

MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE MICROCISTINAS EM RITMO
CIRCADIANO EM *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING**

RECIFE

2012

MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE MICROCISTINAS EM RITMO
CIRCADIANO EM *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade
Federal Rural de Pernambuco.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

CO-ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Ariadne do Nascimento Moura

RECIFE

2012

Ficha Catalográfica

A658p Cordeiro-Araújo, Micheline Kézia
Produção e liberação de microcistinas em ritmo circadiano em *microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing / Micheline Kézia Cordeiro de Araújo. -- Recife, 2012.
52 f. : il.

Orientador (a): Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2012.

Inclui referências e anexo.

1. Ecotoxicologia de cianobactérias 2. Ritmo circadiano
3. *Microcystis aeruginosa* 4. Microcistina intracelular
5. Microcistina extracelular I. Bittencourt-Oliveira, Maria do Carmo, orientadora II. Título

CDD 581

**PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE MICROCISTINAS EM RITMO
CIRCADIANO EM *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING**

MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica. Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora:

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira
Titular / UFRPE

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Barreto Pereira
Titular / UFRPE

Prof. Dr. Renato José Reis Molica
Titular / UFRPE

Prof. Dr. Ênio Wocyli Dantas
Titular / UEPB

Dr^a. Viviane Lúcia dos Santos Almeida
Suplente / Secretaria do Meio Ambiente

Data de aprovação: / / 2012

RECIFE

2012

*Dedico esta dissertação à Memória do meu querido
padrinho-pai Ivanildo Luis da Silva pela amizade,
carinho e lição de generosidade.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e por sempre iluminar o meu caminho nos momentos mais difíceis e decisivos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).

À Coordenadora Carmen Sílvia Zickel (minha primeira orientadora na UFRPE), e aos secretários do PPGB, Kênia Muniz, Sr. Manassés (seu Mano) e D. Margarida (Em Memória), pela dedicação e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da concessão de Bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Ariadne do Nascimento Moura, pela orientação, pela confiança, generosidade, ensinamentos e imensa amizade a mim dedicada.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira, pela orientação, paciência e grandes ensinamentos que contribuíram decisivamente para a minha formação nesta etapa.

Aos amigos do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Microalgas: Eduardo Fuentes, Emanuel Cardoso, Ênio Wocyli, Gilberto, Helton Soriano, Juliana Severiano, Mauro Vilar, Nísia Aragão, Patrícia, Vanessa Santos e Viviane Almeida, por sempre estarem presente, pelo apoio e grande amizade.

Aos que já fizeram parte deste laboratório: Alexandra, Arthur Siqueira, Fábria Carraro, Fabiane, Ivo Mendonça, João Ivens, João Manuel, Marcelo Andrade e Silvana Dias.

Aos amigos do Laboratório de Cianobactérias: Danilo pela amizade, Ítalo pela amizade, Helton Soriano pela grande ajuda, companheirismo e amizade; Cássia pelos ensinamentos e por rir das minhas piadas; Viviane Piccin por tudo mesmo, amizade, parceria e por dividir comigo até mesmo a sua mãe D. Maria.

Aos amigos da república piracicabana Gustavo e Sheila pelo abrigo e amizade.

A todos os colegas do mestrado e doutorado desta Universidade.

Às amigas inseparáveis Giselle, Joseane, Juliana, Vívian, amigucha Suzanna e Daniele.

Em especial aos meus pais Margarida e Gutembeg, e meus queridos padrinhos Ivanildo e Maria Barbosa (D. Lurdes) por sempre acreditarem em mim e mesmo distantes estarem presentes em meu coração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
3. REFERÊNCIAS	10
MANUSCRITO (Liberação ativa de microcistinas sob um controle endógeno em <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing)	
Resumo	18
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	23
2.1. Cepa, condições de cultivo e curva de crescimento.....	23
2.2. Experimentos em ciclos de 12:12hs (claro:escuro e claro:claro): fases de crescimento exponencial e estacionária.....	23
2.2.1. Fase Exponencial.....	24
2.2.2. Fase Estacionária.....	24
2.3. Análise de MCI e MCE nos ciclos de 12:12h claro:escuro e claro:claro: fases de crescimento exponencial e estacionária.....	25
2.4. Análise estatística.....	25
3. Resultados	26
3.1. Liberação ativa de microcistinas.....	26
3.2. Ciclos 12:12h claro:escuro e claro:claro da fase exponencial.....	26
3.3. Influência da densidade populacional no ciclo 12:12h claro:escuro das fases exponencial e estacionária.....	27
4. Discussão	28
5. Conclusões	31
6. Agradecimentos	32
7. Referências	32
ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Curva de crescimento de *M. aeruginosa* BCCUSP232. As barras representam o desvio padrão ($n=3$).....43

Fig.2. Variação das concentrações de microcistinas da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 em ciclos 12:12h claro:escuro e claro:claro durante a fase exponencial de crescimento. A. Microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) (fg.cel^{-1}) do ciclo claro:escuro B. Microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) (fg.cel^{-1} equivalente) ciclo claro:escuro. C. Microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) (fg.cel^{-1}) do ciclo claro:claro. D. Microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) (fg.cel^{-1} equivalente) ciclo claro:claro. As barras representam o erro padrão ($n=3$).....44

Fig.3. Variação das concentrações de MC total (MCI e MCE) (fg.cel^{-1}) da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 nos ciclos 12:12hs claro:escuro e claro:claro durante a fase exponencial de crescimento. As barras representam o erro padrão ($n=3$).....45

Fig.4. Variação das concentrações de microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) (fg.cel^{-1}) e densidade celular (cel.ml^{-1}) da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 entre as fases exponencial e estacionária de crescimento no ciclo 12:12h claro:escuro. □ Densidade celular na fase exponencial; ■ Densidade celular na fase estacionária; ○ MCI na fase exponencial; ■ MCI na fase estacionária. As barras representam o erro padrão ($n=3$).....46

Fig. 5. Variação das concentrações de microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) (fg.cel^{-1} equivalente) e densidade celular (cel.mL^{-1}) da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 entre as fases exponencial e estacionária nos ciclos 12:12h claro:escuro. □ Densidade celular da fase exponencial; ■ Densidade celular na fase estacionária; ○ MCE na fase exponencial; ■ MCE na fase estacionária. As barras representam o erro padrão ($n=3$).....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) e microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) ($\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}$) da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 nos ciclos 12:12h claro:escuro e claro:claro durante as fases exponencial e estacionária de crescimento. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($n=3$).....38

Tabela 2. Aumentos (A) e reduções (R(-)) das concentrações de microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) ($\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}$) e microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) ($\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}$ equivalente) da cepa *M. aeruginosa* (BCCUSP232) entre horários consecutivos durante ciclos de 12:12h claro:escuro e claro:claro das fases exponencial e estacionária. Valores percentuais de aumento e redução (%).....40

Cordeiro-Araújo, Micheline Kézia; M.Sc.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; outubro de 2012; PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE MICROCISTINAS EM RITMO CIRCADIANO EM *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING; Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (Orientadora), Ariadne do Nascimento Moura (Co-orientadora).

RESUMO

A comprovação de um ritmo circadiano na biossíntese de microcistinas (MC) em *Microcystis panniformis* Komárek et al. levantou a suspeita quanto à forma de liberação desta toxina no meio circundante, visto que não foram observadas lises celulares que explicassem as variações de microcistinas intracelulares. Os objetivos deste estudo foram investigar as possíveis variações de microcistinas intra e extracelulares durante ciclos de 24 horas em *M. aeruginosa*, a influência da densidade populacional nas concentrações de microcistinas intra e extracelulares e, se a liberação de microcistinas em cultivos do tipo “batch” ocorre de maneira ativa. Os experimentos foram realizados em réplicas, sob condições controladas de laboratório, em dois ciclos de 24h independentes: claro:escuro e claro:claro (12:12h) durante a fase exponencial de crescimento. Também foi analisado um ciclo claro:escuro durante a fase estacionária nas mesmas condições. Amostras coletadas a cada 2 horas foram centrifugadas e as concentrações de MC intracelulares por quota celular (MCI) e extracelulares por quota celular equivalente (MCE), utilizando respectivamente, “pellet” e sobrenadante foram obtidas através do método ELISA. As MCI exibiram um ritmo endógeno controlado em função do tempo em um período de 24 horas com padrões similares entre os ciclos claro:escuro e claro:claro nas fases exponencial e estacionária de crescimento. As MCI na fase estacionária foram mais elevadas que na exponencial, chegando cerca de 4,7 e 4,9 vezes maiores nos horários das 10 e 14 horas, respectivamente. As oscilações das MCE foram semelhantes nos ciclos claro:escuro de ambas as fases exponencial e estacionária. Baseado nos resultados encontrados, a liberação das MCI para o meio extracelular ocorre de forma ativa controlada por um ritmo endógeno. A densidade populacional está diretamente relacionada ao aumento das MCI que pode estar relacionada a uma comunicação semelhante a “quorum sensing”.

Palavras-chave: Ritmo endógeno, *Microcystis aeruginosa*, Microcistina intracelular, Microcistina extracelular.

Cordeiro-Araújo, Micheline Kézia; M.Sc.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; outubro de 2012; PRODUCTION AND RELEASE OF MICROCYSTINS AT A CIRCADIAN RHYTHM IN *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING; Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (Orientadora), Ariadne do Nascimento Moura (Co-orientadora).

ABSTRACT

Evidence of a circadian rhythm in the biosynthesis of microcystins (MC) in *Microcystis panniformis* Komarek et al. posed a question on how this toxin is released into the environment, since there were no cell lysis to explain the variations of intracellular microcystins. The aims of this study were the investigation of possible variations of intracellular and extracellular microcystins during cycles of 24 hours in *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing, the influence of population density in the concentrations of intracellular and extracellular microcystins and if the release of microcystins in batch-like cultivation happens in an active way. The experiments were performed in triplicate, under controlled laboratory conditions in two independent 24h cycles, light:dark and light:light (12:12h) during the exponential growing phase. It was also analyzed a light:dark cycle during the stationary growing phase under the same conditions. Samples collected in 2 hours intervals were centrifuged and the concentrations of intracellular MC per cell-quota (MCI) and extracellular MC per equivalent cell-quota (MCE), using respectively, pellet and supernatant, were obtained using the ELISA method. The MCI exhibited an endogenous rhythm controlled by time in a period of 24 hours with similar patterns between light:dark and light:light cycles in exponential and stationary growing phases. The MCI in the stationary growing phase were higher than in the exponential growing phase, reaching approximately 4.7 times and 4.9 times higher in the 10 and 14 hours, respectively. The oscillations of MCE were similar in both light:dark cycles of exponential and stationary growing phases. Based on these findings, we came to the conclusion that the release of MCI to the extracellular medium is actively controlled by an endogenous rhythm. The population density is directly related to the MCI increasing, which could be related to a communication similar to “quorum sensing”.

Keywords: Endogenous rhythm, *Microcystis aeruginosa*, Intracellular microcystins, Extracellular microcystins.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são um grupo diverso de procariotos fotossintetizantes que ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos, cujos registros fósseis na Terra são de aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 1993). São habitantes comuns das águas doces em todo o mundo fazendo parte do fitoplâncton. Sob condições favoráveis como disponibilidade de luz, pH elevado e altas concentrações de nutrientes, certas cianobactérias podem dominar o fitoplâncton levando à formação de florações (BOUVY et al., 2000; 2003; STEWART et al., 2006).

Esses organismos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários com função desconhecida (CARMICHAEL, 1992). Dentre esses metabólitos estão as cianotoxinas, um grupo diverso de toxinas naturais, tanto do ponto de vista químico como toxicológico. Os efeitos descritos de toxicidade de cianobactérias são diversos: dermatotóxicos, hepatotóxicos e neurotóxicos. Pela estrutura química as cianotoxinas podem ser divididas em três grandes grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (SIVONEN e JONES, 1999).

