cepa de *R. raciborskii* em regiões tropicais. Porém, Calandrino e Paerl (2011) demonstraram que *R. raciborskii* é capaz de tolerar até a salinidade de 8 quando adicionados nutrientes ao meio de cultura. Os trabalhos citados reforçam que também existe uma variação de tolerância dentro da espécie *R. raciborskii* e que condições abióticas podem influenciar nesse processo. *R. raciborskii* mostrou ser menos tolerante em comparação a outras cianobactérias fixadoras de N₂, como *Anabaena aphanizomenoides* e *Anabaenopsis sp.*, espécies estuarinas capazes de crescer em ambientes com salinidade de 15 e 20 g L⁻¹ de NaCl, respectivamente (MOISANDER, MCCLINTON e PAERL, 2002).

A formação dos aglomerados macroscópicos observados em *M. aeruginosa* é um indicativo do início da produção de mucilagem motivado pelas mudanças de concentrações de sais no meio de cultura. Para essa espécie, a mucilagem é fundamental para a formação das

colônias (KESSEL E ELOFF, 1975) processo que está associado a mecanismos de proteção das células a dessecação e a predação pelo zooplâncton (FULTON e PAERL, 1987; ESTEVES, 1998). As colorações observadas ao final do experimento são indicativos da fase de crescimento que os cultivos se encontravam. As culturas com coloração esverdeada apontavam crescimento exponencial, enquanto que os cultivos mais claros mostravam que as cepas estão com valores baixos de crescimento. Esses dados estavam de acordo com os valores encontrados para as concentrações de biovolume e taxa de crescimento no 12º dia de experimento.

Nos parâmetros morfológicos, o diâmetro médio das células (μm) de *M. aeruginosa* começou a diminuir a partir da salinidade de 2.5 g L^{-1} . Diminuições celulares já foram registradas em *M. aeruginosa* após estresse salino (TONK et al., 2007; GEORGES DES AULNOIS et al., 2019). O aumento na concentração de sais no meio externo fez com que as células não conseguissem manter o turgor (formato celular) e o líquido no interior atravessasse a membrana por osmose (TONK et al., 2007). A redução do diâmetro celular em virtude da pressão osmótica é conhecida como plasmólise.

Outro resultado do experimento que pode estar associado à plasmólise é o comprimento dos filamentos de *R. raciborskii*. Os filamentos são formados por um conjunto de células enfileiradas e o processo de plasmólise causado pelo aumento da concentração de NaCl nos meios de cultura pode resultar na saída de soluto e diminuição das células ocasionando o encurtamento dos filamentos. Porém, esse efeito é pouco compreendido em *R. raciborskii* e merece uma maior discussão, válido que o tamanho dos filamentos é um dos fatores que influencia na capacidade de herbivoria do zooplâncton (WEBSTER e PORTER, 1978). Outra preocupação relacionada à lise celular das cianobactérias é a liberação de toxinas para o meio e como o estresse salino pode afetar a produção, pois essas substâncias podem chegar às fontes de água para consumo ou até mesmo em regiões costeiras e impactar a vida dos animais aquáticos e a saúde humana (LANDSBER, 2002; RAMOS et al., 2021).

O efeito negativo da salinidade não é exclusivo apenas as cianobactérias. A exposição de rotíferos e cladóceros de água doce à salinidade maior que 5 g L^{-1} impossibilita a sobrevivência e reprodução desses organismos (SARMA et al., 2006). Associado a esse processo, a diminuição do zooplâncton gera um efeito positivo no fitoplâncton possibilitando o aumento de biomassa (MOFFETT et al., 2021). A tolerância observada em *M. aeruginosa* nas maiores concentrações de NaCl e o desaparecimento de *R. raciborskii* sob as mesmas condições mostram uma das consequências da salinização em condições naturais, a

sobrevivência de organismos tolerantes e uma perda da diversidade de espécies nos corpos aquáticos continentais (BROCK, NIELSEN e CROSSLÉ, 2005; SARMA et al., 2006; BEATTY et al., 2011; JEPPESEN et al., 2015). Desse modo, o processo de salinização ocasionado pelas ações antrópicas e mudanças climáticas promovem efeitos negativos na ecofisiologia e na diversidade das espécies.

