



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – DB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – PPGERN

**EFEITOS DO COBRE NA MICROALGA
KIRCHNERIELLA OBESA EM CULTURA UNIALGAL E
EM CO-CULTIVO COM *CHLORELLA SOROKINIANA***

Rafael Barty Dextro

São Carlos – 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – DB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – PPGERN

**EFEITOS DO COBRE NA MICROALGA
KIRCHNERIELLA OBESA EM CULTURA UNIALGAL E
EM CO-CULTIVO COM *CHLORELLA SOROKINIANA***

Rafael Barty Dextro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: **Prof^ª. Dra. Ana Teresa Lombardi**

São Carlos – 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rafael Barty Dextro, realizada em 15/03/2019:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Profa. Dra. Jaqueline Pérola de Souza
IFSC/USP

Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi
UNIFESP

Agradecimentos

À Prof^ª. Dra. Ana T. Lombardi pela orientação neste projeto, por suas correções, seus ensinamentos, preocupações e carinho;

Aos meus pais Vera Lúcia Barty Dextro e Osvaldo Quintanilha Dextro, que sempre valorizaram o conhecimento e a educação, esforçando-se sempre para prover todo o apoio material e emocional possível para que eu galgasse meus sonhos;

Ao meu marido Rafael Dantas Barbosa por todas as palavras sábias e de encorajamento ao longo de meu mestrado e por todo o seu carinho e suporte. Seu amor me faz mais forte, corajoso e feliz; por isso, sinto que juntos conseguimos tornar tudo possível;

À minhas amigas, Carolina Abreu, Kamila Aguiar, Marielle Chiaradia, Lisandra Gonçalves e Marcelle D. Barbosa por serem incríveis e compartilharem comigo muitos momentos felizes;

Aos meus familiares, parentes e demais amigos que contribuem com apoio emocional hoje e sempre;

Aos meus colegas de laboratório Camila, Daniela, Douglas, Eduardo, Graziela, Jenna, Leonardo, Silvia, Suleiman e Tamires por toda a ajuda direta ou indireta, em especial à Jaqueline por dividir comigo todo o seu vasto conhecimento, iluminando momentos difíceis e compartilhando sorrisos em ocasiões memoráveis;

Às professoras Célia Brabo e Cristina Souza Freire Nordi, que plantaram em mim as sementes que me fazem buscar o conhecimento e a compreensão sobre o mundo natural, a fim de informar a humanidade sobre sua importância, beleza e valor;

À UFSCar por me propiciar uma grande experiência acadêmica durante a pós-graduação;

Ao CNPq pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho;

Em especial, em memória à minha avó Eulalia Quintanilha Dextro, a mulher mais sábia, gentil e carinhosa que eu já conheci e que me ensinou muito sobre ser esperançoso, sobre lutar por nossos sonhos e sobre como tornar cada segundo da vida inesquecível.

“As is a tale, so is life: not how long it is,
but how good it is, is what matters.” - Seneca

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	5
Resumo	8
Abstract	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Efeitos do cobre na fisiologia de microalgas	10
1.2. Co-cultivos de microalgas	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Condições experimentais	17
3.2. Determinações de cobre	18
3.3. Dinâmica populacional	21
3.4. Medidas fotossintéticas	21
3.5. Determinações de biomoléculas	22
3.6. Análise dos resultados	23

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. CAPÍTULO 1 – Respostas fisiológicas de <i>Kirchneriella obesa</i> exposta a um amplo espectro de concentrações de cobre.....	25
4.1.1. Resultados	25
4.1.2. Discussão	32
4.1.3. Conclusão	38
4.2. CAPÍTULO 2 – Efeitos do cobre em co-cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Kirchneriella obesa</i>	39
4.2.1. Resultados	39
4.2.2. Discussão	48
4.2.3. Conclusão	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de *Kirchneriella obesa* corada com nanquim, mostrando a cápsula mucilaginosa ao redor da célula. Foto tirada em microscópio ótico sob aumento de 100x.....13
- Figura 2.** Fotomicrografia do cultivo conjunto de *Chlorella sorokiniana* (células esféricas) e *Kirchneriella obesa* (células alongadas, formato de meia lua). Foto tirada em microscópio ótico sob aumento de 20x.....15
- Figura 3.** Fluxogramas resumindo os dois experimentos realizados, esquematizando os tratamentos experimentais de cada um e descrevendo o propósito de cada amostra coletada.....18
- Figura 4.** Curvas de calibração do eletrodo de cobre livre. Potencial (mV) registrado em função do log $[Cu^{2+}]$ (mol L⁻¹). Os dois primeiros pontos em ambas as curvas representam o limite de detecção usando tampões metálicos. (A) Calibração para o experimento unialgal com 20 concentrações de cobre (●), equação da reta: $y = 29,504x + 244,65$, $R^2 = 0,9992$. (B) Calibração para o experimento de co-cultivo (○), equação da reta: $y = 30,149x + 248,52$, $R^2 = 0,9988$19
- Figura 5.** Exemplo hipotético de regressão contendo os pontos amostrais e seu ajuste estimado. A linha tracejada representa o intervalo de confiança e a linha pontilhada mostra o intervalo de previsão.....23
- Figura 6.** (A) Log do conteúdo de cobre (mol célula⁻¹) na mucilagem (○) e (B) log do cobre (mol célula⁻¹) intracelular (●) em função do log $[Cu^{2+}]$ (mol L⁻¹) com intervalos de confiança de 95%; (C) cobre intracelular (mol L⁻¹, □) em função do log de cobre na mucilagem (mol L⁻¹) com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas). $EC_{50} = 1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (Log = 6,903).....26
- Figura 7.** (A) Densidade populacional (● Ln células mL⁻¹) e (B) taxas de crescimento (■ d⁻¹) nas células de *K. obesa* após 72 h de crescimento em função do log $[Cu^{2+}]$ (mol L⁻¹) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas); (C) Biovolume (✱), medido após 72 h de crescimento em função do log $[Cu^{2+}]$ (mol L⁻¹). Barras de erro são o desvio padrão da média (n=50). O símbolo (*) indica diferença estatística significativa, $p < 0,05$. Equação linear da taxa de crescimento: $y = -0,0966x - 0,4599$, $R^2 = 0,9831$. $EC_{50} = 1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (Log -6,903).....28
- Figura 8.** Fotomicrografia de células de *Kirchneriella obesa* dos tratamentos com (A) 4×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ e (B) 4×10^{-5} mol L⁻¹ Cu²⁺, evidenciando a diferença em volume celular. Fotos tiradas em microscópio ótico sob aumento de 40x.....29

Figura 9. (A) Eficiência fotossintética máxima ($\bullet \Phi_m$), (B) eficiência fotossintética efetiva ($\circ \Phi'_m$), (C) dissipação fotoquímica ($\blacksquare qP$) e (D) dissipação não-fotoquímica ($\square NPQ$) após 72 h de crescimento de *K. obesa* em função do $\log [Cu^{2+}]$ (mol L^{-1}) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). $EC50 = 1,25 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Log -6,903).....30

Figura 10. (A) Curvas de saturação de luz reportadas como taxa relativa de transporte de elétrons em função dos valores de PAR (radiação fotossinteticamente ativa) após 72 h de crescimento de *K. obesa* para todos os tratamentos experimentais. Símbolos aplicados para cada concentração de cobre livre em mol L^{-1} : $\circ 3.10^{-9}$, $\bullet 6.10^{-9}$, $\square 1.10^{-8}$, $\blacksquare 3.10^{-8}$, $\Delta 6.5.10^{-8}$, $\blacktriangle 9.10^{-8}$, $\nabla 2.10^{-7}$, $\blacktriangledown 2.5.10^{-7}$, $\blacktriangleleft 4.10^{-7}$, $\blacktriangleleft 4.5.10^{-7}$, $\blacktriangleright 5.10^{-7}$, $\blacktriangleright 6.10^{-7}$, $\diamond 6.5.10^{-7}$, $\blacklozenge 9.10^{-7}$, $+ 1.10^{-6}$, $\blacktriangleleft 1.5.10^{-6}$, $\blacktriangleright 2.10^{-6}$, $\blacktriangleright 4.10^{-6}$, $\otimes 6.10^{-6}$, $\otimes 4.10^{-5}$. (B) Taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($\blacklozenge rETR_{max}$), (C) irradiância saturante mínima ($\square Ek$) e (D) eficiência de captura de luz ($\bullet \alpha$) em função do $\log [Cu^{2+}]$ (mol L^{-1}) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). $EC50 = 1,25 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Log -6,903).....31

Figura 11. (A) Conteúdo de carboidratos totais ($\bullet \text{pg cel}^{-1}$) e (B) proteínas totais ($\circ \text{pg cel}^{-1}$) medidos após 72 h de crescimento de *K. obesa* em função do $\log [Cu^{2+}]$ (mol L^{-1}) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). $EC50 = 1,25 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Log -6,903).....32

Figura 12. Densidade populacional ($\text{Ln células mL}^{-1}$) de (A) *C. sorokiniana* (em cultivo unialgal, linhas contínuas: \circ controle, $\diamond 2 \times 10^{-7}$ e $\otimes 1,5 \times 10^{-6}$; em co-cultivo, linhas tracejadas: \bullet controle, $\blacklozenge 2 \times 10^{-7}$ e $\otimes 1,5 \times 10^{-6}$) e de (B) *K. obesa* (em cultivo unialgal, linhas contínuas: \square controle, $\Delta 2 \times 10^{-7}$, $\nabla 1,5 \times 10^{-6}$; em co-cultivo, linhas tracejadas: \blacksquare controle, $\blacktriangle 2 \times 10^{-7}$ e $\blacktriangledown 1,5 \times 10^{-6}$) em função dos dias de experimento com desvios padrão representados nas barras.....40

Figura 13. Concentração de cobre livre por células de *C. sorokiniana* (colunas pretas), de *K. obesa* (colunas brancas) e do co-cultivo (colunas cinzas) em função das três concentrações de cobre testadas. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). O símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....41

Figura 14. Clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em culturas unialgais de (A) *C. sorokiniana* (\circ controle, $\diamond 2 \times 10^{-7}$, $\otimes 1,5 \times 10^{-6}$), de (B) *K. obesa* (\square controle, $\Delta 2 \times 10^{-7}$, $\nabla 1,5 \times 10^{-6}$) e do (C) co-cultivo (\bullet controle, $\blacklozenge 2 \times 10^{-7}$, e $\otimes 1,5 \times 10^{-6}$) em função dos dias de experimento com desvios padrão.....42

Figura 15. (A) Taxas de crescimento (d^{-1}) das células de *C. sorokiniana* (em cultivo unialgal: colunas pretas; em co-cultivo: colunas cinzas) e de *K. obesa* (em cultivo unialgal: colunas brancas; em co-cultivo: colunas hachuradas) para as concentrações de cobre testadas. (B) Biovolume (μm^3) das células de *C. sorokiniana* (em cultivo unialgal \circ ; em co-cultivo: \bullet) e de *K. obesa* (em cultivo unialgal \square ; em co-cultivo: \blacksquare), medido após 72 h de crescimento em função das três concentrações de cobre testadas com desvio padrão. Em ambos, o símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle e barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).....43

Figura 16. Eficiência fotossintética máxima (Φ_m) de (A) *C. sorokiniana* (\circ controle, $\diamond 2 \times 10^{-7}$, $\boxtimes 1,5 \times 10^{-6}$), de (B) *K. obesa* (\square controle, $\Delta 2 \times 10^{-7}$, $\nabla 1,5 \times 10^{-6}$) e do (C) co-cultivo (\bullet controle, $\blacklozenge 2 \times 10^{-7}$, e $\blacktimes 1,5 \times 10^{-6}$) em função do tempo experimental (dias). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).....45

Figura 17. (A) Eficiência quântica efetiva (Φ'_m) de *C. sorokiniana* (\circ) e *K. obesa* (\square). (B) Dissipação fotoquímica (qP) e dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *C. sorokiniana* (qP: colunas pretas; NPQ: colunas cinzas) e de *K. obesa* (qP: colunas brancas; NPQ: colunas hachuradas). Valores obtidos após 72 h de exposição ao cobre. Em ambos, o símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).....46

Figura 18. (A) Curvas rápidas de saturação de luz reportadas como taxa relativa de transporte de elétrons em função dos valores de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) após 72 h de crescimento de *C. sorokiniana* (linhas contínuas: \circ controle, $\diamond 2 \times 10^{-7}$, $\boxtimes 1,5 \times 10^{-6}$) e de *K. obesa* (linhas tracejadas: \square controle, $\Delta 2 \times 10^{-7}$, $\nabla 1,5 \times 10^{-6}$). Parâmetros da curva de luz: (B) Taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) para *C. sorokiniana* (barras pretas) e *K. obesa* (barras brancas), (C) irradiância saturante mínima (E_k) para *C. sorokiniana* (barras pretas) e *K. obesa* (barras brancas) e (D) eficiência de captura de luz (α) para *C. sorokiniana* (barras pretas) e *K. obesa* (barras brancas) nas concentrações de cobre. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Em todos, o símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações (mol L ⁻¹) de cobre adicionado e de cobre livre determinadas para cada tratamento.....	20
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

α	Eficiência de captura de luz
Φ_m	Eficiência fotossintética máxima
Φ'_m	Eficiência fotossintética efetiva/operacional
μ	Taxa de crescimento específica
μg	Microgramas (10^{-6} g)
μm^3	Micrometros cúbicos (10^{-6} m)
%	Porcentagem
~	Aproximadamente
>	Maior que
<	Menor que
\geq	Maior ou igual a
\leq	Menor ou igual a
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Ag	Prata
Cd	Cádmio
cel	Célula
CO_2	Dióxido de carbono (gás carbônico)
Cr	Cromo
Cu	Cobre
d	Dia
EC50	Concentrações de efeito de 50%
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E_k	Irradiância saturante mínima

et al	E outros
g	Gramas
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
HNO ₃	Ácido Nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
ICP-OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado
K	Kelvin
L	Litros
LED	Diodo emissor de luz
Ln	Logaritmo natural
Log	Logaritmo
M	Molar
m	Metros
min	Minutos
mL	Mililitros (0,001 L)
mV	Milivolts
NaNO ₃	Nitrato de sódio
nm	Nanometros (10 ⁻⁹ m)
NPQ	Dissipação (<i>quenching</i>) não-fotoquímica
O ₂	Gás oxigênio
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa

pg	Picogramas (10^{-12} g)
pH	Potencial hidrogeniônico
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
Q _A	Plastoquinona A
Q _B	Plastoquinona B
qP	Dissipação (<i>quenching</i>) fotoquímica
rETR	Taxa relativa de transporte de elétrons
rETR _{max}	Taxa relativa máxima de transporte de elétrons
RLC	Curvas rápidas de luz
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SOD	Superóxido desmutase
U.R.	Unidade relativa
ver.	Versão
Zn	Zinco