Entre os peptídeos cíclicos estão as microcistinas (heptapeptídeos cíclicos), potentes inibidoras de proteínas fosfatases 1 e 2A (MACKINTOSH et al., 1990). Com base em seus efeitos toxicológicos, as microcistinas são classificadas como hepatotoxinas, uma vez que causam sérios danos em tecidos hepáticos, tais como alterações citoesqueléticas das células e consequente morte por hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (ERIKSSON et al., 1990; YOSHIDA et al., 1997). Essas cianotoxinas são muito estudadas por sua larga distribuição geográfica em ambientes de água doce e grande variação estrutural, apresentando mais de 80 variantes (MERILUOTO e SPOOF, 2008). Em ambientes de água doce têm sido comuns os incidentes por intoxicação de mamíferos, dentre eles o homem (YUAN et al., 2006).

As microcistinas foram caracterizadas inicialmente a partir dos gêneros *Microcystis* Lemmermann, *Anabaena* Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault, *Planktothrix* Anagnostidis & Komárek, *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Anabaenopsis* Miller e *Hapalosiphon* Nägeli ex Bornet et Flahault (SIVONEN e JONES, 1999). Mais recentemente foi relatada a presença de microcistinas nos gêneros *Geitlerinema* (Anagnostidis & Komárek) Anagnostidis e *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek (RICHARDSON et al., 2007). No gênero *Microcystis* destaca-se a espécie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, produtora de microcistina, muito relacionada a incidentes de intoxicação (PARK et al., 1998; YUAN et al., 2006).

Nos estudos realizados até o momento é conhecido que a liberação da microcistina para o meio externo ocorre durante a lise celular (PARK et al., 1998; SIVONEN e JONES, 1999; PIETSCH, BORNMANN e SCHMIDT, 2002). Entretanto, há indícios da existência de uma forma alternativa da sua liberação no meio circundante. A presença de um complexo enzimático (MycH) que atua como um possível transportador das microcistinas para fora da célula, resultaria em uma via alternativa à liberação dessa toxina (PEARSON et al., 2004).

A respeito da produção das cianotoxinas, a regulação de tal processo tem sido relacionada ao controle endógeno, através do ritmo circadiano da célula. Estudos comprovaram a existência desse ritmo controlando a produção de microcistinas em *M. panniformis* Komárek et al. (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005) e saxitoxina e neosaxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (CARNEIRO et al., 2009).

Esses ritmos circadianos são programas biológicos endógenos e independentes de estímulos externos, presentes em muitos organismos, desde bactérias até plantas e mamíferos, em um período de aproximadamente 24 horas (MORI e JOHNSON, 2001). Estudos recentes em cianobactérias demonstraram que a luz pode ser o sinal externo que afeta o ritmo circadiano nesses organismos (WOOD et al., 2010; RUST et al., 2011). Estes ritmos adquirem a função de um relógio, pois persistem, mesmo na ausência de sinais externos de tempo, redefinindo a fase de claro e escuro (KONDO e ISHIURA, 2000) e são independentes da divisão celular (JOHNSON, 2004).

Até meados de 1980, os estudos indicavam que tais ritmos circadianos existiam exclusivamente em eucariotos por se supor que um cronômetro endógeno marcado por um período com cerca de 24 horas não seria útil aos organismos que se dividem mais de uma vez ao longo deste intervalo de tempo, como ocorre em muitos procariotos (JOHNSON et al., 1996). Porém, a partir de estudos com cianobactérias ficou comprovada a existência desses ritmos em organismos procariotos. Tais estudos tratam, principalmente, da fixação de nitrogênio (MITSUI et al., 1986; GLOBBELAAR et al., 1986; HUANG et al., 1990; LORNE et al., 2000; MULHOLLAND e CAPONE, 2000; STAAL, RABOUILLE e STAL, 2007), divisão celular (SWEENEY e BORGESSE 1989), fotossíntese (ROENNEBERG e CARPENTER 1993; SCHNEEGURT et al., 1994; YEN, HUANGB e YEN, 2004), captação de aminoácidos, síntese de carboidratos (IWASAKI e KONDO, 2004) e, mais recentemente, estudos realizados no Brasil sobre a biossíntese de microcistinas (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005), saxitoxina e neosaxitoxina (CARNEIRO et al., 2009).

Estudos têm indicado ainda que a existência de ritmos circadianos em cianobactérias é controlada em função de um agrupamento genético denominado *kaiABC*, no qual as proteínas expressas (KaiA, KaiB e KaiC) controlam os genes envolvidos em funções diversas, tais como fotossíntese, divisão celular e síntese de aminoácidos (IWASAKI et al., 1999; JOHNSON e GOLDEN, 1999; LORNE et al., 2000; JOHNSON, 2004; DONG et al., 2010).

Outro importante aspecto relacionado tanto à biossíntese quanto à liberação das microcistinas no meio circundante é a densidade populacional. Para Kaardinal et al. (2007), na natureza ocorre um declínio gradual da concentração de microcistina média por célula em *Microcystis* sp. do início de uma floração quando a densidade populacional é maior. No entanto, estudos em laboratório contradizem essa observação. Carneiro et al. (2009) trabalhando com saxitoxina e neosaxitoxina em *C. raciborskii* e Ziegmann et al. (2010) com microcistina em *M. aeruginosa* demonstraram que a produção dessas cianotoxinas por célula aumenta concomitantemente ao aumento da densidade populacional em cultura.

É sabido que em bactérias existe uma regulação da expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade populacional conhecida por *quorum sensing* (CHA et al., 1998; WHITEHEAD et al., 2001). Através do aumento da densidade populacional há emissão de sinais químicos por pequenas moléculas chamadas de sinalizadoras, fazendo com que se estabeleça uma comunicação. Esses organismos se comunicam uns com os outros e respondem coletivamente às mudanças ambientais devido à emissão e recepção dessas moléculas (CHU et al., 2010). Nas bactérias Gram-negativas, as moléculas sinalizadoras mais comuns são N-acil homoserinas derivadas de lactonas (WHITEHEAD et al., 2001). Existem evidências da existência de moléculas sinalizadoras semelhantes na cianobactéria *Gloethece* PCC6909, denominada N-octanoil homoserina lactona, a qual em cultivo de laboratório seguiu um padrão característico do fenômeno da auto-indução ou *quorum sensing* (SHARIF et al., 2008).

Embora tais moléculas estejam presentes em cianobactérias, ainda não há evidências de que as variações nas concentrações intra e extracelulares de cianotoxinas estejam relacionadas a algum tipo de comunicação controlada por *quorum sensing* (BRAUN e BACHOFEN, 2004).

Este estudo testa as hipóteses de que a liberação das microcistinas em *Microcystis aeruginosa* obedece a um ritmo circadiano e que as concentrações intracelulares das microcistinas por quota celular aumenta progressivamente em relação ao aumento da densidade populacional. Para tanto, os objetivos deste estudo foram investigar as possíveis variações de microcistinas intra e extracelulares durante ciclos de 24 horas em *M. aeruginosa*,

a influência da densidade populacional nas concentrações de microcistinas intra e extracelulares e, se a liberação de microcistinas em cultivos do tipo “batch” ocorre de maneira ativa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Microcistinas são heptapeptídeos cíclicos muito estudados, entre as cianotoxinas, devido à sua ampla distribuição geográfica em ambientes de água doce e grande variação estrutural (mais de 80 variantes) (MERILUOTO e SPOOF, 2008). *Microcystis* é um dos principais gêneros de cianobactérias produtores de microcistinas e neste se destaca *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing uma espécie produtora de microcistina muito relacionada a incidentes de intoxicação de humanos e animais por água contaminada em todo o mundo (PARK et al., 1998; YUAN et al., 2006; LEHMAN et al., 2008).

É conhecido que a forma de liberação das microcistinas para o meio circundante ocorre através da lise celular (PARK et al., 1998; SIVONEN e JONES, 1999; PIETSCH, BORNMANN e SCHMIDT, 2002). No entanto, um estudo recente forneceu indícios sobre uma forma alternativa de liberação dessas toxinas (PEARSON et al., 2004). Pearson et al. estudaram cepas selvagens (PCC7806) e mutantes de *M. aeruginosa* produtoras de microcistina através de análises moleculares e de arranjos gênicos, mutação da proteína MycH e previsão da sua função. Os autores observaram que o perfil hidropático e a estrutura secundária indicam que MycH é uma proteína de fusão da membrana da célula e domínios ABC codificados dentro de um único polipeptídeo. Assim, este estudo previu, para a proteína MycH, uma função de exportação da microcistina, pois a membrana celular e domínio da ABC transportadores são geralmente fundidos, sugerindo um tipo de transporte ativo da microcistina para fora da célula através do MycH.

A via de regulação dos processos biossintéticos de microcistinas tem sido relacionada a um controle endógeno através de um ritmo circadiano. Um estudo comprovou a existência desse ritmo controlando a produção de microcistinas em *Microcystis panniformis* Komárek et al., sob condições controladas de luz, temperatura e fotoperíodo ao longo de 24 horas (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005).

Tais ritmos circadianos são programas biológicos endógenos e estão presentes em diversos organismos, desde bactérias até seres humanos. Atuam provocando mudanças cíclicas na acumulação ou na interação entre proteínas e, conseqüentemente, no comportamento do organismo (MORI e JOHNSON, 2001; HITOMI et al., 2005; RUST et al., 2011). Esses ritmos possuem três características principais: periodicidade aproximada de 24h, fase de redefinição por estímulos ambientais, compensação de temperatura e do período (HITOMI et al., 2005). Até meados de 1985, era conhecido que esses ritmos ocorriam apenas em organismos eucariontes, devido ao fato dos procariontes serem capazes de se reproduzir mais de uma vez ao longo de 24 horas (MORI e JOHNSON, 2001).

A partir dos estudos de Stal e Krumbein (1985) com *Oscillatoria* sp. (cepa 23), Grobbelaar et al. (1986) com *Synechococcus* sp. (cepa BG 43511) e Mitsui et al. (1986) com *Synechococcus* sp. (cepa RF-1) ficou comprovada a existência do controle endógeno sobre o processo de fixação de nitrogênio em cianobactérias. Em *Synechococcus*, diferentes ritmos foram descobertos posteriormente, regulando atividades como divisão celular, fotossíntese, absorção de aminoácidos, síntese de carboidratos e respiração (GOLDEN et al., 1997), além da manutenção da regulação circadiana (ISHIURA et al., 1998).

Os estudos sobre ritmos circadianos em organismos procariotos tiveram início com cianobactérias e ao longo dos anos têm sido intensificados. Tais estudos versaram sobre divisão celular em *Synechococcus* SP. (WH7803) (SWEENEY e BORGESSE, 1989), absorção de aminoácidos e fixação de nitrogênio em *Synechococcus* sp RF-1 (HUANG et al., 1990), fixação de nitrogênio e fotossíntese (ROENNEBERG e CARPENTER, 1993; SCHNEEGURT et al., 1994; IWASAKI e KONDO, 2004; YEN et al., 2004), modelo de oscillator molecular (MULHOLLAND e CAPONE, 2000; STAAL et al., 2007), produção de microcistinas (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005) e saxitoxinas e neosaxitoxinas (CARNEIRO et al., 2009). Esses últimos dois trabalhos foram os únicos realizados no Brasil que abordam ritmos circadianos na biossíntese de cianotoxinas.

Em relação à biossíntese de cianotoxinas, os parâmetros ambientais aos quais as cianobactérias estão expostas devem ser levados em consideração. De acordo com Leflaive e Ten-Hage (2007), em condições naturais, parâmetros ambientais como luz, concentrações de fósforo e nitrogênio também podem influenciar na produção de cianotoxinas e na sua liberação para o ambiente.