Para aumentar a compreensão dos efeitos da salinidade nessas espécies, trabalhos futuros podem investigar como a salinidade afeta a produção de toxinas, assim como verificar a capacidade de adaptação das espécies. Os estudos também podem averiguar se a adição de outros elementos, como fósforo e nitrogênio, ao meio de cultivo alteram o nível de tolerância. No entanto, sugere-se repetir este experimento em duas situações, quando a cepa de *R. raciborskii* estiver saudável e adaptada a luz alta, além de utilizar outros sais para investigar os efeitos do aumento da salinidade nas cianobactérias. Assim, será possível obter resultados semelhantes aos encontrados nos ambientes naturais. A compreensão desses mecanismos possibilita o desenvolvimento de programas de manejo e monitoramento dessas alterações nos ecossistemas presentes em rios, lagos e reservatórios.

Esse foi um dos primeiros estudos a comparar o efeito da salinidade em duas cianobactérias com capacidade de formação de florações. No geral, os resultados do experimento mostram evidências que em ecossistemas aquáticos de água doce, onde o processo de salinização está presente, ambas as cianobactérias são afetadas pelo aumento da concentração de NaCl, contudo a espécie *M. aeruginosa* é mais tolerante do que *R. raciborskii*. Além do mais, compreender como essas espécies lidam com o aumento da salinidade permite prever e determinar o potencial de se desenvolver e expandir em áreas semiáridas e áridas, regiões que estão aumentando em virtude das mudanças climáticas e ações antrópicas. Assim como, auxiliar em projetos de manejo em áreas que essas duas espécies coocorrem sob efeito da salinidade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados apresentados é possível inferir que a salinidade afeta negativamente as concentrações de biovolume, a taxa de crescimento e a morfologia das cianobactérias *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. Entre esses efeitos é possível destacar a diminuição no tamanho dos filamentos e das células para *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*, respectivamente, conforme aumenta as concentrações de NaCl nos tratamentos. Outro resultado observado para ambas as cianobactérias foi que valores crescentes de NaCl promoveram uma diminuição nos valores do biovolume e da taxa de crescimento no meio e ao final do trabalho. No tratamento de 10 g L⁻¹ de NaCl não houve a presença de filamentos da espécie *R. raciborskii*. Além do mais, entre as cianobactérias, *M. aeruginosa* tolerou até a salinidade de 10 g L⁻¹ apontando que essa espécie é mais tolerante em comparação a *R. raciborskii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, J.T., LEÃO, P.N. e VASCONCELOS, V.M. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 473, 2015.
- BALDWIN, D. S. *et al.* The short-term effects of salinization on anaerobic nutrient cycling and microbial community structure in sediment from a freshwater wetland. **Wetlands**, v. 26, p. 455-464, 2006.
- BEATTY, S. *et al.* Salinity tolerances of endemic freshwater fishes of south-western Australia: Implications for conservation in a biodiversity hotspot. **Marine and Freshwater Research**. v. 62, p. 91-100, 2011.
- BEZIRCI, G. *et al.* Impacts of salinity and fish-exuded kairomone on the survival and macromolecular profile of *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology** (London, England), n. 21, p. 601-614, 2012.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. *et al.* Seasonal dynamics of cyanobacteria in a eutrophic reservoir (Arcoverde) in a semi-arid region of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 533-544, 2012.
- BRASIL, J. *et al.* Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes. **Hydrobiologia**. v. 770, p.145–164, 2016.
- BROCK, M.A., NIELSEN, D.L., CROSSLÉ, K. Changes in biotic communities developing from freshwater wetland sediments under experimental salinity and water regimes. **Freshwater Biology**, v. 50, n. 8, p. 1376-1390, 2005.
- BRIAND, J. F. *et al.* *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming?. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 231-238, 2004.
- CALANDRINO, E. S. e PAERL, H. W. Determining the potential for the proliferation of the harmful cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Currituck Sound, North Carolina, **Harmful Algae**, v. 11, p. 1-9, 2011.
- CAÑEDO-ARGUELLES, M. A review of recent advances and future challenges in freshwater salinization, **Limnetica**, v. 39, n. 1, p. 185-218, 2020.
- CHAKRABORTY, P. *et al.* Impact of salinity and pH on phytoplankton communities in a tropical freshwater system: An investigation with pigment analysis by HPLC. **J Environ Monit**. v. 13, n. 3, p. 614-620, 2011.
- CHEN, L. *et al.* Changes in metabolites, antioxidant system, and gene expression in *Microcystis aeruginosa* under sodium chloride stress. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 122, p. 126–135, 2015.