Resumo

Existem muitas evidências de que o cobre possui um papel crucial na regulação do metabolismo fitoplanctônico. Contudo, apesar de ser requerido em quantidades traço, há um hiato na literatura acerca da fisiologia de microalgas expostas a concentrações ambientalmente relevantes de cobre, sendo que grande parte dos resultados reportados utilizam 10 a 100 vezes mais cobre do que é detectado em ecossistemas naturais. Este estudo foi dividido em 2 capítulos, no primeiro investigamos as respostas fisiológicas de *Kirchneriella obesa* em culturas unialgais exposta a concentrações de cobre que incluíram concentrações ambientalmente relevantes (3×10^{-9} até 4×10^{-5} mol L⁻¹ Cu²⁺ livre). No segundo capítulo investigamos as respostas fisiológicas de *K. obesa* em co-cultivo com *Chlorella sorokiniana* frente ao metal cobre em três concentrações (6×10^{-9} , 2×10^{-7} e $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ Cu²⁺ livre). Para ambos os capítulos, monitorou-se diariamente a densidade celular, clorofila *a* e rendimento fotossintético máximo, biovolume, curvas rápidas de saturação de luz, rendimento fotossintético efetivo, decaimentos de fluorescência (fotoquímica e não-fotoquímica). Somente no capítulo 1 foram determinados o conteúdo de cobre intracelular e na cápsula mucilaginosa e carboidratos e proteínas totais na biomassa. Os resultados de cobre intracelular e na mucilagem mostraram que o mecanismo fisiológico que regula a captação de cobre foi afetado em 2×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺, quando o cobre intracelular aumenta conforme o metal aumenta na cápsula mucilaginosa. Houve aumento do biovolume com o acréscimo de cobre tanto em culturas unialgais quanto em co-cultivos. A concentração efetiva que ocasionou 50% na redução da taxa de crescimento (EC50) calculada para *K. obesa* em cultura unialgal foi de $1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺. O rendimento efetivo manteve-se constante até 10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺, decrescendo em concentrações de cobre maiores. O decaimento não-fotoquímico (NPQ) se comportou de maneira oposta, confirmando a ocorrência de estresse induzido pelo cobre em células expostas a mais que 4×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺. Carboidratos e proteínas apresentaram comportamento similar, aumentando acima de 10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺, sendo que carboidratos aumentaram mais intensamente. *C. sorokiniana* e *K. obesa* apresentaram taxas de crescimento maiores nos co-cultivos expostos a 2×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ do que nas condições unialgais sob a mesma concentração de cobre. Esta pesquisa mostra que concentrações de cobre detectadas atualmente em ambientes naturais podem afetar a fisiologia de *K. obesa* e que o crescimento desta espécie em conjunto com células de *C. sorokiniana* pode interferir nos efeitos do cobre, observações relevantes para a compreensão do equilíbrio de ecossistemas aquáticos naturais.

Palavras-chave: Chlorophyta; metal; microalga; mucilagem; fotossíntese

Abstract

There is enough evidence that copper plays a crucial role in regulating phytoplankton metabolism. However, despite its requirement in trace amounts, there is a literature gap on the physiology of microalgae exposed to environmentally relevant copper concentrations; most literature report results using ~10 to 100 times higher copper than what can be detected in most natural ecosystems. This study aimed at investigating some physiological responses of *Kirchneriella obesa* exposed to copper, including environmental relevant concentrations in an ample range (3×10^{-9} to 4×10^{-5} mol L⁻¹ free Cu²⁺ ions)(chapter 1) and the effects of three different copper concentrations on the co-cultivation of *K. obesa* and *Chlorella sorokiniana* (chapter 2). *K. obesa*'s EC50 was $1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺. Physiological analyses were performed at 72 h (exponentially growing cells) for both experiments and cultures were kept under controlled conditions. They were monitored daily for cell density, chlorophyll *a* and maximum photosynthetic quantum yield; biovolume and effective photosynthetic quantum yield, fluorescence quenchings (photochemical and non-photochemical) and rapid light saturation curves were also determined. In addition to these parameters, for chapter 1, the intracellular and mucilaginous capsule copper content and total carbohydrates and proteins were determined; whereas at the end of the co-cultivation, all previously listed photosynthetic parameters were measured for each species. Intracellular and mucilaginous copper showed that the physiological mechanisms that regulate copper uptake were disrupted at 2×10^{-7} mol L⁻¹ free Cu²⁺ ions, when intracellular copper increased linearly with copper increase in the mucilage capsule. The results showed an increase in biovolume with the increment of copper on both unialgal and co-cultures. Effective quantum yield was kept constant up to 10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ ions but decreased thereafter. The non-photochemical quenching (NPQ) behaved the opposite way as the effective quantum yield, confirming copper induced stress in cells exposed to concentrations higher than 4×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ ions. Proteins and carbohydrates presented similar behaviour, increasing noticeably above 10^{-7} mol L⁻¹, with higher intensity for carbohydrates. *C. sorokiniana* and *K. obesa* presented higher growth rates in the co-cultivation than in unialgal cultures when exposed to 2×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺. This research demonstrated that environmental copper concentrations detected nowadays might affect the physiology of *K. obesa* and that an effect on copper toxicity may occur during the joint growth of *K. obesa* with *C. sorokiniana*. Our results are a contribution towards the understanding of the equilibrium of natural aquatic ecosystems.

Keywords: Chlorophyta; metal; microalgae; mucilage; photosynthesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Efeitos do cobre na fisiologia de microalgas

Cobre é um metal de transição com alto uso industrial, tendo aplicações nas áreas de informática, construção civil e insumos agrícolas. Em consequência do uso excessivo, as atividades antropogênicas estão resultando em um aumento gradual e consistente das concentrações ambientais de cobre (NRIAGU, 1996), expondo a comunidade fitoplanctônica a concentrações que, embora não sejam letais, podem causar alterações fisiológicas (LANGSTON, 2017). Isto pode consequentemente ameaçar o equilíbrio nos ecossistemas aquáticos, uma vez que os organismos que compõem o fitoplâncton formam a porção majoritária dos produtores primários nesses ecossistemas (REYNOLDS, 2006) e fatores que possam afetar a sua biodiversidade devem ser estudados e compreendidos. Assim, monitorar as respostas fisiológicas do fitoplâncton em baixas concentrações de cobre, simulando uma contaminação crônica, é de grande importância ecológica, somando-se que tais organismos também estão relacionados com a regulação de gases atmosféricos como o O₂ e o CO₂, influenciando assim não somente as formas de vida aquáticas, mas também em toda a biosfera (SCHOO et al., 2013). As concentrações de cobre no meio ambiente estão relacionadas com vários aspectos biológicos e físico-químicos que alteram sua especiação e, portanto, sua biodisponibilidade (TONIETTO et al., 2015). De acordo com a literatura, o cobre total encontrado em reservatórios de água doce varia de $\sim 10^{-9}$ mol L⁻¹ a $\sim 10^{-7,5}$ mol L⁻¹ (ASARE et al., 2018; ASHRAF et al., 1991; MCKNIGHT, 1981; VAN HULLEBUSCH et al., 2003), concentrações que podem ser capazes de causar modificações na fisiologia de algumas espécies de microalgas (ECHEVESTE et al. 2017; LOMBARDI; MALDONADO, 2011).

O funcionamento correto de importantes processos fisiológicos e metabólicos em microalgas depende do fornecimento adequado de metais traço como o cobre e de sua concentração intracelular (SUNDA; HUNTSMANN, 1998), com efeitos prejudiciais sendo observados tanto em sua escassez quanto em seu excesso (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). A fotossíntese é um destes importantes processos fisiológicos afetados pelos íons de cobre. Por exemplo, a atividade da plastocianina, uma proteína móvel transportadora de elétrons que atua no complexo Citocromo b6-f no fotossistema II (PSII) até o PSI, é cobre dependente (KNAUERT; KNAUER, 2008; SAKSAHUG et al., 1997); a superóxido dismutase (SOD), uma importante enzima antioxidante que age nos tilacóides e no estroma dos cloroplastos, possui íons Cu em seu centro ativo (JIANG et al., 2016); o cobre também é essencial no transporte de elétrons da respiração mitocondrial (STRYER, 1988); a absorção de ferro através da ferrioxamina em *Thalassiosira* sp, uma diatomácea marinha, é dependente da disponibilidade de cobre (MALDONADO et al., 2006); a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) aumenta com o acréscimo da concentração de cobre (PINTO et al.,

2003); e também já foi relatado na literatura um decréscimo na síntese de clorofila *a* em algumas espécies de microalgas causado pelo aumento do cobre (AFKAR et al., 2010; PERALES-VELA et al., 2007).

As microalgas são organismos fisiologicamente versáteis cuja tolerância aos íons de cobre pode ser relacionada com suas histórias evolutivas e de exposições prévias a este metal, sendo esta tolerância espécie-específica (JOHNSON et al., 2007; LEVY et al., 2008). Estes micro-organismos prontamente respondem aos íons livres deste elemento (LOMBARDI et al., 2002) e observou-se o crescimento de espécies tolerantes sem grandes efeitos negativos em concentrações totais de cobre em torno de $10^{-6.5}$ mol L⁻¹ (FRANKLIN et al., 2002; LEVY et al., 2007), enquanto que espécies sensíveis se mostraram afetadas em concentrações inferiores a $10^{-7.5}$ mol L⁻¹ Cu nominal (LEVY et al., 2007; YAN; PAN, 2002). Algumas das estratégias reportadas na literatura que permitem às microalgas lidarem com íons metálicos no meio ambiente incluem a produção de agentes quelantes (MOFFETT; BRAND, 1996), a internalização de cobre em vacúolos (LOBBAN et al., 1994), a presença de exopolissacarídeos aderidos na parede celular que complexam metais (XUE; SIGG, 1990), a produção de cápsula mucilaginosa (LOMBARDI et al., 2002), assim como a ativação de respostas antioxidantes (MALLICK, 2004).

As curvas rápidas de saturação de luz ou somente curvas rápidas de luz (RLC) são consideradas ferramentas poderosas que permitem avaliar a atividade fotossintética de microalgas foto autotróficas e descrever a condição de aclimação do aparato fotossintético em uma vasta gama de intensidades luminosas ambientais (RALPH; GADEMANN, 2005; YENTSCH; LEE, 1966). De acordo com estes autores, isto se deve ao fato de que apenas alguns segundos de exposição à luz actínica são usados em cada passo luminoso, sem alcançar condições de estado estacionário. Efeitos específicos do cobre na RLC incluem a redução da taxa de transporte de elétrons, decréscimos na eficiência de captação de luz e na irradiância de saturação mínima, causando fotossensibilidade em diversas espécies de microalgas (PERALES-VELA et al., 2007; CHEN et al., 2016). Tais efeitos podem se relacionar com o fato de que os íons de cobre podem afetar, dependendo da concentração em que se encontram, tanto os centros de reação das clorofilas do PSII quanto os dois sítios de ligação específicos (Q_A e Q_B) da molécula plastoquinona, uma quinona isoprenóide presente no PSII e responsável pelo carreamento de elétrons através da membrana dos tilacóides (MOHANTY et al., 1989; TIKHONOV, 2014). Nas reações dependentes de luz da fotossíntese a plastoquinona é reduzida, carreando dois elétrons e dois cátions H⁺. O complexo Citocromo b6-f catalisa então a transferência de elétrons para a plastocianina, que dará continuidade ao processo fotossintético, enquanto transfere os cátions H⁺ para o lúmen dos tilacóides, formando assim o gradiente eletroquímico que é usado pela ATPsintase para formar o ATP. Entretanto, quando há uma grande quantidade de íons cobre no interior do cloroplasto, Q_A e Q_B são diretamente afetadas, causando um

decréscimo drástico no transporte de elétrons entre o PSII e o PSI, o que reduz a produção de ATP e a eficiência fotossintética (FALKOWSKI; RAVEN, 2007; MALLICK; MOHN, 2003).

A versatilidade fisiológica das microalgas está intimamente relacionada a síntese de biomoléculas que auxiliam a célula a lidar com os metais de acordo com suas concentrações. O acúmulo de carboidratos e proteínas em microalgas estimulado pela presença de cobre excedente tem sido relatado na literatura (CHIA et al., 2015; PISTOCCHI et al., 1997; SILVA et al., 2018; TRIPATHI; GAUR, 2006). Enquanto o aumento em carboidratos tem sido mais comumente relacionado com o metabolismo energético (CHIA et al., 2015; SILVA et al., 2018), o acúmulo de proteínas tem ligação com a produção de enzimas antioxidantes e agentes quelantes (AFKAR et al., 2010; CHIA et al., 2014; SABATINI et al., 2009) e ambos acarretam majoritariamente um prejuízo no crescimento das microalgas, reforçando a ideia de que as células expostas ao estresse causado por íons metálicos são capazes de sobreviver através de alterações fisiológicas específicas.

Kirchneriella obesa, a microalga usada no presente trabalho, é uma clorófitica de água doce cosmopolita e produtora de mucilagem que se adere ao redor de suas células (Fig. 1). Um dos poucos estudos que investigaram os efeitos da interação da mucilagem com o cobre em microalgas foi realizado por Lombardi et al. (2002). Os autores mostraram que a mucilagem de *K. aperta* possui propriedades de retenção para íons cobre, propondo que isto poderia fornecer às células um mecanismo capaz de postergar os efeitos tóxicos do cobre. A fim de entender as alterações induzidas por cobre expressas nas respostas fisiológicas (dinâmica populacional, fotossíntese e produção de biomoléculas) de *K. obesa* e as interações entre o metal e a mucilagem, suas células foram expostas a uma grande amplitude de concentrações de cobre (3×10^{-9} até 4×10^{-5} mol L⁻¹ Cu²⁺ livre) em vinte diferentes concentrações, a fim de que fosse possível delinear tendências. Adicionalmente, foram quantificados o cobre intracelular e o cobre presente na mucilagem. Os resultados mostraram que até mesmo as concentrações ambientais de cobre utilizadas afetaram o crescimento de *K. obesa*. Algumas estratégias para lidar com o cobre exibidas por *K. obesa* neste estudo são discutidas, demonstrando a importância em monitorar a concentração de cobre livre em ecossistemas aquáticos, uma vez que este metal pode afetar espécies sensíveis mesmo quando presente em concentrações consideradas ambientalmente relevantes.

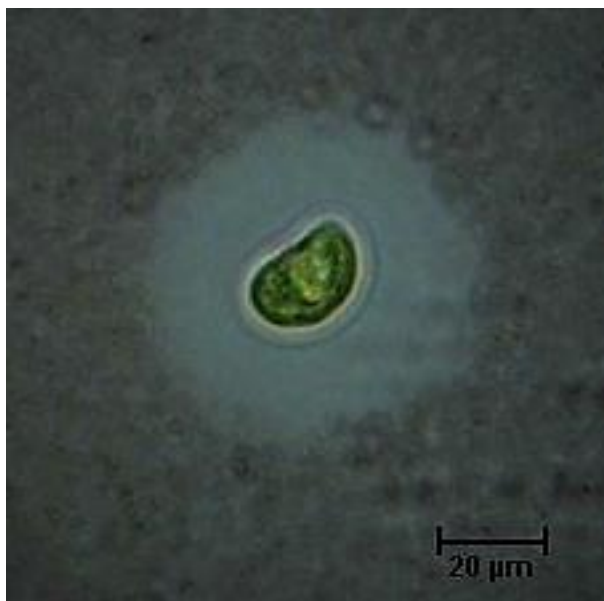


Figura 1. Fotomicrografia de *Kirchneriella obesa* corada com nanquim, mostrando a cápsula mucilaginosa ao redor da célula. Foto tirada em microscópio ótico sob aumento de 100x.