Outro importante fator sobre a biossíntese e a liberação das cianotoxinas é a densidade populacional. Alguns estudos têm demonstrado que o conteúdo de microcistina expresso por célula na natureza pode ser elevado no início de florações de *Microcystis* spp., e diminuir quando a densidade populacional atingir os níveis mais elevados dessas florações (WELKER et al., 2003; JANSE et al., 2005; KARDINAAL et al., 2007). Entretanto, estudos com cianobactérias em cultivo divergem a esse respeito. Em Carneiro et al. (2009) foram observados maiores concentrações de saxitoxinas por quota celular quando o cultivo (*C. raciborskii*) adquiria a maior densidade populacional. Ziegmann et al. (2010) desenvolveram um método para facilitar a detecção de florações de cianobactérias em reservatórios de água potável (espectroscopia de fluorescência). O estudo incluía a quantificação de microcistinas produzidas e liberadas por uma cultura de *M. aeruginosa* em laboratório, em diferentes estágios de crescimento. Nesse estudo, os autores observaram que o aumento do conteúdo de

microcistina na cultura foi explicado pelo aumento do número de células durante as diferentes fases de crescimento.

Outro aspecto sobre a densidade populacional é a emissão de sinais químicos em procariontes através de comunicação intercelular (*quorum sensing*). Muitas bactérias Gram-negativas regulam a expressão dos conjuntos de genes especializados em resposta à densidade populacional (CHA et al., 1998). Este mecanismo regulador, chamado de auto-indução ou *quorum sensing*, é baseado na produção de pequenas moléculas sinalizadoras pelas bactérias.

As principais moléculas sinalizadoras em bactérias Gram-Negativas pertencem ao grupo das Acil homoserina-lactonas (CHA et al., 1998). Essas moléculas são responsáveis pelo desencadeamento de densidades celulares muito diferentes dependendo do tipo das respostas, tais como bioluminescência, agregação de células, transferência conjugal de plasmídeo e produção de exoenzimas determinantes de virulência em humanos e patógenos de plantas (BRAUN e BACHOFEN, 2004).

Esses compostos divergem muito em sua estrutura química, variando de metabólitos complexos a peptídeos de diversos tamanhos, sendo sua função muitas vezes desconhecida (BRAUN e BACHOFEN, 2004). Neste mesmo contexto, também podem ser inseridas as cianotoxinas como metabólitos secundários (CARMICHAEL, 1992). Embora a maioria dos estudos sobre *quorum sensing* esteja relacionada às bactérias, algumas pesquisas já apontam para a presença desse fenômeno em cianobactérias e que as microcistinas podem ser uma dessas formas de comunicação através da densidade celular entre as cianobactérias.

Em um estudo com *Synechocystis* sp. (PCC 6803), Vassilakaki e Pflugmacher (2007), tentaram determinar se microcistinas em concentrações ambientalmente relevantes seriam capazes de causar reações fisiológicas em células de *Synechocystis* sp., iniciando um estresse oxidativo e, portanto, contribuindo para um possível papel de sinalização das toxinas no ecossistema aquático. Os autores observaram que a espécie sofreu estresse oxidativo mediante exposição às concentrações de microcistinas utilizadas e acreditam que tais microcistinas sejam uma via de comunicação entre cianobactérias, porém foi sugerido a realização de mais estudos para esclarecer a função natural dos metabólitos secundários nesses organismos.

Sharif et al. (2008) observaram que uma acumulação de N-octanoil homoserina lactona em meio das culturas laboratoriais de *Gloeotheca* PCC6909 apresentou um padrão característico do fenômeno da auto-indução, uma característica comum dos sistemas funcionais de acil homoserina lactona presente em bactérias. A cepa mutante sem bainha de *Gloeotheca* (PCC6909/1) mostrou alterações na expressão de 43 proteínas comparado com células não tratadas.

3. REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; KUJBIDA, P.; CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; MOURA, A.N.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.326, p.687–694, 2005.
- BRAUN, E.; BACHOFEN, R. Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. **Hydrobiologia**, Hague, v.522, p.271-280, 2004.
- BOUVY, M.A.; Falcão, D.; Marinho, M.; Pagano, M.; Moura, A.N. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf/Luhev v.23, p.13-27, 2000.
- BOUVY, M.A.; NASCIMENTO, S.M.; Molica, R.J.R.; Ferreira, A. Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. **Hydrobiologia**, Hague, v.493, p.115-130, 2003.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.72, p.445-459, 1992.
- CARNEIRO, R.L.; SANTOS, M.E.V.; PACHECO, A.B.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, London, v.31, n.5, p.481–488, 2009.
- CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.C.; SHAW, P.D.; FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associate bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.11, p.1119-1129, 1998.
- CHU, W.; LU, F.; ZHU, W.; KANG, C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.110, p.202-208, 2010.
- DONG, G.; KIM, Y.; GOLDEN, S.S. Simplicity and complexity in the cyanobacterial circadian clock mechanism. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v.20, 619-625, 2010.
- ERIKSSON, J. E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P.; MERILUOTO, J.A.O. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1025, p. 60-66, 1990.

- GOLDEN, S.S.; ISHIURA, M.; JOHNSON, C.H.; KONDO, T. Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, California, v.48, p.327-354, 1997.
- GROBBELAAR, N.; HUANG, T.C.; LIN, H.Y.; CHOW, T.J. Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.37, p.173-177, 1986.
- HARDMAN, A.M.; STEWART, G.S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, Dordrecht, v.74, n.4, p.199-210, 1998.
- HITOMI, K.; OYAMA, T.; HAN, S.; ARVA, A.S.; GETZOFF, ED. Tetrameric Architecture of the Circadian Clock Protein KaiB: A novel interface for intermolecular interactions and its impact on the circadian rhythm. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.280, n.19, p.19127–19135, 2005.
- HUANG, T.C.; TU, J.; CHOW, T.J.; CHEN, T.H. Circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiology*, Washington, v.92, p.531–533, 1990.
- ISHIURA, M.; KUTSUNA, S.; AOKI, S.; IWASAKI, H.; ANDERSSON, C.R.; TANABE, A.; GOLDEN, S.S.; JOHNSON, C.H.; KONDO, T. Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, Washington, v.281, p.1519-1523, 1998.
- IWASAKI, H.; TANIGUCHI, Y.; ISHIURA, M., KONDO, T. Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *The EMBO Journal*, Heidelberg, v.18, n.5, p.1137-1145, 1999.
- IWASAKI, H.; KONDO, T. Circadian Timing Mechanism in the Prokaryotic Clock System of Cyanobacteria. *Journal of Biological Rhythms*, New York, v.19, n.5, p.436-444, 2004.
- JANSE, I.; KARDINAAL, W.E.A.; AGTERVELD, M.K.; MEIMA, M.; VISSER, P.M.; ZWART, G. Contrasting microcystin production and cyanobacterial population dynamics in two *Planktothrix* –dominated freshwater lakes. *Environmental Microbiology*, Oxford, v.7, n.10, p.1514–1524, 2005.
- JOHNSON, C.H.; GOLDEN, S.S.; ISHIURA, M.; KONDO, T. Circadian clocks in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, Salem, v.21, n.1, p. 5-11, 1996.
- JOHNSON, C.H.; GOLDEN, S.S. Circadian Programs in Cyanobacteria: Adaptiveness and Mechanism. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.53, p.389-409, 1999.
- JOHNSON, C.H. Precise Circadian Clocks in Prokaryotic Cyanobacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, Norfolk, v.6, p.103-110, 2004.

- KARDINAAL, W.E.A.; TONK, L.; JANSE, I.; HOL, S.; SLOT, P.; HUISMAN, J.; VISSER, P.M. Competition for Light between Toxic and Nontoxic Strains of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, n.9, p. 2939–2946, 2007.
- KONDO, T.; ISHIURA, M. The circadian clock of cyanobacteria. **BioEssays**, Cambridge, v.22, p.10–15, 2000.
- LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**, Oxford, v.52, p.199–214, 2007.
- LEHMAN, P. W.; BOYER, G.; SATCHWELL, M.; WALLER, S. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. **Hydrobiologia**, Hague, v. 600, p.187-204, 2008.
- LORNE, J.; SCHEFFER, J.; LEE, A.; PAINTER, M.; MIAO, V.P.W. Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.189, p.129-133, 2000.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P., CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 264, n.2, p. 187-192, 1990.
- MERILUOTO, J.A.; SPOOF, L.E. Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, v.619, p.483-499, 2008.
- MITSUMI, A.; KUMAZAWA, S.; TAKAHASHI, A.; IKEMOTO, H.; ARAI, T. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. **Nature**, London, v.323, p.720–722, 1986.
- MORI, T.; JOHNSON, C.H. Circadian programming in cyanobacteria. **Cell & Developmental Biology**, San Diego, V.12, p.271–278, 2001.
- MULHOLLAND, M.R.; CAPONE, D.G. The nitrogen physiology of the marine N₂-fixing cyanobacteria *Trichodesmium* spp. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n.4, p.1360-1385, 2000.
- PARK, H.; IWAMI, C.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; OKINO, T.; HAYASHI, H. Temporal Variabilities of the Concentrations of Intra- and Extracellular Microcystin and Toxic *Microcystis* Species in a Hypertrophic Lake, Lake Suwa, Japan (1991–1994). **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v.13, p.61-72, 1998.

- PEARSON, L.A.; HISBERGUES, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E.; NEILAN, B.A. Inactivation of an ABC Transporter Gene, *mcyH*, Results in Loss of Microcystin Production in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.11, p. 6370–6378, 2004..
- PIETSCH, J.; BORNMANN, K.; SCHMIDT, W. Relevance of Intra- and Extracellular Cyanotoxins for Drinking Water Treatment. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, Weinheim, v.30, n.1, p.7–15, 2002.
- RICHARDSON, L.L.; SEKAR, R.; MYERS, J.L.; GANTAR, M.; VOSS, J.D.; KACZMARSKY, L.; REMILY, E.R.; BOYER, G.L.; ZIMBA, P.V. The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. **Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters**, Amsterdam, v.272, p.182-187, 2007.
- ROENNEBERG, T.; CARPENTER, E.J. Daily rhythm of O₂ evolution in the cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* under natural and constant conditions. **Marine Biology**, Berlin, v.117, p.693-697, 1993.
- RUST, M.J.; GOLDEN, S.S.; O'SHEA, E.K. Light-Driven Changes in Energy Metabolism Directly Entrain the Cyanobacterial Circadian Oscillator. *Science*, New York, v.331, p.220-223, 2011.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. Pp.41-91. In: Chorus, I.; Bartram, J. (EDs). *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London, E & FN SPON, 1999.
- SCHOPF, J.W. Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. **Science**, New York, v.260, n.5108, p.640-646, 1993.
- SCHNEEGURT, M.A.; SHERMAN, D.M.; NAYAR, S.; SHERMAN, L.A. Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1585-1597, 1994.
- SHARIF, D.I.; GALLON, J.; SMITH, C.J.; DUDLEY, E. Quorum sensing in Cyanobacteria: *N*-Octanoyl-homoserine lactone release and response by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeothece* PCC6909. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, New York, v.2, 1171-1182, 2008.
- STAAL, M.; RABOUILLE, S.; STAL, L.J. On the role of oxygen for nitrogen fixation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* sp. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.9, n.3, p.727–736, 2007.