COSTA, M.R.A., ATTAYDE, J.L., BECKER, V. Effects of water level reduction on the dynamics of phytoplankton functional groups in tropical semiarid shallow lakes. **Hydrobiologia**, v. 778, p. 75-89, 2016.

COSTA, I.A.S. *et al.* Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. **Oecologia Australis**, v. 13, p. 382-401, 2009.

DELAUNE, K. D. *et al.* Impacts of salinization on aquatic communities: Abrupt vs. gradual exposures, **Environmental Pollution**, v. 285, 2021.

DUGAN, H. A. *et al.* Salting our freshwater lakes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 114, p. 4453–4458, 2017.

DUVAL, C. *et al.* Phylogeny and salt-tolerance of freshwater Nostocales strains: contribution to their systematics and evolution, **Harmful Algae**, v. 73, p. 58-71, 2018.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Interciência, Rio de Janeiro. 1998.

FULTON, R. S. e PAERL, H. W., Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 9, p. 837-855, 1987.

GEORGES DES AULNOIS, M. *et al.* Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of *Microcystis aeruginosa* Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 85, n. 21, 2019.

GEORGES DES AULNOIS, M. *et al.* Salt Shock Responses of *Microcystis* Revealed through Physiological, Transcript, and Metabolomic Analyses. **Toxins**, v. 12, n. 192, 2020.

GIORGI, F. e LIONELLO, P. Climate change projections for the Mediterranean region. **Global and Planetary Change**, v. 63, p. 90-104, 2007.

GUGGER, M. *et al.* Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 2, p. 1097-1100, 2005.

HARKE, J. M. *et al.* A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4-20, 2016.

HART, B.T. *et al.* A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. **Hydrobiologia** v. 210, p. 105–144, 1991.

HILLEBRAND, H. *et al.* Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**. v. 35, p. 403–424, 1999.

HINTZ, W. D. *et al.* Salinization triggers a trophic cascade in experimental freshwater communities with varying food-chain length. **Ecol Appl**, v. 27, p. 833-844, 2017.

- HINTZ, W.D., RELYEA, R.A., A review of the species, community, and ecosystem impacts of road salt salinisation in fresh waters. **Freshwater Biol.** v. 64, p. 1081– 1097, 2019.
- HOULIEZ, E *et al.* Physiological changes induced by sodium chloride stress in *Aphanizomenon gracile*, *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Dolichospermum* sp., **Harmful Algae**, v. 103, 2021.
- HUANG, J., GUAN, X., JI, F.: Enhanced cold-season warming in semi-arid regions, **Atmos. Chem. Phys.**, v. 12, p. 5391–5398, 2012.
- JEPPESEN, E. *et al.* Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. **Hydrobiologia**, v. 750, p. 201–227, 2015.
- KAUSHAL, S. S. *et al.* Freshwater salinization syndrome on a continental scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 115, n. 4, p. 574-583, 2018.
- KAUSHAL, S. S. *et al.* Freshwater salinization syndrome: from emerging global problem to managing risk. **Biogeochemistry**, v. 154, p. 255-292, 2021.
- KESSEL, M., ELOFF, J.N. The ultrastructure and development of the colonial sheath of *Microcystis marginata* . **Arch. Microbiol.** v. 106, p. 209–214, 1975.
- LANDSBERG, H. J. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms, **Reviews in Fisheries Science**, v.10, n. 2, p. 113-390, 2002.
- LI, L. *et al.* The salt tolerance of the freshwater cyanobacterium *Microcystis* depends on nitrogen availability. **Science of The Total Environment**. v.777, 2021.
- LIND, L. *et al.* Salty fertile lakes: how salinization and eutrophication alter the structure of freshwater communities. **Ecosphere**. v. 9, 2018.
- LUND, J.W.G., KIPLING, C., LECREN, E.D. The invert microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiologia**. v.11, p.143-170. 1958.
- MARGALEF R. **Limnologia**. Barcelona, Editora Omega, 1983.
- MEDEIROS, L. C. *et al.* Is the future blue-green or brown? The effects of extreme events on phytoplankton dynamics in a semi-arid man-made lake. **Aquatic Ecology**. v. 49, p. 293–307, 2015.
- MOFFETT, E.R. *et al.* Cascading effects of freshwater salinization on plankton communities in the Sierra Nevada. **Limnol Oceanogr**. 2021.
- MOISANDER, P., MCCLINTON, E., PAERL, H. Salinity Effects on Growth, Photosynthetic Parameters, and Nitrogenase Activity in Estuarine Planktonic Cyanobacteria. **Microbial ecology**, v.43, p. 432-442, 2002.