1.2. Co-cultivos de microalgas

O co-cultivo de micro-organismos envolve o crescimento conjunto de espécies diferentes, em um mesmo recipiente, comumente envolvendo culturas conjugadas de bactérias, leveduras, cianobactérias ou microalgas. O estudo de culturas mistas é conhecido na literatura principalmente para fins biotecnológicos, envolvendo a produção de produtos com valor agregado (como biocombustíveis) ou a prestação de serviços de biorremediação (MAGDOULI et al., 2016). A ideia central deste tipo de cultivo é que estes organismos coexistem em ecossistemas naturais, apresentando relações mutualísticas ou antagonistas, de acordo com as relações específicas de cada espécie. Além disso, substratos de difícil degradação podem ser utilizados quando o repertório enzimático de micro-organismos trabalha de forma conjunta (ARUMUGAM et al., 2014; LIU et al., 2018a). O atual foco de trabalhos com co-cultivo tem sido aumentar o rendimento da produção lipídica sem que haja prejuízo em biomassa total ou nas taxas de crescimento (LIU et al., 2018b; YEN et al., 2015; ZHAO et al., 2014). Estudos voltados para fins ecológicos majoritariamente exploram o efeito de inibição de crescimento, também chamado de alelopatia, que um organismo pode exercer sobre o outro (CHIANG et al., 2004; DUNKER et al., 2013; FERGOLA et al., 2007; NAN et al., 2004). Há também estudos que avaliam o co-cultivo de micro-organismos quando expostos a condições de estresse no meio, seja envolvendo alteração na intensidade luminosa, presença de contaminantes ou ausência de nutrientes (ANTUNES et al., 2012; BARREIRO; HAIRSTON, 2013; GRANÉLI; JOHANSSON, 2003, ONCEL et

al., 2011). Algo comum dentre a maior parte dos estudos com crescimento conjunto de micro-organismos é a busca por expressar de maneira mais realista a sucessão fitoplanctônica que acontece nos ambientes naturais, uma vez que os experimentos unialgais ou de mono cultivo não incluem a simulação de relações interespecíficas que ocorrem no meio ambiente.

Os efeitos alelopáticos ou de inibição de crescimento são comumente observados em estudos que realizam co-cultivo de diferentes espécies de macro e microalgas, cianobactérias e outros micro-organismos. Pratt e Fong (1940) foram os primeiros a descrever a produção de uma substância inibidora de crescimento por *Chlorella vulgaris*, referida como “*chlorelina*”. Somente anos depois é que seria desvendado que tal efeito é decorrente da ação de uma mistura de ácidos graxos livres e não de uma simples molécula como imaginado anteriormente (SPOEHR; MILNER, 1949). Desde então, observou-se que tais misturas, liberadas por diversas espécies de organismos, podem conter os ácidos palmítico, linolênico e α -linoleico, causando danos a membranas plasmáticas e afetando a deposição de amido nos cloroplastos (KLAUSNER et al., 1980; PINTO et al., 1995). A alelopatia pode ocorrer com a presença da célula produtora de ácidos graxos livres ou através da exposição ao extrato no qual a célula produtora cresceu, como o meio de cultura filtrado sem células, uma vez que estas biomoléculas são externalizadas. Outras espécies descritas como produtoras de substâncias alelopáticas são *Botryococcus braunii* (CHIANG et al., 2004), *Chlamydomonas reinhardtii* (MCCRACKEN et al., 1980), *Ulva pertusa* (NAN et al., 2004), *Cylindrospermopsis raciborskii* (ANTUNES et al., 2012), *Prymnesium parvum* (GRANÉLI; JOHANSSON, 2003) e *Microcystis aeruginosa* (DUNKER et al., 2013). Efeitos de inibição de crescimento em co-cultivos dependem da sensibilidade e da capacidade de tolerância de cada organismo de acordo com sua atividade metabólica, sendo que algumas espécies são resistentes e podem até mesmo ser estimuladas pela presença de outras no mesmo meio de cultura (CHIANG et al., 2004; MAGDOULI et al., 2016).

O efeito do crescimento em co-cultivo depende da relação interespecífica entre os organismos testados. Em estudos envolvendo microalgas e leveduras, nota-se uma tendência de aumento de produtividade lipídica por parte das microalgas. Isto foi observado em co-cultivos de *Chlorella vulgaris* ou *Scenedesmus obliquus* com *Rhodotorula glutinis*, uma levedura (LIU et al., 2018b; YEN et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Contudo, no cultivo conjunto de espécies de microalgas Chlorophyta a inibição de crescimento por competição ou efeitos alelopáticos é mais comumente observada (DELLAGRECA et al., 2010; FERGOLA et al., 2007; ZHAO et al., 2014). A relação entre cianobactérias e microalgas varia consideravelmente dependendo das espécies testadas, porém sabe-se que espécies como *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistina) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (produtora de cylindrospermopsina) podem ter efeitos negativos sobre diversas espécies de microalgas (ANTUNES et al., 2012; DUNKER et al., 2013).

Alguns trabalhos na literatura investigaram o efeito de agentes estressantes sobre co-cultivos, a fim de observar respostas fisiológicas que possam resultar na sobrevivência de uma ou de ambas as populações testadas. De modo geral, estresse envolvendo aumento da intensidade luminosa somado a presença de outro micro-organismo crescendo no meio de cultivo causa efeitos inibitórios a uma variedade de componentes do fitoplâncton aquático (BARREIRO; HAIRSTON, 2013). A ausência de nutrientes essenciais como o fósforo também pode agravar possíveis efeitos alelopáticos (ANTUNES et al., 2012), enquanto que o efeito combinado do aumento de intensidade luminosa e uma maior concentração de nitrogênio e fósforo podem favorecer a produção de biomassa de espécies que ocupem diferentes porções da coluna d'água (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2011). A adição de uma fonte de carbono, como a glicose, também parece reduzir os efeitos de competição entre as espécies em co-cultivo, induzindo crescimento positivo de ambas as populações (ONCEL et al., 2011). Há na literatura uma escassez de trabalhos que envolvam o efeito combinado de metais e co-cultivos. Explora-se consideravelmente a contribuição da presença de bactérias na ausência de ferro em cultivos de microalgas (KEAN et al., 2015; KESHTACHER-LIEBSO et al., 1995; RAJAPITAMAHUNI et al., 2018); entretanto, não há trabalhos que explorem as relações entre espécies de microalgas expostas a cobre, por exemplo. Deste modo, este estudo procurou investigar os efeitos de diferentes concentrações de cobre sobre o co-cultivo de *K. obesa* e *Chlorella sorokiniana* (Fig. 2), analisando as dinâmicas populacionais de ambas as espécies, a fim de observar respostas que sejam mais próximas ao que realmente ocorre nos ecossistemas aquáticos.

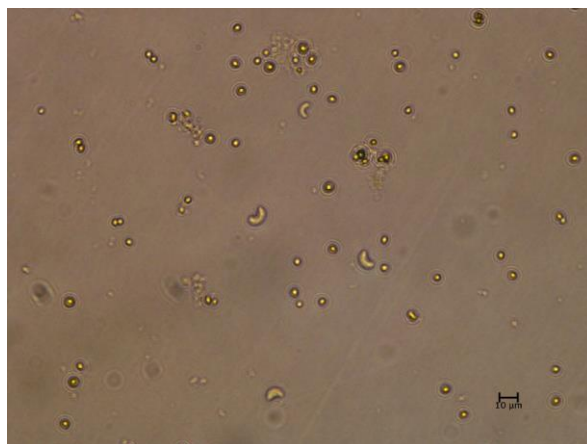


Figura 2. Fotomicrografia do cultivo conjunto de *Chlorella sorokiniana* (células esféricas) e *Kirchneriella obesa* (células alongadas, formato de meia lua). Foto tirada em microscópio ótico sob aumento de 20x.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi investigar e avaliar os efeitos dos íons de cobre sobre o crescimento da espécie de microalga de água doce *Kirchneriella obesa*, realizado em condição unialgal e em um co-cultivo com *Chlorella sorokiniana*.

2.1. Objetivos específicos

- a) Examinar os efeitos de uma grande amplitude de concentrações de cobre, incluindo níveis ambientalmente relevantes, na microalga *Kirchneriella obesa* em cultivos unialgais;
- b) Quantificar o conteúdo de cobre intracelular e na mucilagem de células de *K. obesa* em cultivos unialgais, bem como determinar a concentração de cobre livre no meio de cultura nas diferentes concentrações testadas;
- c) Avaliar as respostas fisiológicas através da densidade populacional, concentração de clorofila *a*, taxa específica de crescimento e biovolume em monoculturas de *K. obesa* em função das concentrações de cobre testadas;
- d) Determinar as respostas fotossintéticas dos cultivos unialgais de *K. obesa* expostos a um amplo espectro de concentrações de cobre;
- e) Analisar o conteúdo de carboidratos e proteínas em monoculturas de *K. obesa* expostas à um amplo gradiente de concentrações de cobre;
- f) Examinar as dinâmicas populacionais de *K. obesa* e *Chlorella sorokiniana* cultivadas juntas em três distintas concentrações de cobre livre;
- g) Avaliar similaridades e diferenças nos efeitos do cobre sobre as respostas fotossintéticas exibidas por *K. obesa* e *Chlorella sorokiniana* em três concentrações de cobre.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições Experimentais

Kirchneriella obesa (Chlorophyta) é uma microalga unicelular de água doce que contém uma cápsula mucilagínosa abundante. Ela foi obtida da Coleção de Culturas Microalgais (CCMA/ cepa 345) do Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos (Brasil). Esta coleção é registrada no *World Data Centre for Microorganisms* (WCDM) sob o número 835. A *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) foi obtida no Banco de Microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas (cepa 004), Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos (Brasil). Esta microalga foi selecionada por apresentar um crescimento rápido e robusto, bem explorado na literatura (WILDE et al., 2006; ZHAO et al., 2014) por apresentar formato e tamanho celulares distintos aos da *K. obesa*, permitindo sua identificação nos co-cultivos. Ambas foram cultivadas no Laboratório de Biotecnologia de Algas em meio BG 11 (RIPPKA et al., 1979) esterilizado (autoclavado, 20 min). O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0 e as culturas foram iluminadas com LED (2700 ~ 3000 K) fornecendo 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) na superfície da cultura em um ciclo claro-escuro 12:12 h em temperatura controlada de 24 ± 1 °C. Para os experimentos, o meio foi preparado sem cobre, que foi posteriormente adicionado através de um padrão comercial mono-elementar para AAS/ICP (1000 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Antes de serem inoculadas, as culturas de *K. obesa* e *C. sorokiniana* em fase exponencial de crescimento tiveram sua eficiência fotossintética máxima (Φ_m) determinada a fim de garantir células saudáveis ($\Phi_m = 0.7$ ou acima, JUNEAU; HARRISON, 2005; LOMBARDI; MALDONADO, 2011) no inóculo. As culturas experimentais foram realizadas em garrafas de polycarbonato de 1,0 L contendo 400 mL de meio BG 11 com densidade celular inicial de 5×10^4 células mL⁻¹ em fase de crescimento exponencial. Concentrações adicionadas de cobre no experimento de cultivo unialgal (Capítulo 1) variaram de 8×10^{-7} a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, totalizando 20 concentrações diferentes (sem réplicas) durante 96 h (Fig. 3). No experimento de co-cultivo, utilizou-se inóculos similares para cada uma das duas espécies em ambas as condições unialgais e de cultivo conjunto ($\sim 5 \times 10^4$ células mL⁻¹, razão 1:1 no co-cultivo) e 3 concentrações de cobre nominais foram utilizadas: $1,3 \times 10^{-6}$ (controle), $6,5 \times 10^{-6}$ (5 vezes mais cobre) e $6,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (50 vezes mais cobre). O experimento de co-cultivo, reportado no capítulo 2, foi realizado com três tratamentos (co-cultivo, crescimento unialgal de *K. obesa* e crescimento unialgal de *C. sorokiniana*), em trélicas. Cada tratamento foi exposto às três concentrações de cobre descritas acima durante 6 dias (Fig. 3). Todas as garrafas de polycarbonato usadas foram previamente lavadas em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ (7 dias) para a remoção de metais, ainda que estivessem presentes em concentrações traço; além disso, elas foram

enxaguadas com água milli-Q e autoclavadas com meio de cultura. Somente materiais de plástico ou Teflon® foram utilizados, sendo todos previamente lavados em 1,0 mol L⁻¹ HCl (24h) e enxaguados com água Milli-Q antes de serem usados.

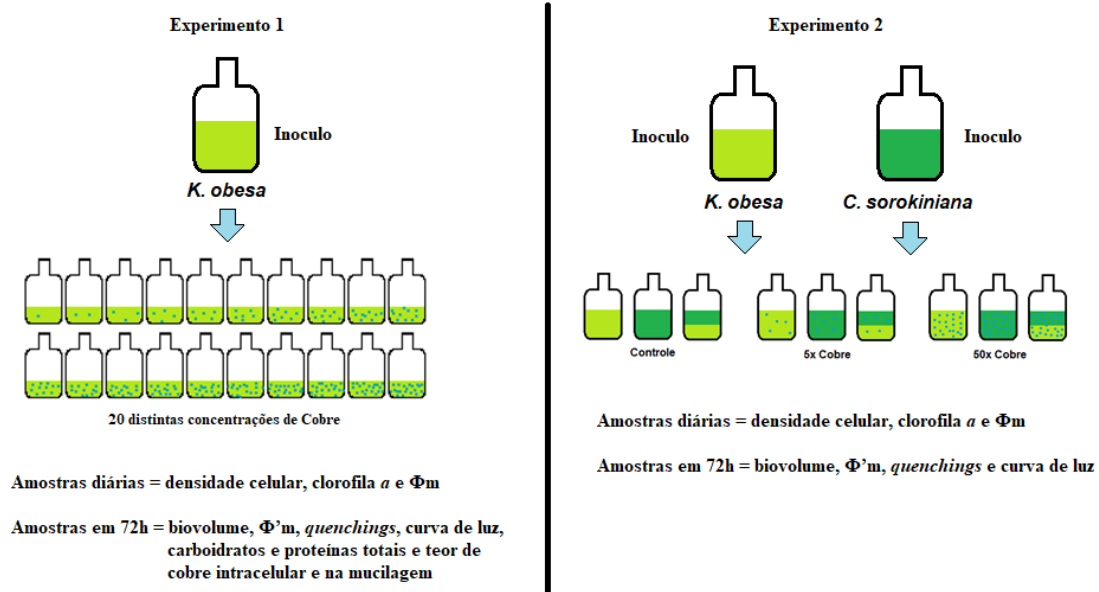


Figura 3. Fluxogramas resumindo os dois experimentos realizados, esquematizando os tratamentos experimentais de cada um e descrevendo o propósito de cada amostra coletada.