- STAL, L.J.; KRUMBEIN, W.E. Nitrogenase activity in the non-heterocytous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Grown under alternating light-dark cycles. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.143, p.67-71, 1985.
- STEWART, I.; WEBB, P.M., Schluter, P.J.; Shaw, G.R. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. **Environmental Health**, London, v.5, n.6, p.1-13, 2006.
- SWEENEY, B.M.; BORGESSE, M.B. A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. **Journal of Phycology**, Lawrence, v.25, p.183–86, 1989.
- VASSILAKAKI, M.; PFLUGMACHER, S. Oxidative stress response of *Synechocystis* sp. (PCC 6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.20, 219-225, 2010.
- WELKER, M.; VON DÖHREN, H.; TAUSCHER, H.; STEINBERG, C.E.W.; ERHARD, M. Toxic *Microcystis* in shallow Lake Müggelsee (Germany): dynamics, distribution, diversity. **Archiv für hydrobiologie**, Stuttgart, v.157, p.227–248, 2003.
- WHITEHEAD, N.A.; BARNARD, A.M.L.; SLATER, H.; SIMPSON, N.J.L.; SALMOND, G.P.C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.25, 365-404, 2001.
- WOOD, T.L.; BRIDWELL-RABB, J.; KIM, Y.; GAO, T.; CHANG, Y.; LIWANG, A.; BARONDEAU, D.P.; GOLDEN, S.S. The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.107, n.13, p.5804-5809, 2010.
- YEN, U.C.; HUANGB, T.C.; YEN, T.C. Observation of the circadian photosynthetic rhythm in cyanobacteria with a dissolved-oxygen meter. **Plant Science**, Limerick, v.166, p.949–952, 2004.
- YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMARU, S.I.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. **Natural Toxins**, New York, v. 5, p. 91-95, 1997.
- YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, Elmsford, v.48, p.627-640, 2006

ZIEGMANN, M.; ABERT, M.; MÜLLER, M.; FRIMMEL, F.H. Use of fluorescence fingerprints for the estimation of bloom formation and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research** , New York, v.44, p.195 – 204, 2010.

Manuscrito

Liberação ativa de microcistinas sob um controle endógeno em *Microcystis aeruginosa*

(Kützing) Kützing

O manuscrito será submetido para publicação em revista científica

1 **Liberção ativa de microcistinas controlada por um ritmo endógeno em**
2 *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing

3 Micheline Kézia Cordeiro-Araújo¹ e Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira^{2*}

4 ¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. D. Manoel de
5 Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-030, Recife, Pernambuco, Brasil; Fone: +55 81 3320
6 6350.

7 ²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
8 Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Piracicaba, SP, 13418-900 Brasil; Fone:
9 +5519-3429-4128, Fax: +5519-3434-8295.

10 *Autor para correspondência: mbitt@usp.br

12 **Resumo**

13 Microcistinas são cianotoxinas constantemente relacionadas a incidentes de
14 intoxicação de humanos e animais com água contaminada. Nesse sentido, o
15 conhecimento sobre a sua forma de liberação para o meio circundante é
16 fundamental para a prevenção de tais incidentes. Os objetivos deste estudo foram
17 investigar a ocorrência de liberação ativa de microcistinas, a presença de um ritmo
18 endógeno controlando a liberação de microcistinas, e a influência da densidade
19 celular nas concentrações de microcistinas intracelular por quota celular (MCI) em
20 *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232. Os experimentos foram realizados em
21 trélicas, sob condições controladas de laboratório, em dois ciclos de 24h
22 independentes: claro:escuro e claro:claro (12:12h), durante a fase exponencial de
23 crescimento. Também foi analisado um ciclo claro:escuro durante a fase
24 estacionária, nas mesmas condições. Amostras coletadas a cada 2 horas foram
25 centrifugadas e as concentrações de MCI e microcistinas extracelulares por quota
26 celular equivalente (MCE), utilizando *pellet* e sobrenadante, respectivamente, foram
27 obtidas por ELISA. As MCI exibiram um ritmo endógeno controlado em função do
28 tempo em um período de 24 horas, com padrões similares entre os ciclos
29 claro:escuro e claro:claro nas fases exponencial e estacionária de crescimento. As
30 MCI na fase estacionária foram mais elevadas do que na exponencial, chegando
31 cerca de 4,7 e 4,9 vezes maiores nos horários das 10 e 14 horas, respectivamente.
32 As oscilações das MCE foram semelhantes nos ciclos claro:escuro de ambas as
33 fases de crescimento. Baseado nos resultados encontrados, a liberação das MCI
34 para o meio extracelular ocorreu de forma ativa, controlada por um ritmo endógeno.
35 A densidade celular esteve diretamente relacionada ao aumento das MCI, fato que
36 sugere uma comunicação semelhante a *quorum sensing*.

37 **Palavras-chave:** Ritmo circadiano, *Microcystis aeruginosa*, Microcistina intracelular,
38 Microcistina extracelular.

39

40

41 1. Introdução

42 As cianobactérias são um grupo diverso de procariotos fotossintetizantes que
43 ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos, cujos registros fósseis na Terra são
44 de aproximadamente 3,5 bilhões de anos (Schopf, 1993). São habitantes comuns
45 da água doce em todo o mundo, fazendo parte do fitoplâncton. Sob condições
46 favoráveis como disponibilidade de luz, pH elevado e altas concentrações de
47 nutrientes, algumas cianobactérias podem dominar o fitoplâncton levando à
48 formação de florações (Bouvy et al., 2000, 2003; Stewart et al., 2006).

49 Esses organismos produzem uma grande variedade de metabólitos
50 secundários, dentre os quais se destacam as cianotoxinas, responsáveis por
51 envenenamentos generalizados de animais selvagens, domésticos e peixes em
52 aquicultura (Carmichael, 1992; Sivonen e Jones, 1999). A exemplo disso, foram
53 relatados incidentes com contaminação de seres humanos, morte de pelo menos 52
54 pacientes de hemodiálise após tratamento com água contaminada no Município de
55 Caruaru, Nordeste do Brasil, causada pela presença de microcistinas (Jochimsen et
56 al., 1998; Yuan et al., 2006).

57 Um dos grupos de cianotoxinas mais estudados é o das microcistinas, por sua
58 larga distribuição geográfica em ambientes de água doce e grande variação
59 estrutural, apresentando cerca de 80 variantes (Meriluoto e Spoof, 2008). As
60 microcistinas foram caracterizadas inicialmente a partir dos gêneros *Microcystis*
61 Lemmermann, *Anabaena* Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault, *Planktothrix*
62 *Anagnostidis* & Komárek, *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Anabaenopsis* Miller
63 e *Hapalosiphon* Nägeli ex Bornet et Flahault (Sivonen e Jones, 1999). No gênero
64 *Microcystis* se destaca *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, uma espécie
65 produtora de microcistina muito relacionada a incidentes de intoxicação em todo o
66 mundo (Park et al., 1998). Até o momento é conhecido que a liberação da

67 microcistina para o meio externo ocorra durante a lise celular (Park et al., 1998;
68 Sivonen e Jones, 1999; Pietsch et al., 2002).

69 Uma via da regulação dos processos de biossíntese de microcistinas foi
70 relacionada ao controle endógeno celular através do ritmo circadiano. Estudos já
71 comprovaram a existência desse ritmo controlando a biossíntese de microcistinas
72 em *M. panniformis* Komárek et al. (Bittencourt-Oliveira et al., 2005) e, mais
73 recentemente, saxitoxina e neosaxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii*
74 (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Carneiro et al., 2009).

75 Estudos com cianobactérias comprovaram a existência de ritmos circadianos
76 ou endógenos em organismos procariotos, agindo em outros processos. Esses
77 estudos tratam, principalmente, da fixação de nitrogênio (Grobbelaar et al., 1986;
78 Mulholland e Capone, 2000; Staal et al., 2007), divisão celular (Sweeney e Borgese,
79 1989; Lorne et al., 2000), fotossíntese (Schneegurt et al., 1994; Yen et al., 2004),
80 captação de aminoácidos e síntese de carboidratos (Iwasaki e Kondo, 2004).

81 Pesquisas indicaram, ainda, que a existência de ritmos circadianos em
82 cianobactérias pode ser controlada em função de um agrupamento genético
83 denominado *kaiABC*. As proteínas expressas (KaiA, KaiB e KaiC) controlariam os
84 genes envolvidos em funções diversas que apresentam ciclos, tais como
85 fotossíntese, divisão celular e síntese de aminoácidos (Johnson e Golden, 1999;
86 Lorne et al., 2000).

87 A densidade populacional pode ser outro importante regulador da produção e
88 liberação de cianotoxinas. Em bactérias, existe regulação na expressão de vários
89 conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular conhecida por
90 *quorum sensing* ou auto-indução. Através do *quorum sensing* esses organismos
91 monitoram as densidades celulares antes de expressarem um determinado fenótipo
92 (Cha et al., 1998; Whitehead et al., 2001). Através do aumento da densidade celular

93 ocorre emissão de sinais químicos por pequenas moléculas, chamadas de
94 sinalizadoras, fazendo com que se estabeleça uma comunicação entre esses
95 organismos. Bactérias conseguem se comunicar umas com as outras e podem
96 responder coletivamente e com eficiência às mudanças ambientais devido à
97 emissão dessas moléculas sinalizadoras (Chu et al., 2010).

98 Nas bactérias Gram-negativas as moléculas sinalizadoras mais comuns são
99 N-acil homoserinas derivadas de lactonas (Whitehead et al., 2001). Existem
100 moléculas sinalizadoras semelhantes na cianobactéria *Gloethece* PCC6909, N-
101 octanoil homoserina lactona, a qual em cultivo de laboratório mostrou um padrão
102 característico do fenômeno do *quorum sensing* (Sharif et al., 2008). Embora tais
103 moléculas estejam presentes em cianobactérias, ainda não há evidências de que a
104 produção e a liberação de cianotoxinas estejam relacionadas a algum tipo de
105 comunicação controlada por *quorum sensing* (Braun e Bachofen, 2004).

106 Neste contexto, este estudo testa as hipóteses de que a liberação das
107 microcistinas em *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 obedece a um ritmo
108 circadiano, e que as concentrações das microcistinas intracelulares por quota celular
109 aumentam progressivamente em relação ao aumento da densidade populacional.
110 Para tanto, os objetivos do estudo foram investigar a ocorrência de liberação ativa
111 de microcistinas, a presença de um ritmo endógeno controlando a liberação de
112 microcistinas, e a influência da densidade celular nas concentrações de
113 microcistinas intracelular por quota celular (MCI) em *M. aeruginosa* BCCUSP232.

114 2. Material e Métodos

115 2.1. Cepa, condições de cultivo e curva de crescimento

116 Foi utilizada a cepa clonal e não-axênica *M. aeruginosa* BCCUSP232
117 produtora de microcistinas, isolada no Lago das Garças, estado de São Paulo, Brasil
118 (Bittencourt-Oliveira et al., 2003). A cepa foi mantida em câmaras climáticas sob
119 condição controlada de temperatura ($23 \pm 0,5$ °C), fotoperíodo (12:12hs
120 claro:escuro), intensidade luminosa ($40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medida com sensor esférico
121 subaquático fotômetro LI-COR, mod. LI-250) e meio líquido BG-11, pH 7,4 (Rippka
122 et al., 1979) modificado por Bittencourt-Oliveira (2000) (com a substituição do ferro
123 citrato de amônia por cloreto férrico).

124 Para determinação das fases exponencial e estacionária do cultivo foi
125 realizada uma curva de crescimento (Fig. 1) em erlenmeyers de 1L de capacidade
126 contendo 800 mL de cultura, meio líquido BG-11 e pH 7,4. Os cultivos foram
127 iniciados com 10^6 cel.mL⁻¹ nas condições descritas acima.

128 Para estimativa da densidade celular e estimativa da taxa de crescimento (K')
129 (Fig.1) (Guillard, 1973) utilizou-se a contagem direta das células com o uso de
130 câmara Fuchs Rosenthal e microscópio óptico binocular (Nikon E200, Melville, NY,
131 USA). Foram retiradas alíquotas de 2 mL diariamente em condições axênicas,
132 preservadas com lugol acético 10% e contadas imediatamente. Um número mínimo
133 de 400 células foi contado por amostra para uma estimativa de erro de 10%
134 (Guillard, 1973). Sempre que possível foram contadas 1.600 células, onde a
135 estimativa de erro foi de 5% (Lund et al., 1958). As curvas de crescimento, assim
136 como as contagens por amostra, foram feitas em trélicas.

137 2.2. Experimentos em ciclos de 24 horas: fases de crescimento exponencial e
138 estacionária.