- MOURA, A. N. *et al.* Cyanobacterial blooms in freshwater bodies from a semiarid region, Northeast Brazil: A review. **Journal of Limnology**. v. 77, n. 2, p. 179-188, 2018.
- NIELSEN, D.L. *et al.* The effects of salinity on aquatic plant germination and zooplankton hatching from two wetland sediments. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 2214-2223, 2003.
- PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv fur Hydrobiology**, v.107, n.4, p. 563-593, 1997.
- PAERL, H. W., HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**, v. 320, p. 57-58, 2008.
- R CORE TEAM (2019). **R Studio**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
Acesso em: 14. Mai. 2021.
- ROCHA JUNIOR, C. A. N. D. *et al.* Water volume reduction increases eutrophication risk in tropical semi-arid reservoirs. **Acta Limnologica Brasiliensia**, [S.L.], v. 30, p. 1-10, 2018.
- RAMOS, T. K., *et al.* Saxitoxins from the freshwater cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* can contaminate marine mussels, **Harmful Algae**, v. 103, 2021.
- ROSS, C. *et al.* Mesohaline conditions represent the threshold for oxidative stress, cell death and toxin release in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquat. Toxicol.** v. 206, p. 203–211, 2019.
- SARMA, S.S.S. *et al.* Effects of NaCl salinity on the population dynamics of freshwater zooplankton (rotifers and cladocerans). **Aquat Ecology**, v. 40, n. 349, 2006.
- SEREDA, J. *et al.* Climate warming and the onset of salinization: Rapid changes in the limnology of two northern plains lakes, **Limnologia**, v. 41, p. 1-9, 2011.
- TONK, L. *et al.* Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquati. Microb. Ecol.** v. 46, p. 117–123, 2007.
- UEHLINGER, V., Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Arch. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 121-123, 1964.
- UN EMG. **Global drylands: A UN system-wide response**. Geneva, Switzerland: UN Environment Programme, 2011.
- UTERMOHL, H. Zur Vollkommenheit der quantitativen phytoplankton-methodik. **Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilung**, v. 9, n.1, p. 1-38, 1958.
- VERSPAGEN, J.M.H. *et al.* Water Management Strategies Against Toxic *Microcystis* Blooms In The Dutch Delta. **Ecological Applications**, v. 16, p. 313-327, 2006.

WEBSTER, K. E., PETERS, R, H., Some size-dependent inhibitions of larger cladoceran filterers in filamentous suspensions, **Limnology and Oceanography**, v. 23, n. 6, p. 1238-1245, 1978.

WILCOX, D. A. The effects of NaCl deicing salts on *Sphagnum recurvum* P. beauv., **Environmental and Experimental Botany**, v. 24, n. 4, p. 295-304, 1984.

WILLIAMS, W. Anthropogenic Salinisation of Inland Waters. **Hydrobiologia**. v. 466. p. 329-337, 2001.

WILLIAMS, W. Environmental threats to salt lakes and the likely status of inland saline ecosystems in 2025. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 2, p. 154-167, 2002.

ZURAWELL, R. *et al.* Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v.8, p.1-37, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Protocolo WC

Materiais necessários:

- Água Milli-Q;
 - Reagentes;
 - Álcool;
 - Pipeta automática 1000 μ l;
 - Ponteiras de 1 ml.
- 24 horas antes de fazer o WC autoclavar às ponteiras e preencher os barris de 2 litros com água Milli-Q.
- Antes de iniciar a preparação, limpar a bancada com álcool e organizar os reagentes, as ponteiras e os barris com água Milli-Q.
- São 9 reagentes:
- ATE;
 - TES;
 - K_2HPO_4 ;
 - $NaNO_3$;
 - H_3BO_3 ;
 - $NaSiO_3$;
 - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;
 - $NaHCO_3$;
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.
- Com a pipeta automática adicionar 1400 μ l (2 x 700 μ l) de cada reagente a água Milli-Q. Após a adição de todos os reagentes é necessário mexer os barris e colocá-los para autoclavar com a tampa semiaberta e coberta com papel alumínio.