3.2. Determinações de cobre

Os íons de cobre livre presentes no meio de cultura foram determinados antes da inoculação das microalgas utilizando o eletrodo íon-seletivo de cobre (Orion, modelo 94-29) e um eletrodo de referência de dupla junção. A temperatura foi mantida constante durante todas as leituras (22 ± 2 °C) e tampões metálicos foram usados para a calibração segundo a metodologia descrita por Lombardi et al. (2007). O tampão metálico estendeu a amplitude linear da curva de calibração até 10^{-10} mol L⁻¹ Cu²⁺, como representado na Figura 4. Todas as soluções metálicas utilizadas foram mantidas em materiais de plástico ou Teflon®. Todos esses materiais foram lavados com 1,0 mol L⁻¹ HNO₃ (Synth, Brasil) por 48 h e enxaguados com água ultrapura (MilliQ®, Millipore).

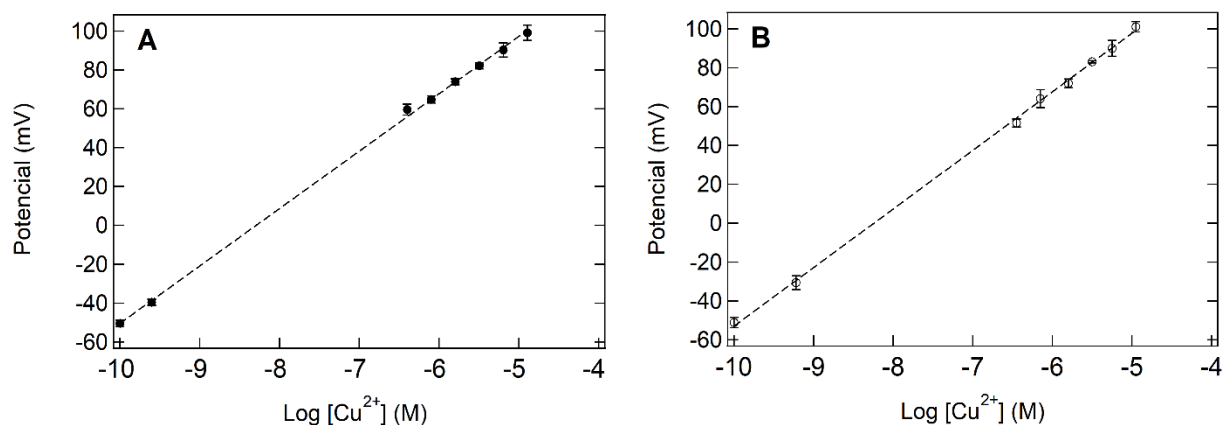


Figura 4. Curvas de calibração do eletrodo de cobre livre. Potencial (mV) registrado em função do $\log [Cu^{2+}]$ ($mol L^{-1}$). Os dois primeiros pontos em ambas as curvas representam o limite de detecção usando tampões metálicos. (A) Calibração para o experimento unialgal com 20 concentrações de cobre (●), equação da reta: $y = 29,504x + 244,65$, $R^2 = 0,9992$. (B) Calibração para o experimento de co-cultivo (○), equação da reta: $y = 30,149x + 248,52$, $R^2 = 0,9988$.

Todos os resultados deste trabalho são apresentados com base nas determinações de cobre livre e não cobre adicionado. O cobre livre ou iônica hidratada que está dissolvido no meio, diz respeito ao à disponibilidade tanto para ser absorvido pelas células como para ser complexado por alguma molécula. O cobre adicionado ao meio de cultura diz respeito ao cobre total presente no meio de cultura. Assim, o cobre livre é uma fração deste cobre total adicionado. É importante diferenciarmos as determinações de cobre na mucilagem e o intracelular. O cobre na mucilagem representa a fração do metal aderida a célula, que é removida através de lavagem com uma solução de ligante. Já o cobre intracelular é obtido através da subtração do valor do cobre celular total pelo conteúdo de metal na mucilagem. Este cobre celular total diz respeito ao valor obtido após a digestão da biomassa com HNO_3 e H_2O_2 , representando tanto o cobre aderido na mucilagem quanto o cobre presente em seu interior.

As determinações de cobre livre inicial nas amostras foram feitas em 50 mL obtidos de cada tratamento e tiveram sua força iônica ajustada para $0,02 mol L^{-1}$ com $NaNO_3$ ultrapuro (Sigma-Aldrich, Alemanha). As amostras seguiram imediatamente para a determinação do cobre e quando necessário foram mantidas no escuro a $4 ^\circ C$. As determinações do cobre livre foram feitas em uma sala limpa com pressão positiva dada por fluxo horizontal de ar filtrado. As concentrações de cobre livre determinadas para o cultivo unialgal estão representadas na Tabela 1. Para o co-cultivo, as concentrações de cobre livre usadas foram $6,02 \times 10^{-9} \pm 0,05$ (controle), $2,11 \times 10^{-7} \pm 0,04$ e $1,5 \times 10^{-6} \pm 0,01 mol L^{-1}$ íons Cu^{2+} .

Tabela 1. Concentrações (mol L⁻¹) de cobre adicionado e de cobre livre determinadas para cada tratamento

[Cu] adicionado	[Cu ²⁺] livre	[Cu] adicionado	[Cu ²⁺] livre
8x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁹	2,5x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁷
1,3x10 ⁻⁶	6x10 ⁻⁹	3,2x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁷
2x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁸	4,2x10 ⁻⁵	6,5x10 ⁻⁷
3,4x10 ⁻⁶	3x10 ⁻⁸	5,3x10 ⁻⁵	9x10 ⁻⁷
4,2x10 ⁻⁶	6,5x10 ⁻⁸	6,7x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁶
5,4x10 ⁻⁶	9x10 ⁻⁸	8,5x10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻⁶
6,7x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁶
8,5x10 ⁻⁶	2,5x10 ⁻⁷	1,25x10 ⁻⁴	4,5x10 ⁻⁶
1,25x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁷	1,6x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁶
1,8x10 ⁻⁵	4,5x10 ⁻⁷	2,5x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁵

K. obesa é composta por uma célula contornada por sua cápsula mucilaginosa (Figura 1). O cobre total foi determinado tanto nas células quanto na mucilagem do entorno em amostras com 72 h de cultivo no experimento unialgal. Para a determinação na cápsula mucilaginosa utilizou-se a metodologia descrita por Lombardi et al. (2002) que é uma modificação da metodologia descrita em Price e Morel (1990). O cobre presente na cápsula mucilaginosa foi removido através da lavagem das células e suas cápsulas com uma solução ligante (10⁻³ mol L⁻¹ do ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfônico, um ligante metálico usado em pH 7,0). As amostras de 95 mL foram brevemente centrifugadas (15 min, 1800 rpm/655 g, 21 °C, Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, Alemanha), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado uma vez com 10 mL do ligante, sendo posteriormente congelado a -18 °C até a determinação do cobre. Como branco do procedimento, foi utilizado apenas ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfônico e seu valor foi subtraído das amostras. Para a determinação do cobre celular, 10 mL de cultura foram filtrados em membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 μm (Sartorius, Alemanha), previamente lavadas com 1,0 mol L⁻¹ HCl por 24 h e enxaguadas com 20 mL de água ultrapura antes do uso (LOMBARDI et al., 2002). Após a filtração, as membranas foram secas por 24 h a 65 °C e então congeladas a -18 °C até serem digeridas usando água ultrapura, HNO₃ (70%) e H₂O₂ (30%) em uma proporção de 3:1:1, como descrito em Afkar et al. (2010). O branco deste procedimento constou de uma membrana pré-lavada. Cobre celular e na mucilagem foram determinados por ICP-MS (modelo 7800, Agilent Technologies, California, EUA), que possui um limite de detecção de 0,00001 μg L⁻¹ (~1,57x10⁻¹³ mol L⁻¹), entretanto, os quatro tratamentos com maior concentração de cobre tiveram o metal determinado utilizando-se um ICP-OES (iCAP 7000 series, Thermo

Scientific, ICP Spectrometer, Alemanha), que possui um limite de detecção de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\sim 7,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Foi realizada uma curva de calibração de cobre para cada uma das técnicas antes da determinação das amostras. O cobre intracelular foi obtido através da subtração do valor total de cobre celular pelo conteúdo de cobre na mucilagem.

3.3. Dinâmica Populacional

Amostras foram coletadas uma vez por dia para contagem de células, realizada por contagem automática no citômetro MUSE (Millipore, Alemanha) para o experimento unialgal e contagem manual sob microscópio ótico (Nikon Eclipse E200, Japão) para o experimento de co-cultivo. Também foram coletadas amostras diárias para a determinação de fluorescência da clorofila *a* (mg L^{-1}) *in vivo* utilizando-se um fluorímetro (Turner Designs AU-10 Fluorômetro, Trilogy, EUA). Uma curva de calibração foi feita considerando-se a clorofila *a* extraída de uma cultura em crescimento exponencial de *Chlorella sorokiniana* em várias concentrações *versus* a fluorescência *in vivo* da clorofila *a* desta mesma cultura. A extração do pigmento seguiu o procedimento descrito em Jeffrey e Humphrey (1975). A curva foi ajustada na sua porção linear e a equação da reta foi usada para o cálculo da concentração de clorofila *a* (mg L^{-1}) a partir da fluorescência de cada amostra.

As taxas de crescimento específico (μ, d^{-1}) foram obtidas como sendo a inclinação de uma regressão linear da fase de crescimento exponencial, traçadas como o logaritmo natural da densidade celular (células mL^{-1}) *versus* o tempo experimental (dias) (SILVA et al., 2018). A EC50 foi calculada utilizando a interpolação linear das taxas de crescimento (Igor Pro, ver 6.0.5, WaveMetrics Inc, Oregon, EUA). O biovolume celular (μm^3) foi calculado para cinco concentrações de cobre no experimento unialgal (6×10^{-9} , 9×10^{-8} , $4,5 \times 10^{-7}$, 1×10^{-6} e $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{+2}$ livre) em 72h de crescimento e para ambas as algas em todas as condições testadas no experimento de co-cultivo, durante o crescimento exponencial, medindo ao menos 50 células sob o microscópio ótico (Nikon Eclipse E200, Japão) usando uma câmara de contagem Fuchs-Rosenthal. As equações utilizadas para determinar o volume específico de cada espécie foram propostas por Hillebrand et al. (1999).

3.4. Medidas Fotossintéticas

A eficiência fotossintética máxima do PSII (Φ_m) foi obtida diariamente em ambos os experimentos utilizando um fluorômetro com pulso de luz de amplitude modulada (Phyto-PAM, Heinz Walz GmbH, Alemanha), que aplica um pulso de luz saturante em uma alíquota de 3 mL de células previamente adaptadas

ao escuro (20 min). Com 72 h de cultivo, as células em crescimento exponencial foram expostas a pulsos de luz actínica de 20 s com a mesma intensidade luminosa utilizada no cultivo, a fim de medir a eficiência fotossintética operacional ou efetiva do PSII, Φ'_m e as dissipações (*quenchings*) fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ), obtidas como descrito por Juneau et al (2002) utilizando as equações 1 e 2 descritas a seguir. O co-cultivo de *K. obesa* e *C. sorokiniana* teve apenas a Φ_m determinada.

$$(1) \quad qP = 1 - (Fm' - Fo') / (Fm - Fo)$$

$$(2) \quad NPQ = (Fm - Fm') / Fm'$$

Os valores Fo e Fm estão relacionados às reações que ocorrem após a aclimação da alga ao escuro enquanto que Fo' e Fm' relacionam-se com às reações que acontecem após o estímulo luminoso.

As curvas rápidas de saturação de luz foram obtidas após 72 h de cultivo, submetendo amostras adaptadas 20 min no escuro a uma série crescente de valores de PAR (de 0 a 1800 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O intervalo de tempo entre cada pulso luminoso foi de 20 s. Os valores de Φ'_m medidos neste protocolo foram multiplicados por cada PAR correspondente a fim de se obter a taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de acordo com Ralph et al. (2002). Estes resultados foram ajustados como descrito em Platt et al. (1980), para que a taxa relativa m\u00e1xima de transporte de el\u00e9trons (rETR_{max}, $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a efici\u00eancia de captura de luz (α , $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1} / \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fossem estimadas, com as quais foi poss\u00edvel calcular a irradi\u00e2ncia de satura\u00e7\u00e3o m\u00ednima (E_k , $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), descritas na equa\u00e7\u00e3o 3. No experimento de co-cultivo, estes par\u00e2metros foram medidos somente nos cultivos unialgais de *K. obesa* e *C. sorokiniana*.

$$(3) \quad E_k = \text{rETR}_{\text{max}} / \alpha$$

3.5. Determina\u00e7\u00f5es de Biomol\u00e9culas

Prote\u00ednas e carboidratos totais foram determinados nas c\u00e9lulas ap\u00f3s 72 h de cultivo. Coletou-se de cada tratamento do experimento unialgal al\u00edquotas de 50 mL para prote\u00ednas totais e de 30 mL para carboidratos totais, centrifugando-as em 4400 rpm (3920 g) por 15 min em uma centrifuga refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, Alemanha). Em ambas as an\u00e1lises o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram usados nas determina\u00e7\u00f5es. Para prote\u00ednas, utilizou-se a metodologia descrita por Bradford (1976) e a ruptura das c\u00e9lulas foi realizada de acordo com Rausch (1981). Os carboidratos foram determinados de acordo com Albalasmeh et al. (2013). Medidas de absorv\u00e2ncia foram realizadas em 315 nm para carboidratos e em 595 nm para prote\u00ednas usando um espectrofot\u00f4metro (Macherey-Magel, Alemanha). Um padr\u00e3o de albumina bovina (Sigma Aldrich, EUA) foi usado para produzir a curva de

calibração de proteínas e para determinar o conteúdo de carboidratos totais utilizou-se uma curva de calibração confeccionada com glicose (Synth, Brasil) como padrão.

3.6. Análise dos resultados

O experimento unialgal foi realizado sem réplicas, a fim de que todo o esforço amostral pudesse ser direcionado para a obtenção de resultados em uma grande amplitude de concentrações. Deste modo, os dados obtidos foram analisados através de regressões lineares e não-lineares com intervalos de confiança de 95%, inferindo assim a localização da linha de ajuste através dos resultados obtidos o longo do espectro de concentrações de cobre para avaliar comportamentos expressos pelos dados (ALPER; GELB, 1990). É importante ressaltar que serão apresentados nos resultados apenas os intervalos de confiança e não os intervalos de previsão (Fig. 5), que demonstram que 95% das medições estão dentro de sua amplitude. Os modelos produzidos usando as regressões não-lineares são muito flexíveis, fornecendo uma inferência coesa sobre as tendências observáveis par as variáveis testadas (DENISON et al., 2004). Depois disso, gráficos de dispersão de resíduos foram obtidos e os modelos usados para os ajustes de cada regressão foram testados para correlação e independência (MACKINNON, 2008; WHITE, 1992). Todos os modelos apresentados neste trabalho tiveram análise de resíduos significativa, suportando os ajustes usados.