139 2.2.1. Fase exponencial

140 Para a investigação das concentrações de microcistinas intracelulares por
141 quota celular (MCI) em ciclos de 24 horas (12:12h claro:escuro e 12:12h claro:claro)
142 foram utilizados erlenmeyers de 1L de capacidade contendo 800mL de cultura, meio
143 BG-11, pH 7,4 com cultivo iniciado em 10^6 células.mL⁻¹ sendo mantidas nas
144 condições descritas no item 2.1. Todos os experimentos foram feitos em trélicas.

145 No 10º e 13º dia da fase exponencial do crescimento de *M. aeruginosa*
146 (BCCUSP232) (Fig.1) para os ciclos, respectivamente, claro:escuro e claro:claro
147 foram coletados 2 mL a cada 2 horas para a análise das concentrações de
148 microcistinas intra e extracelulares. As amostras foram centrifugadas em microtubos
149 de polietileno em 14.000 rpm durante 3 min, em temperatura ambiente para
150 separação do *pellet* (MC intracelular) e do sobrenadante (MC extracelular). O
151 sobrenadante foi separado cuidadosamente do *pellet* com auxílio de um pipetador
152 automático e acondicionado em novos microtubos de polietileno de 1,5 mL de
153 volume. *Pellet* e sobrenadante foram imediatamente congelados e armazenados a -
154 80°C até o momento da análise das microcistinas. Antes de iniciar o ciclo claro:claro
155 os cultivos foram aclimatados na presença de luz contínua por 48 horas.

156 Simultaneamente a esse processo foram retiradas amostras de 2 mL e
157 preservadas com lugol acético 10% para a estimativa da densidade celular e
158 posterior cálculo das MCI e concentrações microcistina extracelular por quota celular
159 equivalente (MCE).

160

161 2.2.2. Fase Estacionária

162 Em um novo cultivo foi realizado o ciclo 12:12h claro:escuro na fase
163 estacionária de crescimento. As amostras foram coletadas no 35º dia de cultivo
164 (Fig.1). Os demais procedimentos foram iguais aos ciclos da fase exponencial.

165 2.3. *Análise de MCI e MCE nos ciclos de 24 horas: fases de crescimento*
166 *exponencial e estacionária.*

167 As concentrações de microcistinas foram analisadas pelo método ELISA
168 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) com a utilização do kit em placa para
169 quantificação de microcistinas em água (Beacon Analytical Systems Inc., Portland,
170 ME, USA), de acordo com instruções do fabricante. As análises foram realizadas em
171 réplicas com auxílio de uma leitora de microplaca (ASYS Hitech GmbH, Nordstrasse
172 4, modelo A – 5301 Eugendorf, Áustria). A faixa de detecção dos ensaios foi de 0,10
173 a 2,0 partes por bilhão (PPB) (ng.mL^{-1}).

174 Para a análise da MCI os *pellet* foram acondicionados em microtubos de
175 polietileno, secos em *speedvac* (modelo Eppendorf AG 22331, Hamburg, Alemanha)
176 e ressuspensos em volumes de 3 mL. As células foram lisadas com auxílio de um
177 sonicador (Ultrasonic Cell Disruptor XL - Misonix), em banho com gelo, e analisadas.
178 Quando necessário, foram realizadas diluições para alcançar a faixa de detecção
179 estabelecida pelo método. Para se obter as MCI, foi feita uma relação entre a
180 concentração de microcistina (ng.mL^{-1}) e a densidade celular (cel.mL^{-1}). As MCE
181 foram medidas diretamente do sobrenadante e, igualmente relacionadas com a
182 densidade celular da amostra no volume analisado.

183 As unidades das MCI e MCE foram expressas em fg.cel^{-1} .

184

185 2.4. *Análise estatística*

186 Os dados das MCI e MCE foram expressos como valores médios \pm erro
187 padrão (EP). Para cada variável experimental foi analisada a normalidade dos dados
188 através do teste Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951). Cada variável experimental
189 também teve os dados testados para as premissas básicas da análise de variância
190 (ANOVA um critério). Sempre que a hipótese nula de variância foi rejeitada, o teste

191 de Tukey foi empregado e foram discriminadas as diferenças estatisticamente
192 significativas ($p < 0,05$) entre cada par de valores médios (Neter et al., 1985). As
193 análises foram realizadas com auxílio do programa SAS Institut 9.2.

194

195 **3. Resultados**

196 *3.1. Liberação ativa de microcistinas*

197 Em todos os ciclos analisados, as MCI mostraram aumentos e reduções
198 simultâneos. As reduções de MCI demonstraram que as microcistinas foram
199 liberadas para o meio circundante de forma ativa, ou seja, não por lise celular. Esse
200 padrão da MCI ocorreu ao longo de 24 horas nos ciclos analisados, sendo mais
201 evidente na fase estacionária (Tabela 1). Um exemplo disso é que no ciclo
202 claro:escuro entre 16 e 18h, a diferença média de MCI foi de $14,62 \text{ fg.cel}^{-1}$, ou seja,
203 uma variação de aproximadamente 66,7%. As maiores diferenças entre MCI em
204 horários de coleta consecutivos ficaram nos períodos entre 6 a 10h em todos os
205 ciclos estudados e 16 e 24h do claro:escuro, fase estacionária (Tabela 2).

206

207 *3.2. Ciclos de 24 horas da fase exponencial*

208 As MCI exibiram um ritmo endógeno controlado em função do tempo, em um
209 período de 24 horas. As MCI e MCE foram inversamente proporcionais para os
210 ciclos claro:escuro e claro:claro, exceto entre os horários 2, 4, 14 e 20h
211 (claro:escuro) e 18, 20 e 22h (claro:claro) (Fig. 2A-D; Tabela 1). As maiores
212 concentrações encontradas foram das MCE (Fig.2B,D; Tabela 1).

213 Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as variações
214 de MCI entre os ciclos claro:escuro e claro:claro ($F=3,87$; $p > 0,05$). Porém, no ciclo
215 claro:escuro os valores das MCI foram levemente mais elevados do que no
216 claro:claro, com exceção das 4, 6, 18 e 24h (Tabela 1). O maior pico das MCI

217 ocorreu no ciclo claro:escuro às 10 horas (6,15 fg.cel⁻¹), por sua vez no claro:claro
218 isso aconteceu às 6 horas (5,43 fg.cel⁻¹) (Fig. 2A,C; Tabela 1).

219 O comportamento entre as MCE, aumentos e reduções simultâneos entre os
220 horários correspondentes foi semelhante entre os dois ciclos, não apresentando
221 diferenças estatísticas significativas ($F=1,72$; $p>0,05$) (Fig.2B,D; Tabela 1).

222 As concentrações de microcistinas totais (MCI e MCE) nos ciclos claro:escuro
223 e claro:claro apresentaram variações semelhantes entre os mesmos horários,
224 porém, houve diferença estatística significativa ($F=21,55$; $p<0,05$) (Fig. 2). O ciclo
225 claro:claro apresentou as menores concentrações de microcistinas totais entre
226 todos os horários (Fig. 3).

227

228 *3.3. Influência da densidade populacional no ciclo 12:12h claro:escuro das fases* 229 *exponencial e estacionária*

230 Não houve diferença estatística significativa na densidade populacional entre
231 os horários durante a fase exponencial ($F=0,20$; $p>0,05$). Da mesma forma, não
232 houve diferença estatística significativa durante a fase estacionária ($F=0,03$; $p>0,05$).
233 Em ambas as fases de crescimento durante os ciclos claro:escuro, as concentrações
234 de MCI (Fig.4) e MCE (Fig.5) apresentaram variação semelhante ao longo das
235 horas.

236 Ao confrontar as concentrações de MCI entre as fases de crescimento foram
237 observadas diferenças estatísticas significativas entre os horários ($F=403,81$;
238 $p<0,05$), sendo mais elevadas na última etapa, exceto às 8 horas (Fig. 4). As
239 concentrações de MCI na fase estacionária as 10 e 14 horas chegaram a ser,
240 respectivamente, 4,7 e 4,9 vezes maiores que na fase exponencial, nos mesmos
241 horários (Tabela 1). Por outro lado, em relação às concentrações de MCE, não

242 foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre as duas fases de
243 crescimento nos ciclos claro:escuro ($F=1,73$; $p>0,05$) (Fig. 5).

244 Os maiores valores das MCI ocorreram no período claro de ambos os ciclos
245 claro:escuro das fases exponencial e estacionária (Fig.4).

246

247 **4. Discussão**

248 Neste estudo foram identificadas variações nas MCI ao longo de 24 horas em
249 *M. aeruginosa*, as quais se repetiram em dois ciclos (claro:escuro e claro:claro) na
250 fase exponencial e um claro:escuro na estacionária. Esses resultados
251 caracterizaram um controle endógeno na biossíntese de microcistinas em *M.*
252 *aeruginosa* BCCUSP232. Resultados semelhantes foram encontrados por
253 Bittencourt-Oliveira et al. (2005) que relataram a presença de um ritmo circadiano
254 controlando a biossíntese de MCs em *M. panniformis* em dois ciclos 12:12h
255 claro:escuro e claro:claro durante a fase exponencial de crescimento.

256 Embora não tenha ocorrido diferenças estatísticas significativas entre os
257 ciclos claro:escuro e claro:claro, neste último as concentrações de MCI e MCE foram
258 menores que as encontradas no ciclo claro:escuro, na maioria dos horários, durante
259 a fase exponencial, assim como ocorreu alteração no maior pico de MCI (Fig. 2A-D).
260 Essas alterações nas concentrações de microcistinas podem estar relacionadas ao
261 estresse oxidativo devido à intensa exposição à luz. De acordo com Wood et
262 al.(2010) a luz é um estímulo externo que pode influenciar os ritmos circadianos em
263 cianobactérias, pois uma proteína CikA repassa sinais ambientais para o oscilador
264 circadiano utilizando um estado celular redox como medida da luz. Na presente
265 pesquisa, uma maior exposição à luz como ocorreu no ciclo claro:claro resultou em
266 uma redução nas MCI e MCE em *M. aeruginosa*. Resultados semelhantes foram
267 encontrados por Bittencourt-Oliveira et al. (2005), quando as MCI das duas variantes

268 de microcistinas identificadas em *M. panniformis* (MC-LR e [ASP³] – LR) foram
269 reduzidas durante o ciclo claro:claro em relação ao claro:escuro.

270 Um aspecto importante sobre a diferença entre os dois experimentos
271 realizados na fase exponencial está na vantagem que um ciclo claro:escuro fornece
272 aos organismos. Sabe-se que a competição entre cepas de cianobactérias em
273 cultivo oferece vantagens àquelas espécies cujo ritmo circadiano esteja mais
274 próximo ao ciclo claro:escuro presente no ambiente natural (Ouyang et al., 1998).
275 Desta forma, os ciclos que se assemelham ao ambiente natural fornecem vantagens
276 aos organismos que possuem o ritmo circadiano próximo a este ciclo natural.

277 No presente estudo, os maiores valores das MCI foram evidenciados durante
278 os períodos com luz. Um estudo recente sobre a expressão global do genoma de *M.*
279 *aeruginosa* durante um ciclo claro:escuro (Straub et al., 2011) mostrou que a
280 biossíntese de microcistinas e outros metabólitos secundários ocorre
281 essencialmente durante o período de luz. Esse fato sugere que esses metabólitos
282 podem interagir diretamente com a luz e com o controle endógeno exercido através
283 dos genes *kai*.

284 Neste presente estudo ocorreram maiores concentrações de MCE durante a
285 fase exponencial, sendo esse comportamento não se repetiu em fase estacionária.
286 Não se conhece como ocorre todo o processo de degradação das microcistinas.
287 Porém é sabido que em ambientes naturais esses metabólitos podem ser oxidados
288 por ozônio e outros agentes oxidantes e degradados por intensa luz ultravioleta (UV)
289 (Sivonen e Jones, 1999). O período de degradação total de microcistinas pode variar
290 de 2 dias a mais de 3 semanas dependendo do corpo d'água, condições climáticas,
291 variáveis ambientais e até do histórico de florações do ambiente (Rapala et al., 1994;
292 Sivonen e Jones, 1999; Manage et al., 2010).