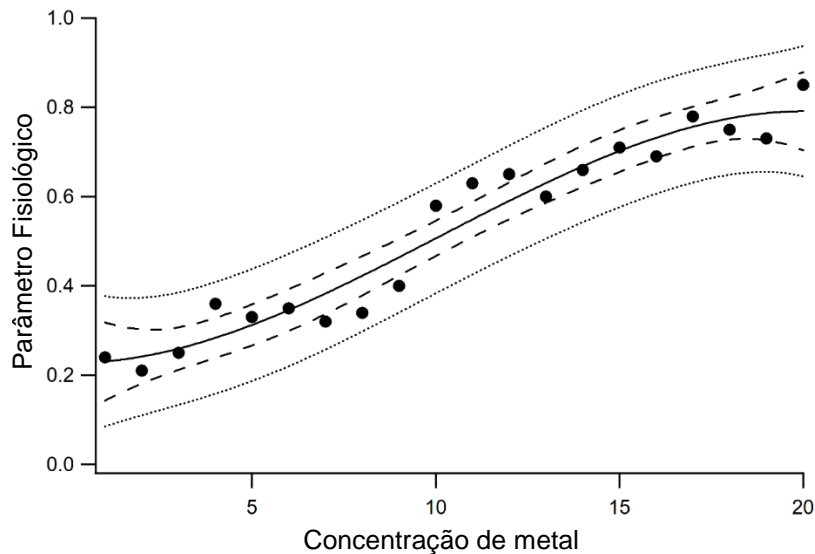


Figura 5. Exemplo hipotético de regressão contendo os pontos amostrais e seu ajuste estimado. A linha tracejada representa o intervalo de confiança e a linha pontilhada mostra o intervalo de previsão.

A análise estatística dos resultados de biovolume foi feita através de um teste-t usando o *software* de Assistência Estatística (ver 7.7) para Windows e todos os gráficos foram produzidos no IgorPro 6.0.5 (WaveMetrics, EUA) ou no *software* R (R Development Core Team, Áustria).

No experimento de co-cultivo, realizado com trélicas, as análises dos resultados foram realizadas através do teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e analisados com os testes Tukey e ANOVA com intervalo de confiança de 95% para detectar diferenças entre os tratamentos e seus respectivos controles, usando o *software* de Assistência Estatística (ver 7.7) para Windows. Todos os gráficos foram produzidos no IgorPro 6.0.5 (WaveMetrics, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta secção foi subdividida em duas partes referentes aos dois experimentos realizados. O capítulo 1 refere-se ao primeiro experimento deste trabalho, no qual *K. obesa* foi cultivada de modo unialgal em 20 diferentes concentrações de cobre livre variando de 3×10^{-9} a 4×10^{-5} mol L⁻¹. Foram avaliados conteúdo de cobre intracelular e na mucilagem, densidade celular, taxas de crescimento, biovolume, parâmetros fotossintéticos e carboidratos e proteínas totais. O capítulo 2 refere-se ao segundo experimento deste estudo, no qual foi realizado um cultivo inoculado com *K. obesa* e *C. sorokiniana*, ao qual chamamos de co-cultivo, além dos cultivos unialgais de ambas as espécies em três diferentes concentrações de cobre livre: o controle (6×10^{-9}), 2×10^{-7} e $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ Cu²⁺. Em todos os tratamentos foram analisados densidade celular, concentração de clorofila *a*, taxas de crescimento, biovolume e a eficiência quântica máxima. Além disso, avaliou-se os parâmetros fotossintéticos relacionados às curvas rápidas de saturação de luz das duas culturas unialgais a fim de observar diferenças nos efeitos do cobre sobre as espécies testadas.

4.1. CAPÍTULO 1 – Respostas fisiológicas de *Kirchneriella obesa* exposta a um amplo espectro de concentrações de cobre

4.1.1. RESULTADOS

Cobre intracelular e na capsula mucilaginosa

Os conteúdos de cobre na mucilagem e no interior da célula variaram com o aumento de Cu²⁺ livre no meio, como mostram as Figuras 4A e 4B. Observa-se um aumento linear de cobre na cápsula mucilaginosa até 2×10^{-6} mol L⁻¹ Cu²⁺ no meio (Fig. 6A), sendo que após esta concentração um limite de saturação da mucilagem parece ser atingido. Diferentemente do que acontece na mucilagem, o cobre intracelular mante-se em valores basais e quase constantes até 10^{-8} mol L⁻¹ Cu²⁺ livre (Fig. 6B), concentrações consideradas ambientalmente relevantes. Acima disso, o aumento de cobre no meio de cultura causou um aumento no cobre intracelular até um estágio em que não foi detectado mais incremento. Aproximadamente 17 vezes mais cobre no interior das células foi detectado no platô das mais altas concentrações de cobre, isto é, acima de 6×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ quando comparadas com as células expostas aos níveis mais baixos de cobre. A Figura 6C mostra o cobre intracelular em função do cobre na mucilagem. Nesta curva, o ponto de inflexão em que o cobre intracelular começa a aumentar coincide com o valor da EC50 estimada, correspondendo a $\sim 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺ livre no meio (Fig. 6B). Antes desta inflexão, o cobre

é mantido em valores $\sim 10^{-13}$ a 10^{-12} mol célula⁻¹ independente da concentração de cobre no meio ou na mucilagem (Fig. 6A).

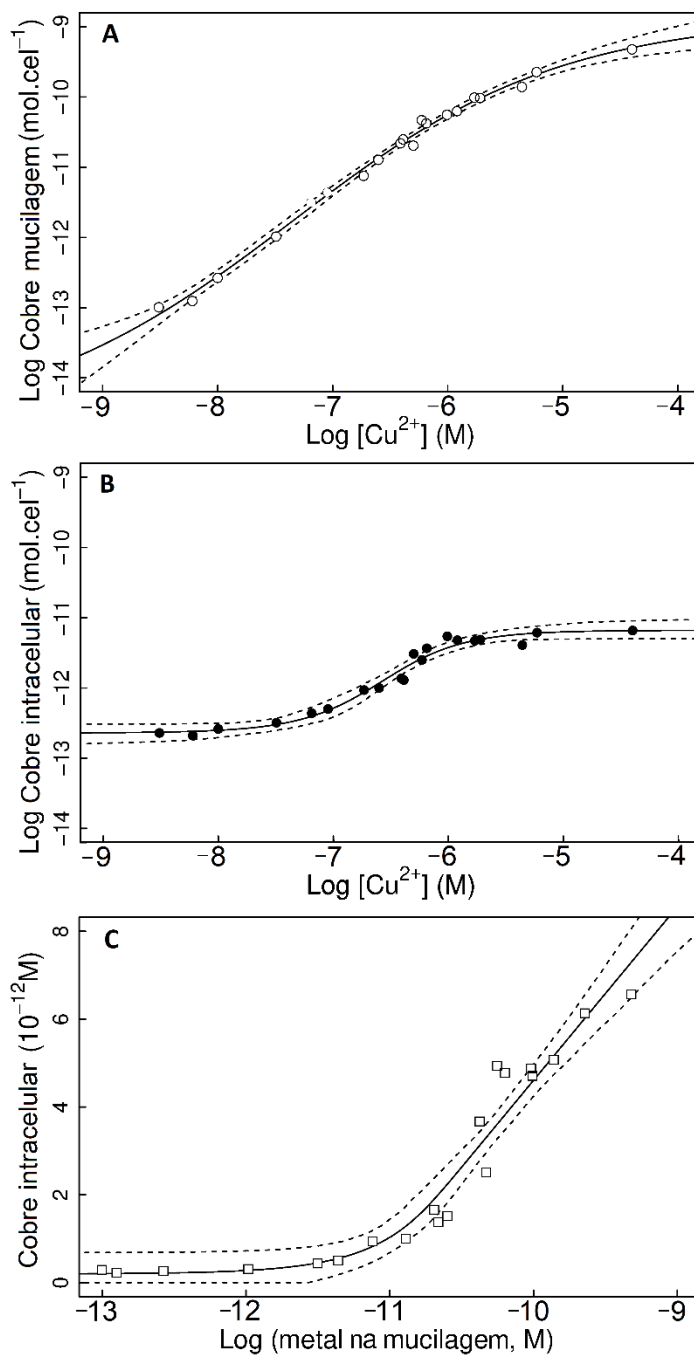


Figura 6. (A) Log do conteúdo de cobre (mol célula⁻¹) na mucilagem (○) e (B) log do cobre (mol célula⁻¹) intracelular (●) em função do log [Cu²⁺] (mol L⁻¹) com intervalos de confiança de 95%; (C) cobre intracelular (mol L⁻¹, □) em função do log de cobre na mucilagem (mol L⁻¹) com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas). EC50 = 1,25x10⁻⁷ mol L⁻¹ (Log -6,903).

Efeitos do cobre na dinâmica populacional

A densidade populacional (células mL⁻¹) e concentração de clorofila *a* em culturas de *K. obesa* após 72 h de crescimento em função da concentração de Cu²⁺ livre foi determinada. Houve uma tendência de decréscimo da densidade populacional com o incremento de cobre no meio de cultura (Fig. 7A). A mesma tendência foi observada para clorofila *a* (µg mL⁻¹), por isso este resultado não foi representado. Como consequência dos efeitos do cobre na dinâmica populacional, as taxas de crescimento decaem com o aumento das concentrações de cobre (Fig. 7B). Esta tendência de queda nas taxas de crescimento ocorre até a concentração de 6x10⁻⁶ mol L⁻¹ Cu²⁺ no meio. Desconsiderando concentrações de Cu menores que 3x10⁻⁸ mol L⁻¹, todos os tratamentos tiveram taxas de crescimento inferiores a 0,3 d⁻¹; a maior concentração de cobre registrou a menor taxa de crescimento (~0,04 d⁻¹). Baseado nos valores das taxas de crescimento ajustados através de uma regressão linear, foi possível calcular o valor da EC50 (1,25x10⁻⁷ mol L⁻¹ Cu²⁺) para *Kirchneriella obesa*. O biovolume (Fig. 7C) aumentou significativamente (p < 0,05) somente na maior concentração de Cu²⁺ testada (4x10⁻⁵ mol L⁻¹), resultando em um volume celular médio quase duas vezes maior que os tratamentos expostos a menos de 10⁻⁶ mol L⁻¹ íons Cu²⁺. Fotomicrografias comparando o aumento do volume das células de *K. obesa* em duas concentrações de cobre distintas podem ser vistas na Figura 8.

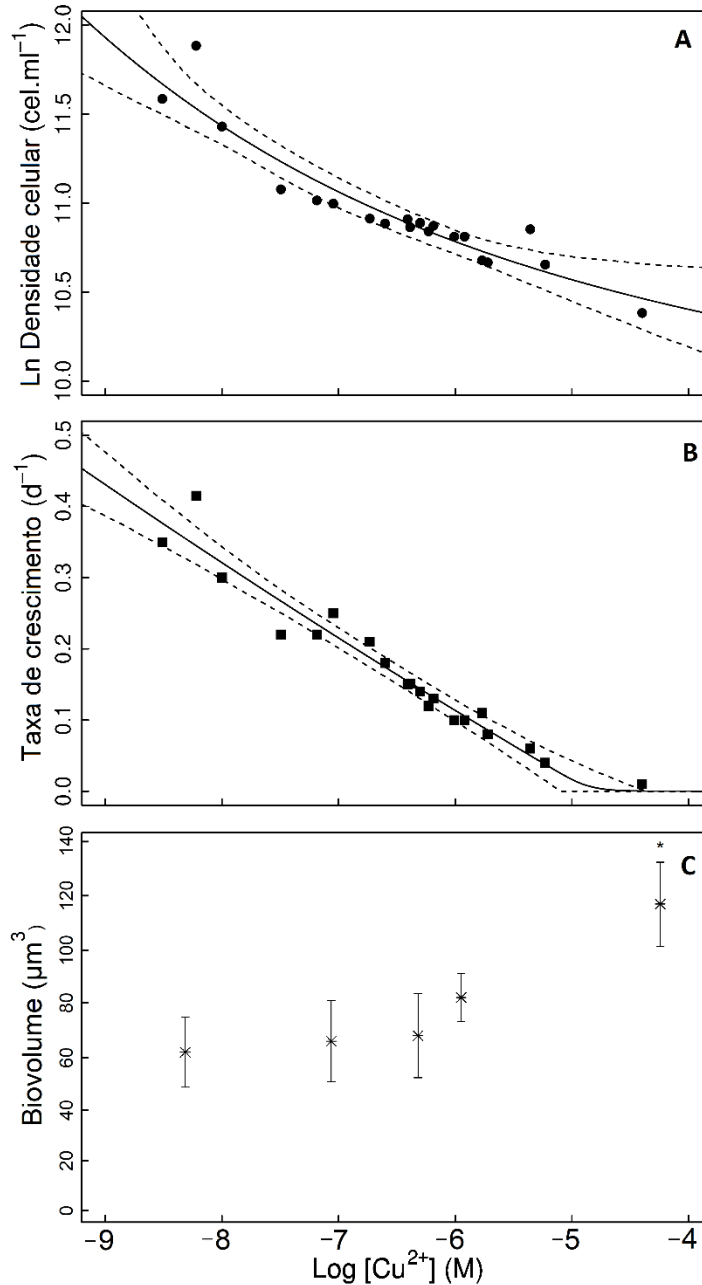


Figura 7. (A) Densidade populacional (● Ln células mL⁻¹) e (B) taxas de crescimento (■ d⁻¹) nas células de *K. obesa* após 72 h de crescimento em função do log [Cu²⁺] (mol L⁻¹) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas); (C) Biovolume (*), medido após 72 h de crescimento em função do log [Cu²⁺] (mol L⁻¹). Barras de erro são o desvio padrão da média (n=50). O símbolo (*) indica diferença estatística significativa, p < 0,05. Equação linear da taxa de crescimento: $y = -0,0966x - 0,4599$, $R^2 = 0,9831$. EC50 = $1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (Log -6,903).

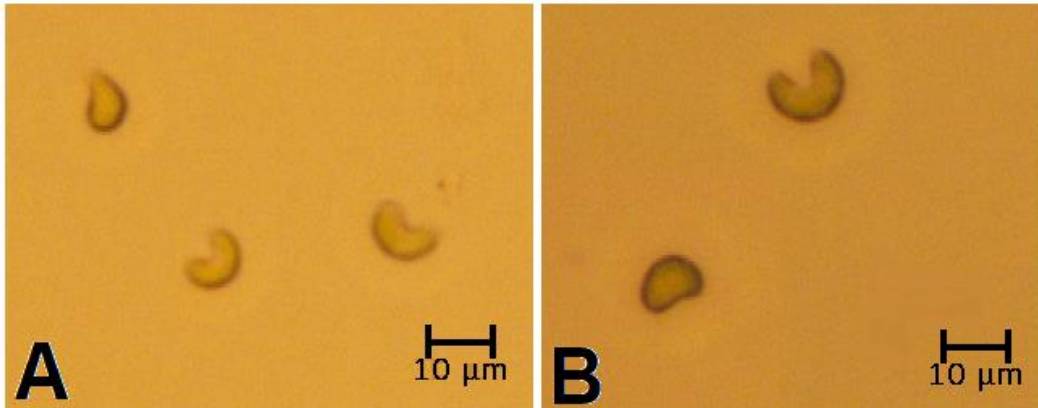


Figura 8. Fotomicrografia de células de *Kirchneriella obesa* dos tratamentos com (A) $4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ e (B) $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, evidenciando a diferença em volume celular. Fotos tiradas em microscópio ótico sob aumento de 40x.