293 Em cultivo, alguns estudos têm demonstrado que as bactérias podem
294 degradar microcistinas utilizando-as como fonte de carbono (Park et al., 2001;
295 Gomes et al., 2009). Park et al. observaram que em cultivo com bactéria, a
296 degradação total das microcistinas LR e RR ocorreu em quatro dias. Extratos
297 celulares da bactéria *Springomonas* sp. B-9 degradam microcistinas totalmente em
298 24 horas (Imanishi, et al., 2005). No presente estudo, as MCE foram mais elevadas
299 durante a fase exponencial em relação às MCI. Na fase estacionária as MCI foram
300 mais elevadas em relação às MCE. Por se tratar de cultivos não-axênicos e bem
301 mais velhos, na fase estacionária pode ter ocorrido uma maior influência de
302 bactérias através de possível degradação e redução ao longo das horas nas MCE.

303 A lise celular é atribuída como o principal fator responsável pela liberação das
304 cianotoxinas para o meio extracelular (Sivonen e Jones, 1999). Em cultivo, quando
305 são identificadas variações nas concentrações intra e extracelulares dessas
306 cianotoxinas, é sugerido que tais variações estejam relacionadas às lises
307 ocasionadas devido às diferentes fases de crescimento (Pitsch et al., 2002).
308 Contudo, o presente estudo mostrou a ocorrência da liberação das microcistinas ao
309 longo das horas e essa liberação foi controlada por um ritmo endógeno, circadiano.
310 As variações das MCI e MCE ao longo das horas em ciclos de 24 horas ocorreram,
311 geralmente, de forma inversamente proporcional, indicando que essa liberação
312 ocorre ativamente em *M. aeruginosa* BCCUSP232.

313 Em ambas as fases exponencial e estacionária foi verificado um padrão
314 oscilatório das concentrações de microcistinas. Contudo, Johnson e Golden (1999)
315 estudando uma cepa de *Synechococcus* sp. mostraram que na fase estacionária de
316 crescimento ritmos circadianos se estabilizam, sendo mais rapidamente
317 evidenciados.

318 As mais elevadas concentrações de MCI em *M. aeruginosa* BCCUSP232
319 ocorreram quando o cultivo alcançou as maiores densidades (fase estacionária) (Fig.
320 4). Carneiro et al. (2009) encontraram resultados semelhantes nas concentrações de
321 saxitoxina e neo-saxitoxina em *C. racibroskii* em diferentes fases de crescimento.

322 Já foi comprovado que bactérias regulam a expressão dos conjuntos de
323 genes especializados em resposta à densidade populacional pela emissão de sinais
324 químicos através do *quorum sensing* (Cha et al., 1998). Na cianobactéria
325 *Gloeotheca* sp. PCC6909 a presença de N-octanoil homoserina lactona, uma
326 molécula comum dos sistemas funcionais de acil homoserina lactona presente em
327 bactérias responsáveis pela comunicação intercelular, segue o parâmetro
328 característico do *quorum sensing* (Sharif et al., 2008).

329 O presente estudo mostrou que *M. aeruginosa* BCCUSP232 tem as MCI
330 aumentadas em relação às diferentes fases de crescimento. Considerando que a
331 real função das cianotoxinas ainda é bastante discutida e, comumente, as
332 concentrações de cianotoxinas por quota celular são mais elevadas mediante as
333 maiores densidades populacionais, a existência de uma comunicação semelhante a
334 *quorum sensing* entre cianobactérias, possibilitando à esses metabólitos uma
335 característica de moléculas sinalizadoras, pode ser considerada.

336

337 **5. Conclusões**

338 A liberação ativa de microcistinas em *M. aeruginosa*, controlada por um ritmo
339 endógeno, foi evidenciada no presente estudo. Este fato indicou uma forma
340 alternativa e possivelmente predominante de liberação de cianotoxinas por
341 cianobactérias, e não apenas por lise celular.

342 As concentrações de MCI foram mais elevadas em relação ao aumento da
343 densidade celular em *M. aeruginosa*. Este fato pode estar relacionado à existência

344 de uma comunicação entre cianobactérias através de suas cianotoxinas, o que
345 explicaria muitas questões ainda discutidas quanto à real função desses metabólitos.

346

347 **6. Agradecimentos**

348 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
349 ao projeto CNPq /CT-Hidro nº 576890/2008-1, e à Fundação de Amparo à Ciência e
350 Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

351

352 **7. Referências**

353 Bittencourt-Oliveira, M.C., 2000. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz.
354 (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications.
355 *Algol. Stud.* 99 (1), 29-37.

356 Bittencourt-Oliveira, M.C., 2003. Detection of potential microcystin-producing
357 cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful*
358 *Algae* 2 (1), 51-60.

359 Bittencourt-Oliveira, M.C., Kujbida, P., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Moura,
360 A.N., Colepicolo, P., Pinto, E., 2005. A novel rhythm of microcystin biosynthesis
361 is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al.
362 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326 (3), 687-694.

363 Bouvy, M.A., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M., Moura, A.N., 2000. Occurrence of
364 *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the
365 1998 drought. *Aquat. Microb. Ecol.* 23 (1), 13-27.

366 Bouvy, M.A., Nascimento, S.M., Molica, R.J.R., Ferreira, A., 2003. Limnological
367 features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought.
368 *Hydrobiologia* 493 (1-3), 115-130.

- 369 Braun, E., Bachofen, R., 2004. Homoserine-lactones and microcystin in
370 cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. *Hydrobiologia* 522 (1-3), 271-280.
- 371 Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *J.*
372 *Appl. Bacteriol.* 72 (6), 445-459.
- 373 Carneiro, R.L., Santos, M.E.V., Pacheco, A.B.F., Azevedo, S.M.F.O., 2009. Effects of
374 light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins
375 production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *J. Plankton Res.*
376 31 (5), 481-488.
- 377 Cha, C., Gao, P., Chen, Y., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of Acyl-
378 Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-
379 Associated Bacteria. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 11 (11), 1119-1129.
- 380 Chu, W., Lu, F., Zhu, W., Kang, C., 2010. Isolation and characterization of new
381 potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. *J. Appl. Microbiol.*
382 110 (1), 202-208.
- 383 Gomes, A.M.A., Oliveira, A.C.P., Azevedo, S.M.F.O, 2009. Efeito de diferentes
384 concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de
385 microcistinas (cianotoxina). *Oecol. Bras.*, 13 (2), 402-412.
- 386 Grobbelaar, N., Huang, T.C., Lin, H.Y., Chow, T.J. 1986. Dinitrogen-fixing
387 endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 37 (2), 173-
388 177.
- 389 Guillard, R.R.L., 1973. Division rates, In: Stein, J. (ED), *Handbook of Phycological*
390 *Methods: Culture methods and growth measurements.* Cambridge University
391 Press, Cambridge, pp. 289-311.

- 392 Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Tsuji, K., Harada, K., 2005. Bacterial degradation
393 of microcystins and nodularin. *Chem. Res. Toxicol.* 18 (3), 591-598.
- 394 Iwasaki, H., Kondo, T., 2004. Circadian Timing Mechanism in the Prokaryotic Clock
395 System of Cyanobacteria. *J. Biol. Rhythms* 19 (5), 436-444.
- 396 Jochimsen, E.M., Wayne, M.D., Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson,
397 S.T., Holmes, C.M.D., Antunes, M.B.D., Melo, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T.,
398 Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to
399 microcystins at a hemodialyses center in Brazil. *New Engl. Jour. Medicine* 338
400 (5), 873-878.
- 401 Johnson, C.H., Golden, S.S., 1999. Circadian Programs in Cyanobacteria:
402 Adaptiveness and Mechanism. *Annu. Rev. Microbiol.* 53 (1), 389-409.
- 403 Lorne, J., Scheffer, J., Lee, A., Painter, M., Miao, V.P.W., 2000. Genes controlling
404 circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*
405 189 (2), 129-133.
- 406 Lund, J.W.G., Kipling, C., Lecren, E.D., 1958. The inverted microscope method of
407 estimating algal numbers and the statistical basis of estimations of counting.
408 *Hydrobiologia* 11 (2), 143-170.
- 409 Manage, P.M., Edwards, C., Lawton, L.A., 2010. Bacterial degradation of
410 microcystin. In: Hamamura, N., Suzuki, S., Mendo, S., Barroso, C.M., Iwata, H.,
411 Tanabe, S. (Eds.). *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry —*
412 *Biological Responses to Contaminants.* TERRAPUB, pp. 94-107.
- 413 Massey, F.J., 1951. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *J. Am. Stat.*
414 *Assoc.* 46 (253), 68-78.

- 415 Meriluoto, J.A., Spoof, L.E., 2008. Cyanotoxins: sampling, sample processing and
416 toxin uptake. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 483-499.
- 417 Mulholland, M.R., Capone, D.G., 2000. The nitrogen physiology of the marine N₂-
418 fixing cyanobacteria *Trichodesmium* spp. *Trends Plant Sci.* 5 (4), 1360-1385.
- 419 Neter, J., Wasserman, W., Kutner, M.H., 1985. *Applied Linear Statistical Models—*
420 *Regression, Analysis of Variance and Experimental Designs*, second ed., R.D.
421 Irwin, Inc., Illinois.
- 422 Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S., Johnson, C.H., 1998.
423 Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad.*
424 *Sci.* 95 (15), 8660-8664.
- 425 Park, H., Iwami, C., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Okino, T., Hayashi, H., 1998.
426 Temporal Variabilities of the Concentrations of Intra- and Extracellular
427 Microcystin and Toxic *Microcystis* Species in a Hypertrophic Lake, Lake Suwa,
428 Japan (1991–1994). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13 (1), 61-72.
- 429 Park, H.D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A., Kato, K. 2001.
430 Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium
431 isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.* 16 (4), 337-343.
- 432 Pietsch, J., Bornmann, K., Schmidt, W. 2002. Relevance of Intra- and Extracellular
433 Cyanotoxins for Drinking Water Treatment. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 30 (1), 7-
434 15.
- 435 Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K., Niemelä, S. I. 1994. Biodegradability and
436 adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Letters*
437 *in Applied Microbiol.*, 19 (6), 423-428.

- 438 Rippka, R., Deruelles J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic
439 assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J.*
440 *gen. microbial.* 111(1), 1– 61.
- 441 Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., Sherman, L.A. 1994. Oscillating
442 behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the
443 cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* 176 (6), 1585-
444 1597.
- 445 Schopf, J.W., 1993. Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of
446 the Antiquity of Life. *Science* 260 (5108), 640-646.
- 447 Sharif, D.I., Gallon, J., Smith, C.J., Dudley, E., 2008. Quorum sensing in
448 Cyanobacteria: *N*-Octanoyl-homoserine lactone release and response by the
449 epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *The ISME Journal* 2
450 (12), 1171-1182.
- 451 Sivonen, K.; Jones, G. Cyanobacterial toxins, 1999. In: Chorus, I.; Bartram, J. (Eds).
452 Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences,
453 Monitoring and Management. E & FN SPON, London, Pp.41-91.
- 454 Staal, M., Rabouille, S., Stal, L.J., 2007. On the role of oxygen for nitrogen fixation in
455 the marine cyanobacterium *Trichodesmium* sp. *Environ. Microbiol.* 9 (3),727-736.
- 456 Stewart, I., Webb, P.M., Schluter, P.J., Shaw, G.R., 2006. Recreational and
457 occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal
458 and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic
459 assessment. *Environ. Health* 5 (6), 1-13.