Efeitos do cobre na fotossíntese

A eficiência fotossintética máxima de todos os tratamentos registrou valores acima de 0,7, ainda assim, uma tendência de redução ao longo de toda a amplitude de cobre testada pode ser observada (Fig. 9A). Este parâmetro foi menos sensível que a eficiência fotossintética efetiva, que foi alta nas concentrações de cobre ambientalmente relevantes (até $9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$), decaindo abruptamente nos tratamentos com cobre livre acima de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (valores acima da EC50 estimada). Entretanto, foram observadas eficiências fotossintéticas efetivas por volta de 0,3 nas concentrações $\geq 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ (Fig. 9B). Os valores de qP mostram uma tendência de decréscimo linear com o aumento de cobre livre no meio de cultura até $\sim 6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, depois do qual houve uma estabilização em $\sim 0,4$ (Fig. 9C), por volta de 60% inferior ao valor registrado na menor concentração de cobre testada. O NPQ (Fig. 9D) formou dois grupos distintos de respostas, sendo opostos ao comportamento observado para as eficiências fotossintéticas efetivas. Em concentrações de até $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, um baixo NPQ foi observado ($\sim 0,2$), mas o segundo grupo de tendências de NPQ apresentou valores $\geq 0,9$ expostos a $4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ íons Cu^{2+} e acima.

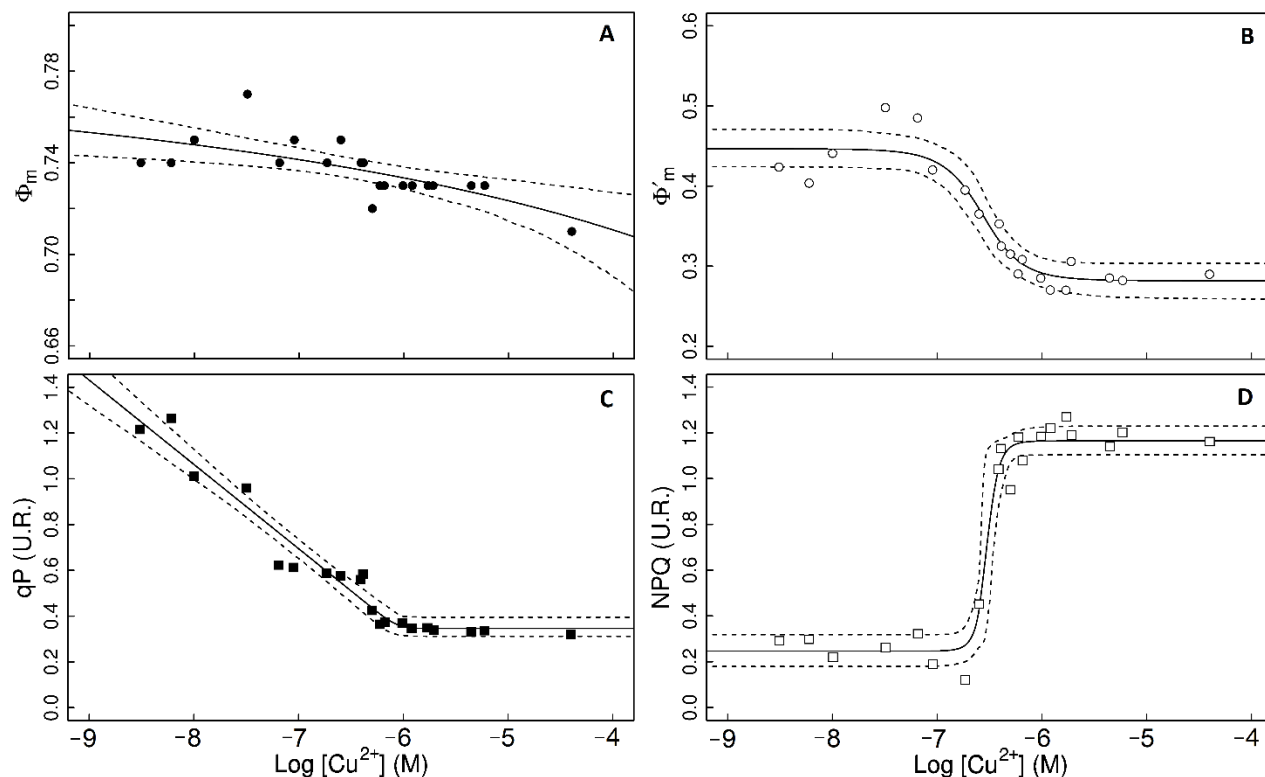


Figura 9. (A) Eficiência fotossintética máxima ($\bullet \Phi_m$), (B) eficiência fotossintética efetiva ($\circ \Phi'_m$), (C) dissipação fotoquímica ($\blacksquare qP$) e (D) dissipação não-fotoquímica ($\square NPQ$) após 72 h de crescimento de *K. obesa* em função do $\log [Cu^{2+}]$ (M) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). $EC_{50} = 1,25 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{Log } -6,903$).

As curvas de saturação de luz e seus parâmetros estão representados na Figura 10. Nota-se que, baseado na $rETR_{max}$, houve a formação de dois comportamentos (Fig. 10B), o primeiro representado pelas cinco menores concentrações de cobre (3×10^{-9} até $6,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} Cu^{2+}$) e o segundo com menores $rETR_{max}$ começando a partir do tratamento $9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} Cu^{2+}$ em diante. Uma tendência similar foi obtida para os valores de E_k , sendo maiores nos cinco tratamentos com baixa concentração de cobre e menores nos demais tratamentos (Fig. 10C). Opostamente, α (Fig. 10D) aumentou nos tratamentos com concentrações intermediárias de cobre em comparação com os extremos do espectro de concentrações testado.

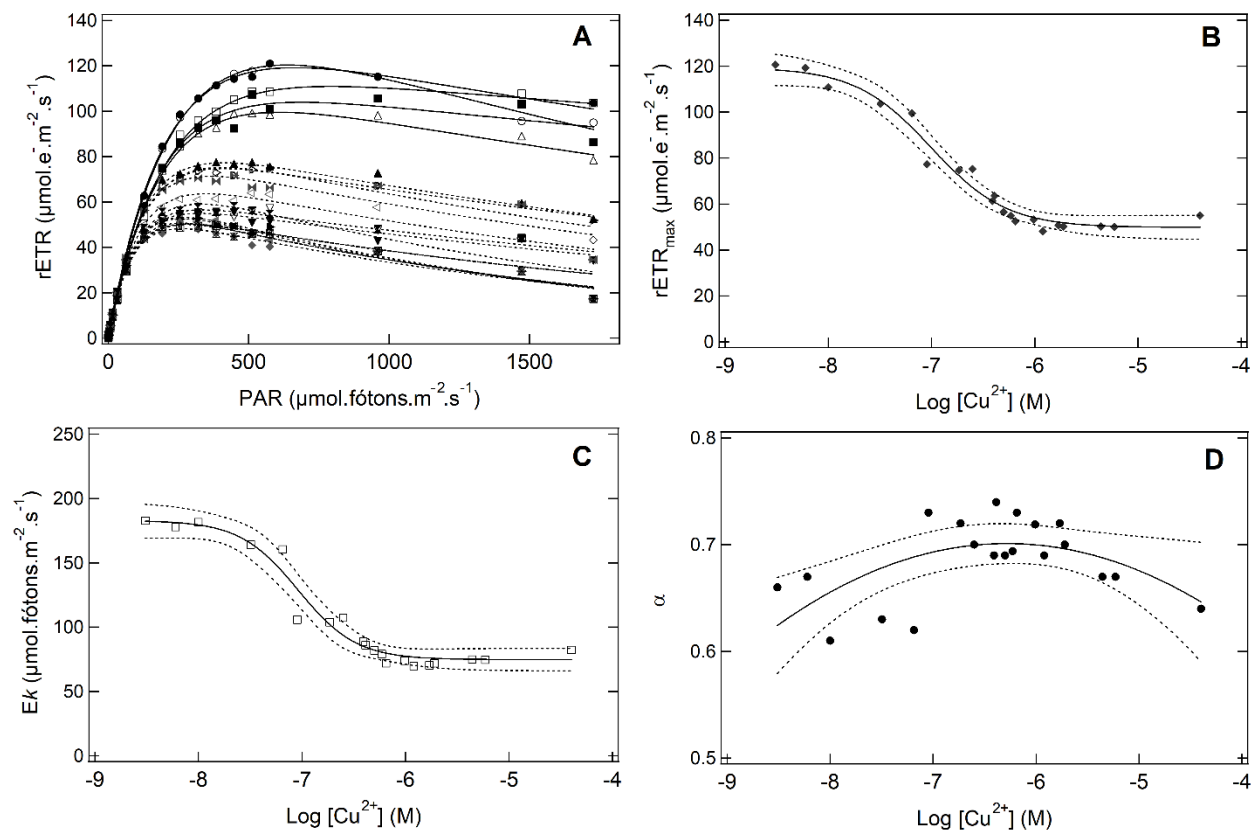


Figura 10. (A) Curvas de saturação de luz reportadas como taxa relativa de transporte de elétrons em função dos valores de PAR (radiação fotossinteticamente ativa) após 72 h de crescimento de *K. obesa* para todos os tratamentos experimentais. Símbolos aplicados para cada concentração de cobre livre em mol L⁻¹: \circ 3×10^{-9} , \bullet 6×10^{-9} , \square 1×10^{-8} , \blacksquare 3×10^{-8} , \triangle $6,5 \times 10^{-8}$, \blacktriangle 9×10^{-8} , ∇ 2×10^{-7} , \blacktriangledown $2,5 \times 10^{-7}$, \triangleleft 4×10^{-7} , \blacktriangleleft $4,5 \times 10^{-7}$, \triangleright 5×10^{-7} , \blacktriangleright 6×10^{-7} , \diamond $6,5 \times 10^{-7}$, \blacklozenge 9×10^{-7} , $+$ 1×10^{-6} , \triangleleft $1,5 \times 10^{-6}$, \blacktriangleleft 2×10^{-6} , \blacktriangleright 4×10^{-6} , \otimes 6×10^{-6} , \otimes 4×10^{-5} . (B) Taxa relativa máxima de transporte de elétrons (\blacklozenge rETR_{max}), (C) irradiância saturante mínima (\square Ek) e (D) eficiência de captura de luz (\bullet α) em função do log [Cu²⁺] (mol L⁻¹) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). EC50 = $1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (Log -6,903).

Efeitos do cobre nas biomoléculas

A Figura 11 mostra os resultados obtidos para biomoléculas. Tendências distintas foram observadas para carboidratos (Fig. 11A) e proteínas (Fig. 11B). Enquanto os carboidratos totais permaneceram praticamente constantes até a concentração de 4×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ livre, proteínas totais aumentaram gradativamente ao longo da amplitude testada.

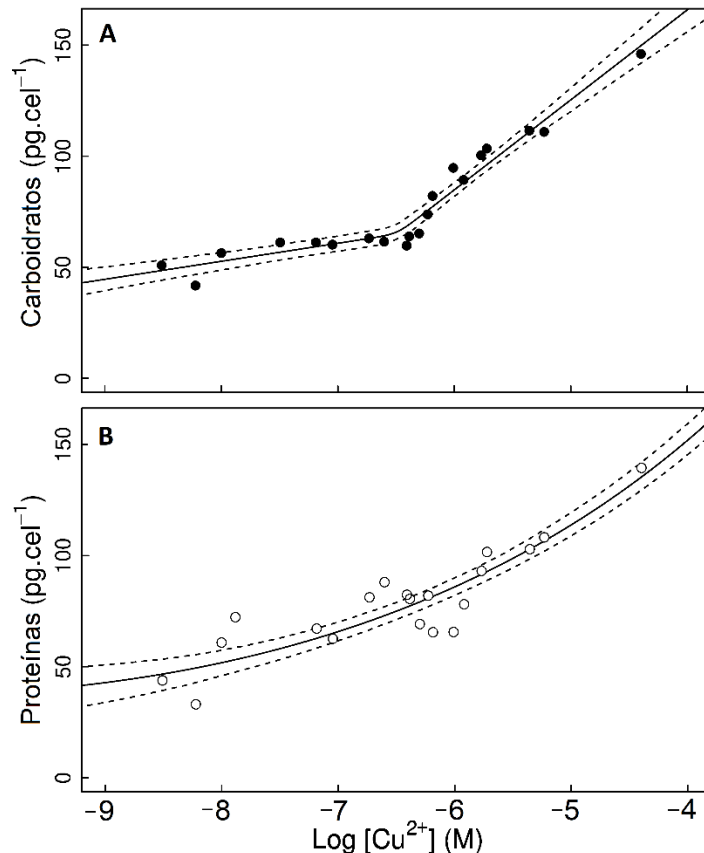


Figura 11. (A) Conteúdo de carboidratos totais (● pg cel⁻¹) e (B) proteínas totais (○ pg cel⁻¹) medidos após 72 h de crescimento de *K. obesa* em função do log [Cu²⁺] (mol L⁻¹) com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). EC50 = 1,25x10⁻⁷ mol L⁻¹ (Log -6,903).

4.1.2. DISCUSSÃO

Cobre intracelular e na mucilagem

O maior conteúdo de cobre na mucilagem em comparação ao nível intracelular com o aumento de íons Cu²⁺ no meio de cultura (em média 7 vezes maior) mostra a importância da cápsula mucilaginosa como uma barreira e um reservatório deste metal. A capacidade de exopolissacarídeos de microalgas complexarem metais como o cobre já foi previamente estudada. Lombardi e Vieira (2000) e Lombardi et al. (2005) mostraram que os exopolissacarídeos de microalgas podem agir como agentes complexantes de cobre, em intensidades baixa ou alta variando de acordo com a fase de crescimento em culturas em batelada e também com a espécie testada. Lombardi et al. (2002) detectou 5 vezes mais cobre na mucilagem de *Kirchneriella aperta* do que no interior das células expostas a 10⁻⁶ mol L⁻¹ cobre livre. De modo similar à

K. aperta (Lombardi et al., 2002), *K. obesa* foi capaz de manter o cobre intracelular em níveis basais até a concentração de $2,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, possivelmente utilizando-se de características fisiológicas, contudo, em concentrações de Cu²⁺ acima desta, a célula perdeu sua habilidade de expulsar os íons de cobre e o metal entrou na célula de maneira proporcional ao seu aumento no meio externo. Tien (2002) analisou a capacidade de remoção de metais de quatro espécies de microalgas de água doce com diferentes características de superfícies celulares. O autor utilizou uma amplitude de cobre nominal que variou de 6×10^{-6} até 6×10^{-3} mol L⁻¹ (ressaltando que havia a presença de ligantes sintéticos no meio de cultura) e observou que *Oscillatoria limnetica* possuía a maior habilidade de se ligar ao cobre, o que ocorria devido a composição de sua mucilagem, apresentando afinidade pelos íons Cu²⁺. De maneira similar, porém utilizando concentrações inferiores de metal, Knauer et al. (1997) investigou a adsorção de cobre na superfície de *Scenedesmus subspicatus* e notou que a ligação do metal com a parede celular preveniu sua internalização. Nos resultados apresentados a mucilagem reteve os íons de cobre até a saturação de seus sítios de ligação, após o qual a internalização do cobre ocorreu aparentemente sem controle, causando efeitos tóxicos e danos ao maquinário celular. Reynolds (2007) discute possíveis vantagens da cobertura de mucilagem em microalgas e cianobactérias, listando a flutuação, sequestro de nutrientes e defesa contra metais e processos oxidativos como principais. De acordo com o autor, a mucilagem cria um microambiente com um gradiente de difusão que contribui para a sobrevivência da célula seja em ambientes com alto índice de O₂ ou com altas concentrações de metais.