- 460 Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., Marsac, N.T., Humbert, J., 2011. A Day in the
461 life of *Microcystis aeruginosa* Strain PCC7806 as revealed by a transcriptomic
462 analysis. PLoS One 6 (1), 1-12.
- 463 Sweeney, B.M., Borgese, M.B., 1989. A circadian rhythm in cell division in a
464 prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. J. Phycol. 25 (1), 183-
465 186.
- 466 Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C.,
467 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25 (4),
468 365-404.
- 469 Wood, T.L., Bridwell-Rabb, J., Kim, Y., Gao, T., Chang, Y., LiWang, A., Barondeau,
470 D.P., Golden, S.S., 2010. The KaiA protein of the cyanobacterial circadian
471 oscillator is modulated by a redox-active cofactor. PNAS 107 (13), 5804-5809.
- 472 Yen, U.C., Huangb, T.C., Yen, T.C., 2004. Observation of the circadian
473 photosynthetic rhythm in cyanobacteria with a dissolved-oxygen meter. Plant
474 Sci.166 (4), 949-952.
- 475 Yuan, M., Carmichael, W.W., Hilborn E.D., 2006. Microcystin analysis in human sera
476 and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. Toxicon 48 (6), 627-640.

477 **Tabela 1.** Concentrações de microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) e microcistinas extracelulares por quota celular
 478 equivalente (MCE) (fg.cel^{-1}) da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 nos ciclos 12:12h claro:escuro e claro:claro durante as fases
 479 exponencial e estacionária de crescimento. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($n=3$).

Horas	Fase Exponencial				Fase Estacionária	
	Claro: Escuro		Claro: Claro		Claro: Escuro	
	MCI	MCE	MCI	MCE	MCI	MCE
02	4,79 \pm 0,32	12,43 \pm 0,56	4,44 \pm 0,79	11,25 \pm 1,13	6,65 \pm 1,51	15,01 \pm 3,74
04	4,56 \pm 0,65	11,79 \pm 2,45	5,06 \pm 0,50	9,33 \pm 0,91	8,63 \pm 1,24	5,76 \pm 1,27
06	4,73 \pm 0,46	11,30 \pm 0,88	5,43 \pm 0,86	9,28 \pm 0,74	5,88 \pm 0,10	16,60 \pm 0,98
08	4,31 \pm 1,29	18,63 \pm 1,35	3,84 \pm 0,66	12,25 \pm 0,42	1,96 \pm 0,06	16,08 \pm 0,76
10	6,15 \pm 0,96	11,56 \pm 1,76	4,58 \pm 0,11	11,60 \pm 1,33	29,07 \pm 4,46	12,53 \pm 2,00

Tabela 1. Continuação

480

Horas	Fase Exponencial				Fase Estacionária	
	Claro: Escuro		Claro: Claro		Claro: Escuro	
	MCI	MCE	MCI	MCE	MCI	MCE
12	5,14±1,03	14,57±0,91	4,71±0,20	10,85±1,15	17,36±2,26	13,76±1,86
14	5,49±0,65	16,82±3,55	4,27±0,28	10,87±1,40	26,81±3,66	15,70±2,04
16	4,67±0,73	15,20±1,88	4,37±0,32	8,43±0,50	21,93±1,99	12,51±1,17
18	4,52±0,98	15,35±1,67	4,86±0,77	10,30±0,78	7,31±0,06	7,88±0,12
20	4,50±0,54	12,07±0,99	4,18±0,46	7,93±0,80	12,35±0,27	5,17±0,09
22	3,70±0,67	15,64±2,16	4,35±0,30	11,87±2,64	5,51±2,34	5,25±1,49
24	5,43±0,45	10,75±1,46	4,69±0,56	11,24±0,24	12,27±3,95	14,56±3,66

481 **Tabela 2.** Aumentos (A) e reduções (R(-)) das concentrações de microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) (fg.cel^{-1}) e
 482 microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) (fg.cel^{-1} equivalente) da cepa *M. aeruginosa* (BCCUSP232) entre
 483 horários consecutivos durante ciclos de 12:12h claro:escuro e claro:claro das fases exponencial e estacionária. Valores percentuais de
 484 aumento e redução (%).

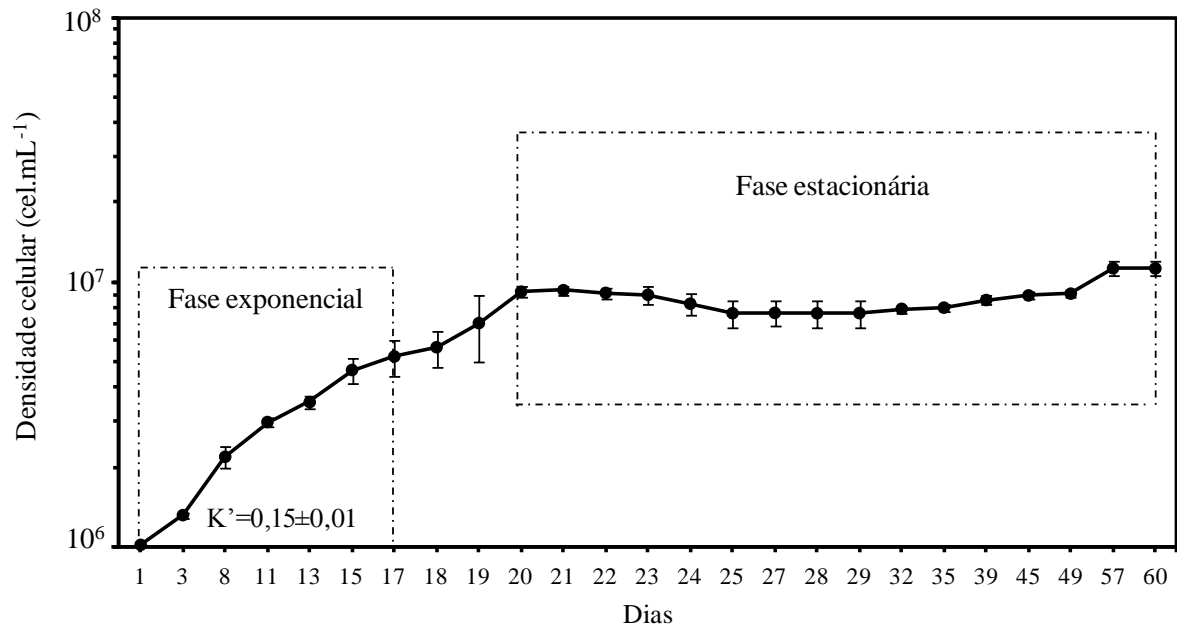
Horas	Fase Exponencial						Fase Estacionária					
	Claro: Escuro				Claro: Claro				Claro: Escuro			
	MCI		MCE		MCI		MCE		MCI		MCE	
	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%
2-4	-0,23	4,80	-0,64	5,15	0,62	12,25	-1,92	17,07	1,98	22,94	-9,25	61,63
4-6	0,17	3,60	-0,49	4,16	0,37	6,81	-0,05	0,54	-2,75	31,87	10,84	65,30
6-8	-0,42	8,88	7,33	39,35	-1,59	29,28	2,97	24,25	-3,92	66,67	-0,52	3,15

Tabela 2. Continuação.

Horas	Fase Exponencial								Fase Estacionária			
	Claro: Escuro				Claro: Claro				Claro: Escuro			
	MCI		MCE		MCI		MCE		MCI		MCE	
	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%
8-10	1,84	32,85	-7,07	37,95	0,74	16,16	-0,65	5,31	27,11	42,58	-3,55	22,08
10-12	-1,01	16,42	3,01	20,26	0,13	2,76	-0,75	6,47	-11,71	40,28	1,23	8,94
12-14	0,35	6,38	2,25	13,38	-0,44	9,34	0,02	0,19	9,45	35,25	1,94	12,36
14-16	-0,82	14,94	-1,62	9,04	0,10	2,29	-2,44	22,45	-4,88	18,20	-3,19	20,32
16-18	-0,15	3,21	0,15	0,98	0,49	10,08	1,87	18,16	-14,62	66,67	-4,63	37,01
18-20	-0,02	0,44	-3,28	21,37	-0,68	13,99	-2,37	23,01	5,04	40,81	-2,71	34,39

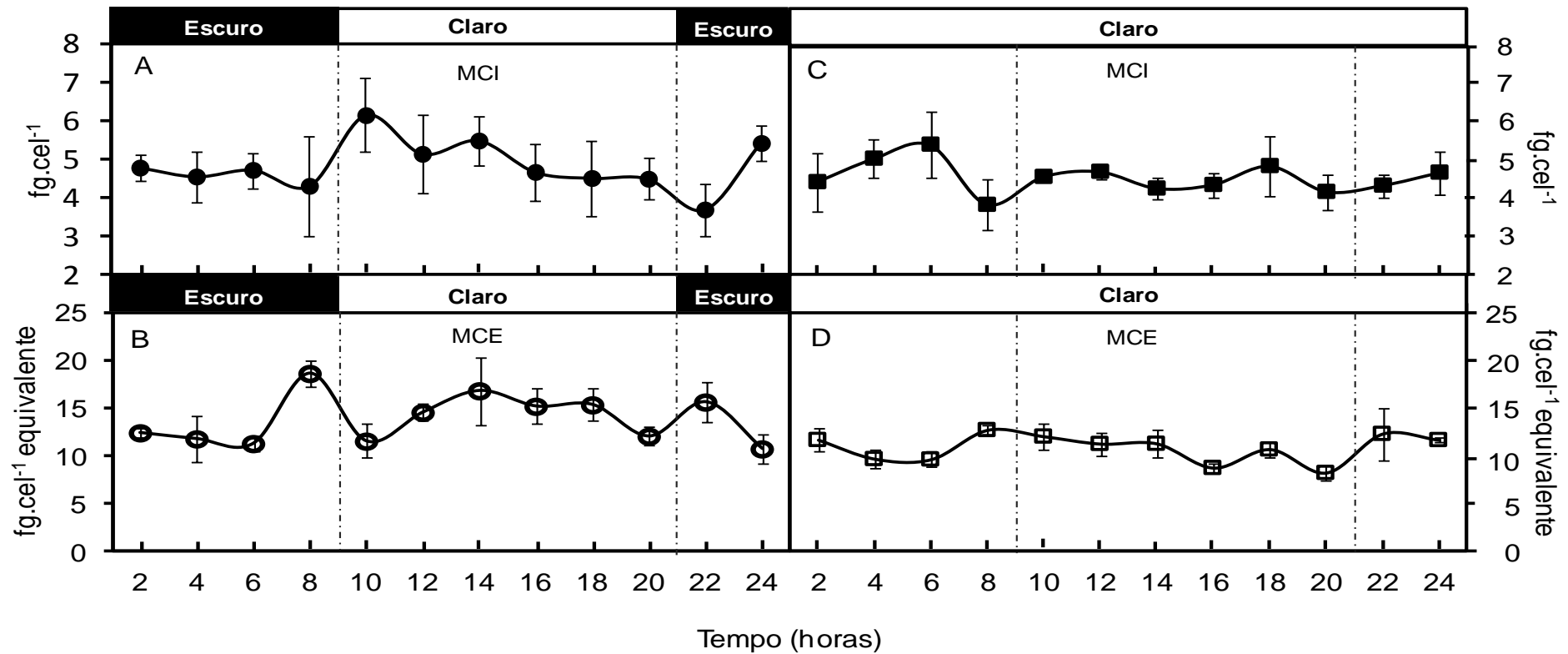
Tabela 2. Continuação.