Efeitos do cobre na dinâmica populacional

O decréscimo linear das taxas de crescimento em função dos íons de cobre livre presentes no meio de cultivo está de acordo com o relatado na literatura e fortalece o entendimento de que a divisão celular é afetada pelo cobre. Angel et al. (2017) observou uma inibição linear nas taxas de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* ao longo de um espectro restrito de concentrações de cobre nominais, variando de $1,57 \times 10^{-7}$ até $6,29 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em um meio de cultura sem ligantes sintéticos. Similar ao nosso estudo, porém em uma pequena amplitude de cobre livre ($6,3 \times 10^{-7}$ até $3,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ Cu²⁺) com seis diferentes concentrações incluindo o controle, Perales-Vela et al. (2007) mostraram que todos os parâmetros relacionados a dinâmica populacional em culturas de *Scenedesmus incrassatulus* decaem com o aumento do cobre. De modo parecido, Afkar et al. (2010) obteve um decréscimo nas taxas de crescimento quando investigou *Chlorella vulgaris* exposta a íons de cobre em níveis de até 10^{-6} mol L⁻¹ em um meio contendo EDTA. Jiang et al. (2001) observou que o cobre possui a capacidade de afetar a morfologia dos cromossomos e o ciclo de divisão celular. Adicionalmente, Pinto et al. (2003) mostrou que este metal causa danos oxidativos nas células, aumentando a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). De modo

geral, estes efeitos múltiplos induzidos pelo cobre podem causar falhas de vários aspectos do metabolismo, reduzindo a divisão celular e a concentração de clorofila *a*, levando a um decréscimo das taxas de crescimento. Assim como em Perales-Vela et al. (2007), foi observado neste estudo que a dinâmica de crescimento populacional é sensível o suficiente para exibir prontamente os efeitos negativos do cobre em *K. obesa*.

O valor de EC50 obtido para *K. obesa* é cerca de 100 vezes maior que o estimado para *K. aperta* reportado em Lombardi et al. (2002). Os autores estimaram um valor $\sim 10^{-9}$ mol L⁻¹ Cu²⁺ livre, enquanto que para *K. obesa* a EC50 foi de $1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺. Isto mostra que a sensibilidade ao cobre varia mesmo entre espécies com um íntimo grau de parentesco. Na literatura, outras espécies consideradas sensíveis tiveram uma EC50 na casa de 10^{-9} mol L⁻¹ cobre nominal (*Minutocellus polymorphus* em meio F/2 com EDTA; LEVY et al., 2007). *Scenedesmus obliquus*, *Closterium lumula* e *Chlorella pyrenoidosa* foram descritas como espécies resistentes, com EC50 baseada em cobre total estimada em torno de 10^{-6} mol L⁻¹ em meio de cultura sem EDTA (YAN; PAN, 2002).

Efeito do cobre no volume celular

A alteração em biovolume observada pode ser decorrente da incapacidade da célula em se dividir, causada pelo cobre, porém ainda se manter metabolicamente ativa. Este efeito já foi observado tanto com cobre quanto com outros metais de transição em diversas espécies microalgais (FRANKLIN et al., 2002; WILDE et al., 2006). Machado e Soares (2014) analisaram os efeitos de Cu, Cd, Cr e Zn na progressão do ciclo celular de *Pseudokirchneriella subcapitata*, observando um aumento no volume celular. Echeveste et al. (2017) mostraram aumento no volume das células de *Chlorolobium braunii* expostas à íons de cobre e discutem que tal alteração pode ter sido causada pela diminuição da taxa de divisão celular. Isto ocasiona um efeito vantajoso de redução na absorção de metais devido a uma baixa razão superfície-volume em comparação com células menores, como aquelas crescendo em menores concentrações de cobre, o que diminuiria a captação de metal pelas células com maior biovolume, possivelmente reduzindo a toxicidade deste metal. Confirmando esta hipótese, a figura 6B mostra que o cobre intracelular na maior concentração de cobre testada é similar àquela dos tratamentos com menos cobre, o que pode ser interpretado como uma possível diminuição da captação mediada pela redução da razão superfície-volume. A mesma observação foi feita por Silva et al. (2018), investigando a fisiologia da microalga de água doce *Scenedesmus quadricauda* exposta a íons de cobre livre entre 6×10^{-8} mol L⁻¹ e $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, reportando um aumento no volume celular com o incremento da concentração de cobre no meio. Nossos resultados e a literatura sugerem que este aumento em biovolume observado em células estressadas por cobre pode ocorrer devido

a uma redução das taxas de divisão celular, o que altera a morfologia e, como comentado por Echeveste et al (2017), reduz a razão superfície-volume.

Efeito do cobre na fotossíntese

A aparente falta de efeitos perceptíveis no rendimento fotossintético máximo aliado ao decréscimo no rendimento efetivo que ocorreu em torno do valor da EC50 ($1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺ livre) e acima, demonstra que o parâmetro do rendimento máximo não é tao sensível ao cobre quanto os efeitos observados na dinâmica de crescimento populacional, como visto através da taxa de crescimento. Baumann et al. (2009) reportou diferenças na sensibilidade ao cobre de sete espécies de macroalgas marinhas expostas a quatro concentrações de cobre (0, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} e 1×10^{-5} mol L⁻¹ Cu²⁺ íons). A eficiência fotossintética máxima só foi significativamente reduzida em duas espécies e no tratamento com maior teor de cobre, indicando que este parâmetro não é sensível como a eficiência fotossintética efetiva ou operacional, como também observado no presente estudo. Jiang et al. (2016) mostrou uma diminuição na eficiência operacional de *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ cobre nominal em um meio de cultura com ligantes. A Φ'_m menor que 0,2 encontrada pelos autores é similar aos baixos valores encontrados neste estudo para *K. obesa* quando exposta a teores de 10^{-6} mol L⁻¹ cobre livre ou mais.

Foi observado uma redução linear nos valores de qP para *K. obesa* conforme a concentração de cobre aumentava no meio de cultivo até por volta de 10^{-6} mol L⁻¹ de cobre livre. Contudo, acima desta concentração, qP se manteve em torno de ~ 0,3, um valor considerado baixo. De modo similar, Chen et al. (2016), Jiang et al. (2016) e Mallick e Mohn (2003) reportaram comportamentos semelhantes em *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* e em *Scenedesmus obliquus* expostas ao cobre. Estes autores atribuem o decréscimo na dissipação fotoquímica a uma maior proporção de centros de reação inativos devido ao stress causado pelo cobre, alterando a eficiência na transferência de energia entre o complexo antena e os centros de reação do PSII. Também é discutido na literatura os efeitos específicos dos íons de cobre sobre a molécula de plastoquinona, reduzindo a transferência de elétrons entre o PSII e o PSI (FALKOWISK; RAVEN, 2007; MALLICK; MOHN, 2003). A energia luminosa que não foi utilizada na fotossíntese foi dissipada em outras formas, especialmente calor, medida pelo NPQ (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Comparando qP e NPQ, observamos que enquanto qP sofre uma queda linear até um determinado valor, NPQ não aumentou simultaneamente. Ao invés disso, a dissipação não-fotoquímica permaneceu constante e baixa (~0,2) mesmo com o aumento do qP. É provável que o ciclo da xantofila começou a funcionar quando o qP ficou menor que 0,5, causando o aumento repentino de NPQ que, após isto, permaneceu elevado e constante (~1,0). Assim como observado para *K. obesa*, muitas outras espécies de microalgas de água doce apresentam um aumento de NPQ quando expostas à íons de cobre entre as concentrações de 1×10^{-7} e 1×10^{-4} mol L⁻¹, sofrendo uma concomitante redução do qP, uma situação na qual

o NPQ funciona como um mecanismo de autoproteção contra a fotoinibição (DEWEZ et al., 2005; ECHEVESTRE et al., 2017; JIANG et al., 2016; PERALES-VELA et al., 2007). Acreditamos que, para *K. obesa*, o NPQ não funcionou diretamente como um mecanismo de prevenção da fotoinibição, uma vez que qP e o rendimento quântico efetivo estavam praticamente irresponsáveis após os efeitos tóxicos mediados pelo cobre nas reações de luz. Ao invés disso, NPQ possivelmente auxiliou às células debilitadas das maiores concentrações de cobre testadas a apenas sobreviver, sendo incapaz de reverter os danos causados pelo metal aos aparatos fotossintéticos.

Os efeitos do cobre sobre a fisiologia de *K. obesa* foram mais profundamente rastreados através das curvas rápidas de luz (RLC's), as quais os parâmetros concordaram com os rendimentos quânticos e os decaimentos (qP e NPQ). A diminuição da $rETR_{max}$ e do E_k e seus menores valores coincidem com a queda do qP e o aumento do NPQ. A redução destes parâmetros pode indicar que este metal estava afetando as reações escuras da fotossíntese mais do que as reações da fase de luz, como proposto por Yentsch e Lee (1966) na interpretação deles das curvas de luz. Entretanto, a flutuação na capacidade de captação de luz (α) com os seus maiores valores sendo registrados entre 10^{-7} e 10^{-6} mol L⁻¹ Cu²⁺, sugere que as reações de luz foram enfraquecidas e afetadas tanto por concentrações muito baixas quanto por concentrações muito elevadas de cobre.

Wu et al. (2007) mostrou que a RLC de *Microcystis aeruginosa* expostas a $3,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ cobre nominal (meio BG-11 com ligantes sintéticos) resultou em $rETR$ mais baixas e fotoinibição com o aumento dos valores de PAR. Os autores argumentaram que os efeitos do cobre observados nas curvas rápidas de luz se relacionam a danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) agindo no PSII. É comum na literatura a correlação entre concentrações de cobre e produção de ROS, que causam danos celulares severos (JAMERS et al., 2013; PINTO et al., 2003). Contudo, o cobre também causa impactos negativos diretos na performance geral do aparato fotossintético, afetando moléculas importantes como a proteína plastocianina (KNAUERT; KNAUER, 2008; MOHANTY et al., 1989; SAKSUANG et al., 1997). Deste modo, o cobre causa um decréscimo na $rETR_{max}$ e nos valores de E_k , sendo tal efeito observado neste estudo com *K. obesa* e também em outras microalgas como a *C. vulgaris* e *S. incrassatus* (CHEN et al., 2016; PERALES-VELA et al., 2007).

Efeitos do cobre nas biomoléculas

O aumento observado tanto em carboidratos quanto em proteínas é um indicativo de que o cobre afeta a fisiologia de *K. obesa*. Carboidratos são uma forma de material de reserva que pode ser estocada em situações específicas, tais quais a carência de nitrogênio ou fósforo, aumento das intensidades luminosas

ou induzido por metais, sendo posteriormente utilizados pelas células para produzir energia ou sendo excretados ao meio (MARKOU et al., 2012). De acordo com Tripathi e Gaur (2006), que obtiveram um aumento na produção de carboidratos em *Scenedesmus sp.* exposta a duas concentrações de cobre nominal ($2,5 \times 10^{-6}$ e 1×10^{-5} mol L⁻¹) em meio de cultivo BG-11 com EDTA, esta biomolécula é o principal substrato respiratório das microalgas, sendo prontamente acumulada em condições de stress. Resultados similares foram obtidos por Pistocchi et al. (1997) e Wu e Lorenzen (1984) em outras espécies de algas expostas ao cobre. Pistocchi et al. (1997) observou que *Gymnodinium sp.* produz mais carboidratos totais quando exposta a 10^{-6} mol L⁻¹ íons Cu²⁺ em comparação com o controle. De fato, como mostrado na figura 6, a cápsula mucilagínosa de *K. obesa* complexou mais cobre em elevadas concentrações de cobre (acima de 10^{-7} mol L⁻¹), nas quais também foram registrados os maiores conteúdos de carboidratos totais (Fig. 11). Os autores daquele trabalho concluíram que a excreção de carboidratos para o meio extracelular resultou em uma redução na biodisponibilidade de cobre, e conseqüentemente uma menor toxicidade foi observada. Wu e Lorenzen (1984) reportaram um acúmulo de carboidratos em células de *Chlorella fusca* expostas a 10^{-4} mol L⁻¹ de cobre total em meio Kuhl com EDTA, quando comparada com o respectivo controle. Os autores atribuíram este aumento em carboidratos a um distúrbio generalizado do metabolismo celular causado pelo cobre, aliado a inibição da evolução de O₂ ao longo do ciclo claro/escuro, causando efeitos prejudiciais no consumo celular normal de carboidratos. Mais recentemente, Silva et al. (2018) investigou o acúmulo de biomoléculas (lipídeos, carboidratos e proteínas totais em *S. quadricauda* exposta ao cobre e obteve o maior acúmulo de carboidratos ($\sim 3,5 \times 10^{-10}$ g célula⁻¹) em 10^{-6} mol L⁻¹ cobre livre. Em comum, a literatura sugere que o acúmulo de carboidratos em células estressadas por metais pode ocorrer devido a formação de reservas energéticas intracelulares ou como moléculas ligantes de cobre extracelulares sendo que, em ambos os casos, os carboidratos agem na mitigação dos efeitos danosos causados pela concentração excessiva de íons Cu²⁺.

O acúmulo de proteínas obtido para *K. obesa* ao longo do gradiente de aumento de cobre pode ser relacionado com proteínas de desintoxicação de metais, uma vez que este aumento ocorreu de maneira oposta às taxas de crescimento. Logicamente, se tal acúmulo protéico se relacionasse majoritariamente a proteínas estruturais, a tendência seria um decréscimo no conteúdo de proteínas totais com o aumento do cobre, acompanhando a taxa de crescimento, mas foi observado o oposto. Tripathi et al. (2006) detectou um aumento no conteúdo proteico relacionado a defesas antioxidantes em *Scenedesmus sp.* exposta a $2,5 \times 10^{-6}$ e 10^{-5} mol L⁻¹ cobre nominal em meio BG-11 com EDTA. Exposições de longa duração (7 dias) na maior concentração de cobre testada por eles resultou em um aumento de 3 vezes na concentração de superóxido desmutase (SOD). As metalotioneínas, proteínas específicas ligantes de metais que ocorrem em vertebrados, plantas e algas, podem ter sua síntese estimulada por altas concentrações de Cd, Zn, Cu, Hg e Ag, agindo na desintoxicação celular (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Morris et al. (1999) foi o

primeiro a descrever uma metalotioneína sendo produzido por uma alga em resposta ao cobre, sendo esta a macroalga marinha *Fucus vesiculosus*. Similar ao observado neste estudo, Sabatini et al. (2009) observou que *Scenedesmus vacuolatus* produziu quase quatro vezes mais proteínas quando exposta a 10^{-4} mol L⁻¹ cobre total, uma concentração de cobre muito elevada, porém o meio de cultura utilizado pelos autores continha ligantes. Eles atribuíram o aumento em proteínas a um mecanismo de proteção que induziu a síntese de enzimas de desintoxicação e moléculas complexantes de metais. Silva et al. (2018) obteve um aumento no teor de proteínas de *S. quadricauda* exposta ao cobre, com o maior conteúdo de proteínas sendo registrado em células cultivadas em 10^{-6} mol L⁻¹ cobre livre. O acúmulo de proteínas em células de *K. obesa* expostas a concentrações de cobre livre acima dos níveis ambientais ($>10^{-7}$ mol L⁻¹) pode ser relacionado com um mecanismo de proteção e listado como uma das respostas exibidas por esta espécie de microalga para reduzir o efeito da toxicidade do cobre.