Horas	Fase Exponencial								Fase Estacionária			
	Claro: Escuro				Claro: Claro				Claro: Escuro			
	MCI		MCE		MCI		MCE		MCI		MCE	
	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%	A/R(-)	%
20-22	-0,80	17,78	3,57	22,83	0,17	3,91	3,94	33,19	-6,84	55,39	0,08	1,52
22-24	1,73	31,86	-4,89	31,27	0,34	7,25	-0,63	5,31	6,76	55,09	9,31	63,94
24-2	-0,64	11,79	1,68	13,52	-0,25	5,33	0,01	0,09	-5,62	45,80	0,45	3,00

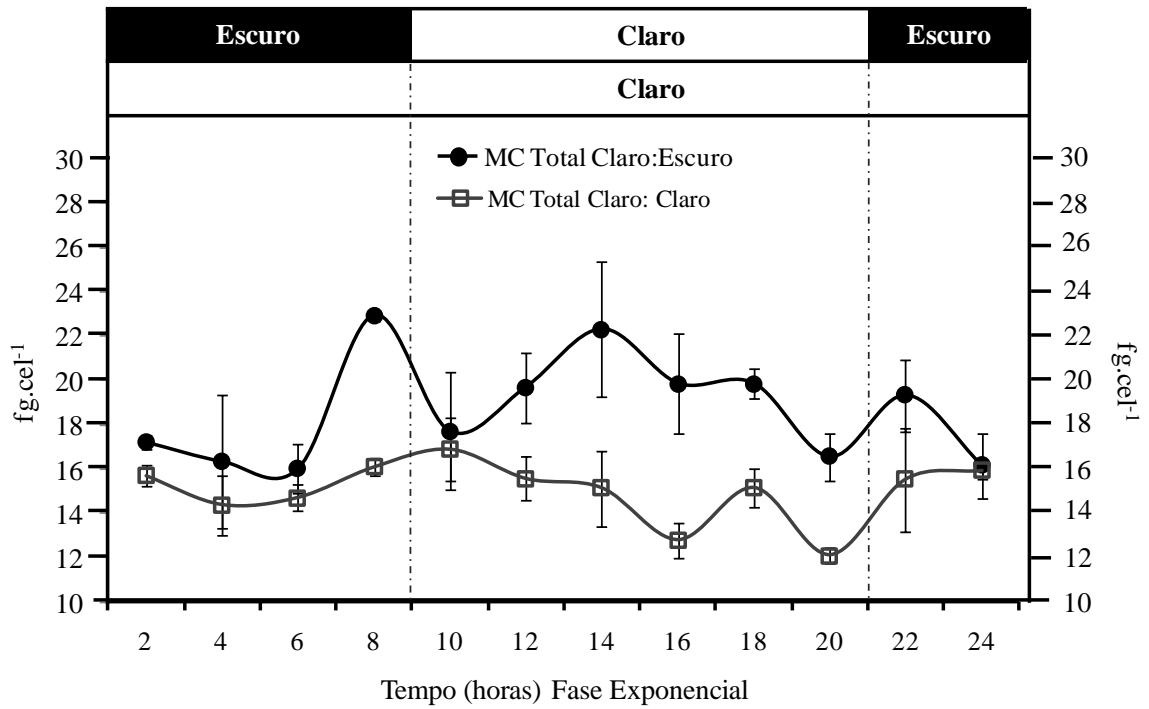


485 **Fig.1.** Curva de crescimento de *M. aeruginosa* BCCUSP232. As barras representam
 486 o desvio padrão ($n=3$).

487

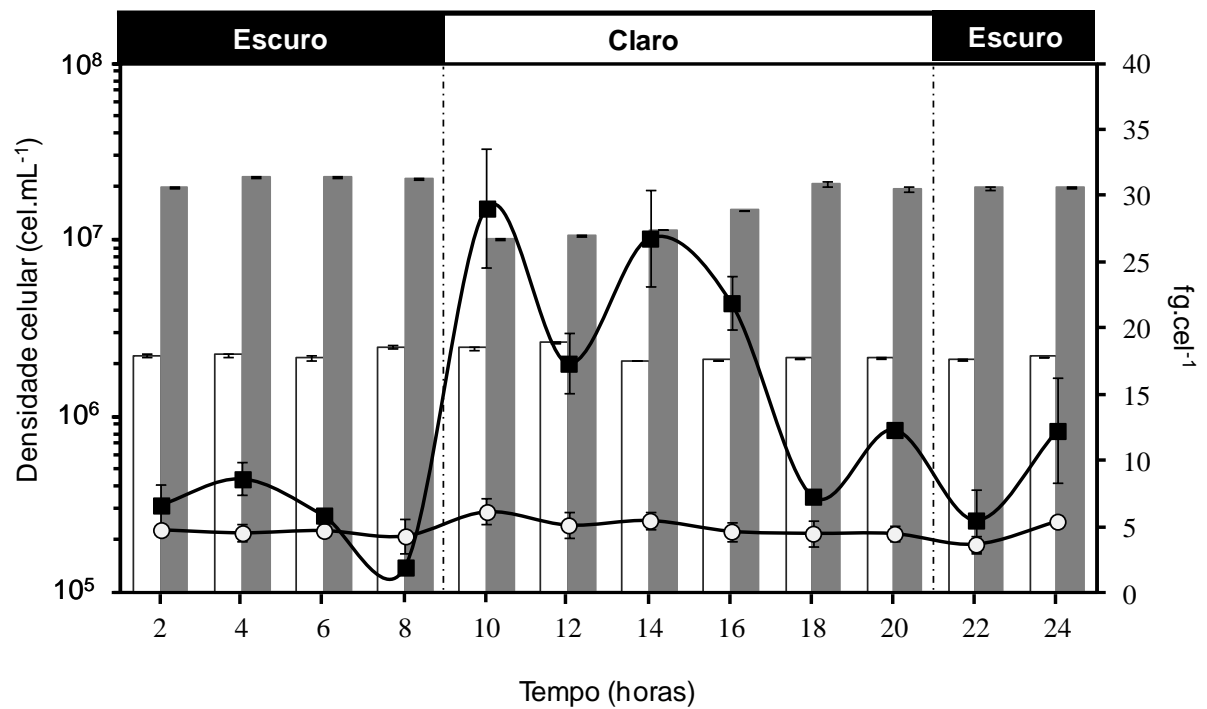


488 **Fig. 2.** Variação das concentrações de microcistinas da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232 em ciclos 12:12h claro:escuro e claro:claro
 489 durante a fase exponencial de crescimento. A. Microcistinas intracelulares por quota celular (MCI) (fg.cel^{-1}), do ciclo claro:escuro B.
 490 Microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) (fg.cel^{-1} equivalente) ciclo claro:escuro. C. Microcistinas intracelulares
 491 por quota celular (MCI) (fg.cel^{-1}) do ciclo claro:claro. D. Microcistinas extracelulares por quota celular equivalente (MCE) (fg.cel^{-1}
 492 equivalente) ciclo claro:claro. As barras representam o erro padrão ($n=3$).



493 **Fig. 3.** Variação das concentrações de MC total (MCI e MCE) (fg.cel⁻¹) da cepa *M.*
 494 *aeruginosa* BCCUSP232 nos ciclos 12:12hs claro:escuro e claro:claro durante a fase
 495 exponencial de crescimento. As barras representam o erro padrão ($n=3$).

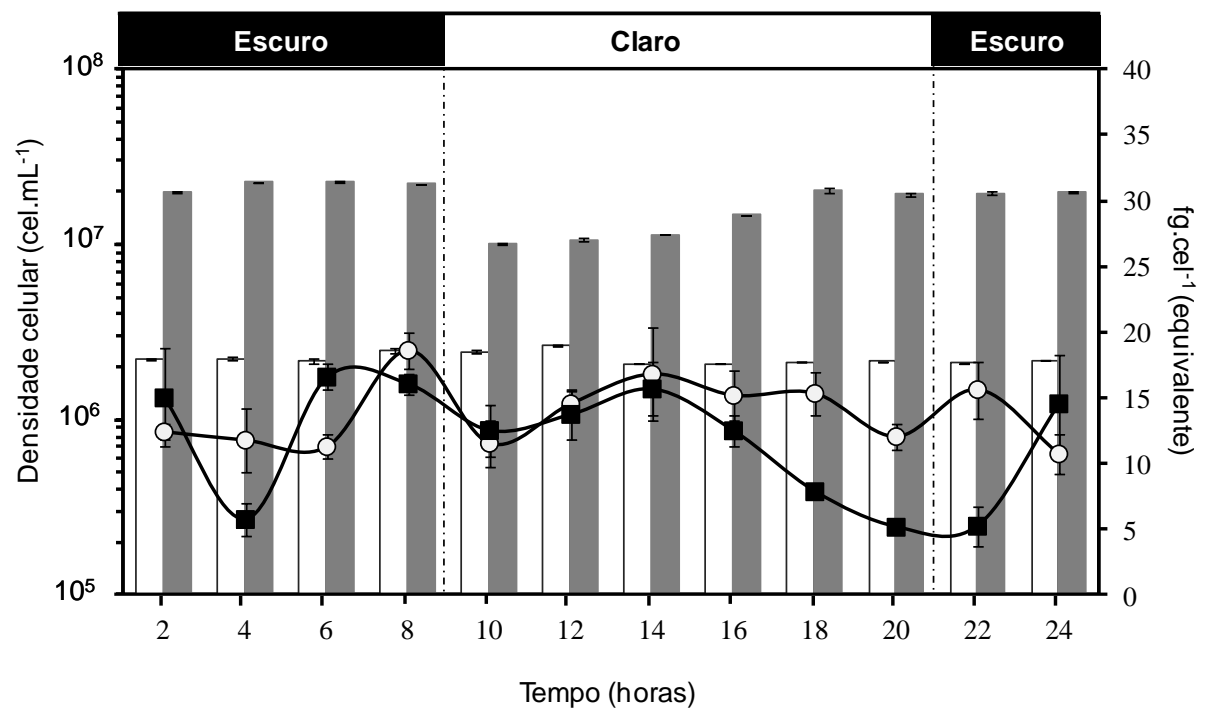
496



497

498 **Fig. 4.** Variação das concentrações de microcistinas intracelulares por quota celular
 499 (MCI) (fg.cel⁻¹) e densidade celular (cel.ml⁻¹) da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232
 500 entre as fases exponencial e estacionária de crescimento no ciclo 12:12h
 501 claro:escuro. □ Densidade celular na fase exponencial; ■ Densidade celular na fase
 502 estacionária; ○ MCI na fase exponencial; ■ MCI na fase estacionária. As barras
 503 representam o erro padrão ($n=3$).

504



505 **Fig. 5.** Variação das concentrações de microcistinas extracelulares por quota celular
 506 equivalente (MCE) (fg.cel⁻¹ equivalente) e densidade celular (cel.mL⁻¹) da cepa *M.*
 507 *aeruginosa* BCCUSP232 entre as fases exponencial e estacionária nos ciclos 12:12h
 508 claro:escuro. □ Densidade celular ba fase exponencial; ■ Densidade celular na fase
 509 estacionária; ○ MCE na fase exponencial; ■ MCE na fase estacionária. As barras
 510 representam o erro padrão ($n=3$).

ANEXOS

HARMFUL ALGAE

GUIDE FOR AUTHORS

Article Structure

Manuscripts should be typewritten with numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered in the upper righthand corner.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text. *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum

of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

AUTHOR INFORMATION PACK 24 Nov 2011 www.elsevier.com/locate/hal 7

when the English term is used, with the exception of common domestic animals.

3. The first mention of the scientific names of the species used in the work - in title or text - should be accompanied by the taxonomic authority unless they can all be referred to a general work in which the authorities are given. Scientific names of species referred to in other studies need no authority. Generic names should only be abbreviated when immediately preceded in the text by the mention of the same species or another of the same genus.

4. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

5. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below:

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)

- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurements should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.
9. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that. . ." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1993, pp. 12-16)".
3. When reference is made to a work by two authors, both names should be given using "and". If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1993a, 1993b, etc. For Volume (Vol.) Bulletin (Bull.), and No., Arabic numerals should be used (not underlined); the full number of pages should be given in the form of pp. 123-128.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Jones, H.D., Richards, O.G., Southern, T.A., 1992. Gill dimensions, water pumping and body size in the mussel *Mytilus edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155(2), 213-237.
 - b. *For books*
Clark, R.B., 1992. Marine pollution, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford.
 - c. *For multi-author books*
Hawkins, A.J.S., Baynes, B.L., 1992. Physiological processes, and the regulation of production. In: Gosling, E. (Ed.), The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier Publishers B.V., Amsterdam, pp. 171-222.
6. The name of the journal should be abbreviated according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*, published by the International Serials Data Systems; Paris, France.
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.