4.1.3. CONCLUSÃO

Kirchneriella obesa foi afetada pelo cobre em cultivos unialgais mesmo em concentrações encontradas em ambientes naturais, exibindo um decréscimo no número de células e nas taxas de crescimento, o que reforça a preocupação com os efeitos causados pelo aumento contínuo dos níveis de cobre nos ecossistemas aquáticos. Adicionalmente, foi verificado que a cápsula mucilagínosa de *K. obesa* desempenha um papel fundamental na proteção contra a toxicidade do cobre, agindo como um agente complexante de metais que previne a internalização do cobre. O biovolume não foi alterado em concentrações ambientais, mais aumentou significativamente na maior concentração testada. Em níveis não-ambientais ($\sim 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺ e superior), acima da EC50 estimada para esta microalga, os parâmetros fotossintéticos, bem como a produção de biomoléculas, mostrou sinais de alterações, com a redução da eficiência fotossintética operacional, da dissipação fotoquímica, da rETR_{max} e do *Ek*, contrastando com um aumento na dissipação não-fotoquímica e com o acúmulo de proteínas e carboidratos. Estas modificações são as respostas induzidas por cobre apresentadas por *K. obesa* exposta a um amplo espectro de concentrações, mostrando que mesmo níveis considerados ambientalmente relevantes podem afetar produtores primários e representar riscos ecológicos para a composição e diversidade do fitoplâncton.

4.2. CAPÍTULO 2 – Efeitos do cobre em co-cultivo de *Chlorella sorokiniana* e *Kirchneriella obesa*

4.2.1. RESULTADOS

Efeitos do cobre na dinâmica populacional de C. sorokiniana e K. obesa em co-cultivo

A densidade populacional (células mL⁻¹) de *C. sorokiniana* e *K. obesa* no co-cultivo e em seus respectivos cultivos unialgais em função dos seis dias de crescimento (Fig. 12) mostrou que *C. sorokiniana* atingiu maior densidade populacional na cultura unialgal controle (6×10^{-9} mol L⁻¹ Cu²⁺). Nos outros dois tratamentos de cobre, as maiores densidades celulares desta microalga também foram observadas nos cultivos unialgais. O oposto foi observado para *K. obesa*, que atingiu a maior densidade populacional no co-cultivo controle. Em 2×10^{-7} e $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de cobre livre foi observado mais células de *K. obesa* nos co-cultivos, em comparação com as culturas unialgais expostas à estas mesmas concentrações de cobre. De modo geral, para ambas as espécies, o incremento de cobre reduziu o número de células, seja no co-cultivo ou nos crescimentos isolados.

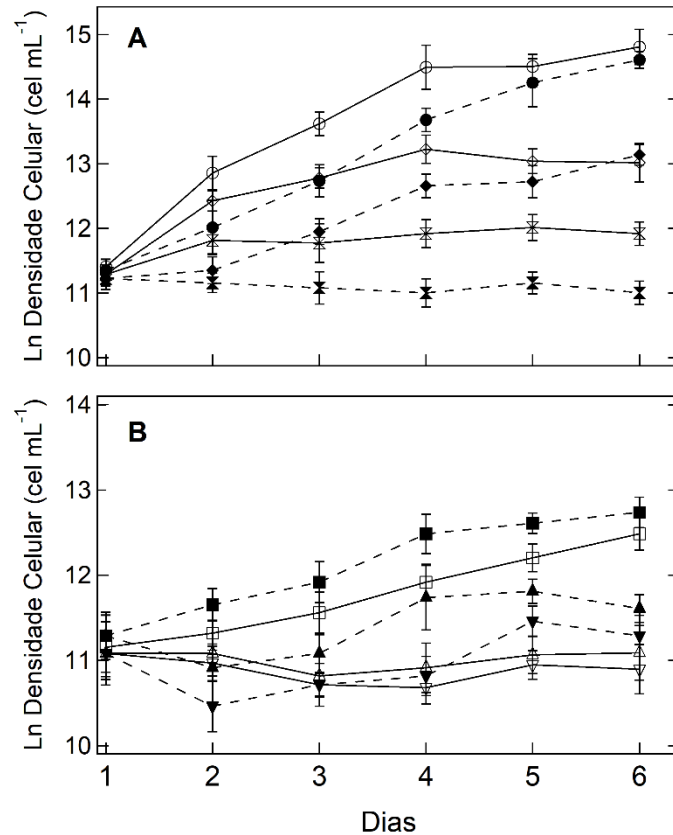


Figura 12. Densidade populacional ($\text{Ln células mL}^{-1}$) de (A) *C. sorokiniana* (em cultivo unialgal, linhas contínuas: ○ controle, ◇ 2×10^{-7} e ⊗ $1,5 \times 10^{-6}$; em co-cultivo, linhas tracejadas: ● controle, ◆ 2×10^{-7} e ⊗ $1,5 \times 10^{-6}$) e de (B) *K. obesa* (em cultivo unialgal, linhas contínuas: □ controle, △ 2×10^{-7} , ▽ $1,5 \times 10^{-6}$; em co-cultivo, linhas tracejadas: ■ controle, ▲ 2×10^{-7} e ▼ $1,5 \times 10^{-6}$) em função dos dias de experimento com desvios padrão representados nas barras.

A Figura 13 mostra a concentração média de cobre livre por célula em cada tratamento. Nota-se que o co-cultivo, por conter mais células, possuía menor exposição potencial ao cobre por célula. Tanto o tratamento de 2×10^{-7} quanto o $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} tiveram diferenças significativas em relação ao controle.

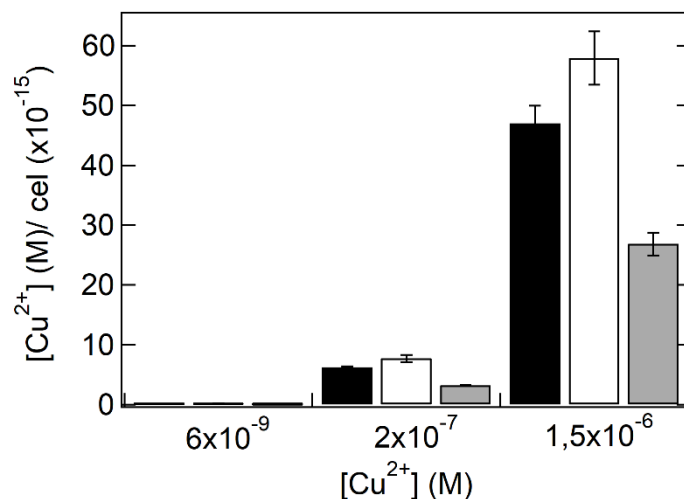


Figura 13. Concentração de cobre livre por células de *C. sorokiniana* (colunas pretas), de *K. obesa* (colunas brancas) e do co-cultivo (colunas cinzas) em função das três concentrações de cobre testadas. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). O símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Observa-se na Figura 14 uma tendência de decréscimo da concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) com o incremento de cobre no meio de cultura. O maior teor de clorofila *a* foi obtido no cultivo unialgal de *C. sorokiniana* controle, enquanto que todos os tratamentos (tanto unialgais quanto em co-cultivo) expostos a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ obtiveram concentrações de clorofila *a* menores que $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

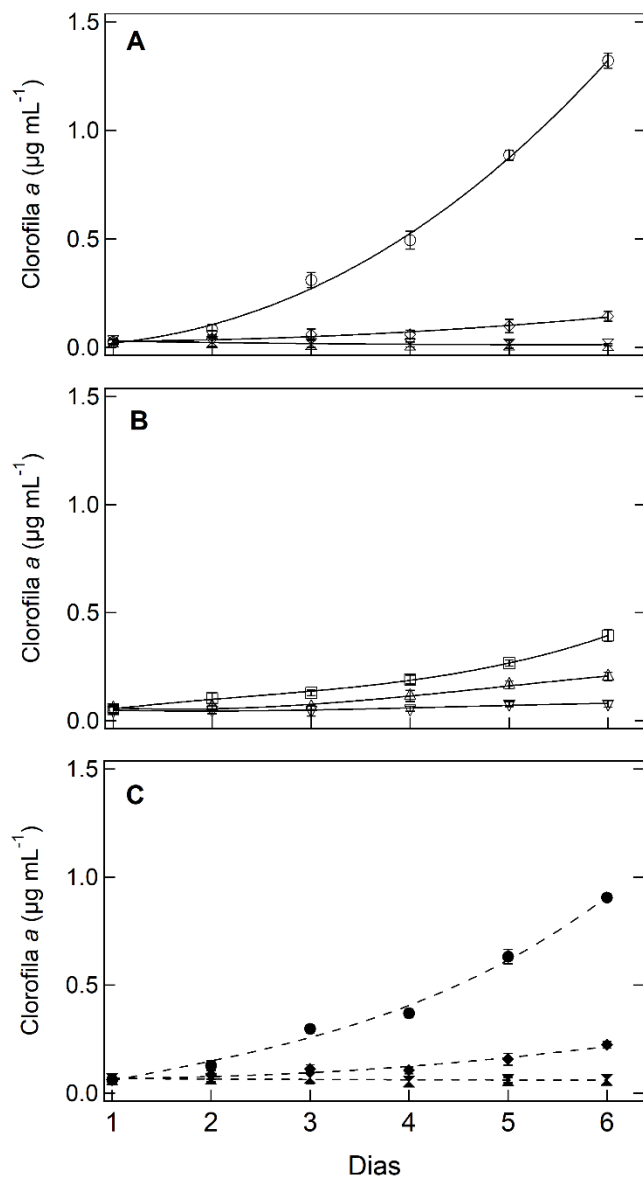


Figura 14. Clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em culturas unialgais de (A) *C. sorokiniana* (\circ controle, \diamond 2×10^{-7} , \square $1,5 \times 10^{-6}$), de (B) *K. obesa* (\square controle, Δ 2×10^{-7} , ∇ $1,5 \times 10^{-6}$) e do (C) co-cultivo (\bullet controle, \blacklozenge 2×10^{-7} , e \blacktriangledown $1,5 \times 10^{-6}$) em função dos dias de experimento com desvios padrão.

O cobre afetou as taxas de crescimento de ambas as populações de microalgas testadas, causando uma redução mais intensa nas taxas de crescimento dos cultivos unialgais (Fig. 15A). Enquanto que nos co-cultivos a concentração de $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ não provocou reduções significativas ($p > 0,05$), nas culturas unialgais houve redução de 55% e de 65% das taxas de crescimento de *C. sorokiniana* e *K. obesa*

em relação ao controle unialgal. Já na maior concentração de cobre testada ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$) todos os tratamentos registraram decréscimos significativos nas taxas de crescimento: 95% e 90% de redução para *C. sorokiniana* em cultura unialgal e no co-cultivo e redução de 80% e ~60% para *K. obesa*. O biovolume (Fig. 15B) aumentou significativamente ($p < 0,05$) na maior concentração de Cu^{2+} testada tanto nos cultivos unialgais como nos co-cultivos (aumento de ~3 vezes em *C. sorokiniana* e de ~30% em *K. obesa*). Um aumento significativo do biovolume também foi detectado nas células de *C. sorokiniana* expostas a 2×10^{-7} mol L^{-1} de cobre.

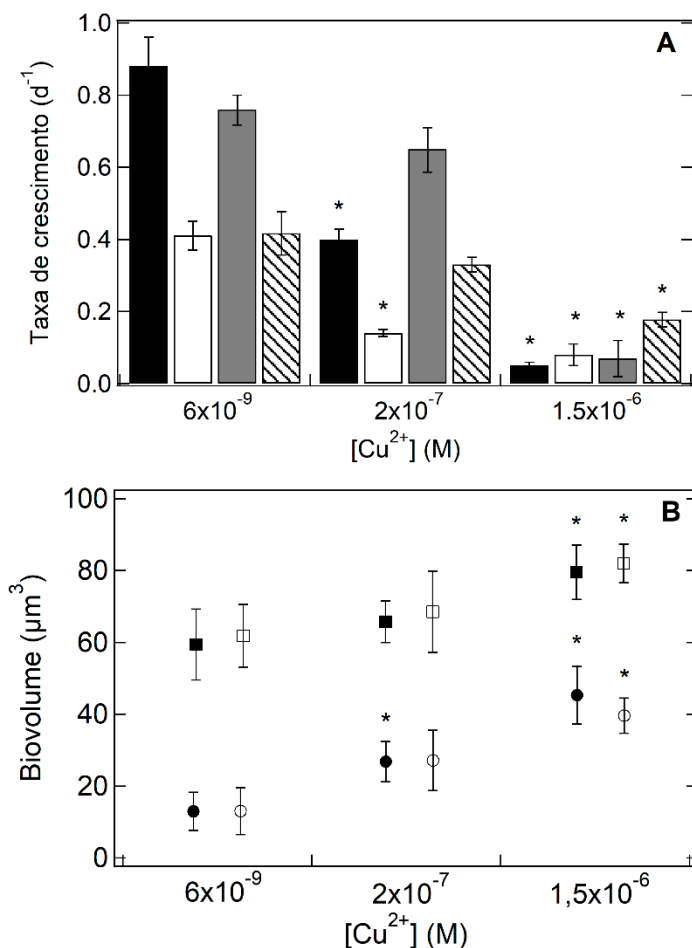


Figura 15. (A) Taxas de crescimento (d^{-1}) das células de *C. sorokiniana* (em cultivo unialgal: colunas pretas; em co-cultivo: colunas cinzas) e de *K. obesa* (em cultivo unialgal: colunas brancas; em co-cultivo: colunas hachuradas) para as concentrações de cobre testadas. (B) Biovolume (μm^3) das células de *C. sorokiniana* (em cultivo unialgal ○; em co-cultivo: ●) e de *K. obesa* (em cultivo unialgal □; em co-cultivo: ■), medido após 72 h de crescimento em função das três concentrações de cobre testadas com desvio padrão. Em ambos, o símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle e barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

Efeitos do cobre no rendimento fotossintético máximo de C. sorokiniana e K. obesa em co-cultivo

A eficiência fotossintética máxima de todos os tratamentos do cultivo unialgal de *K. obesa* registraram valores acima de 0,65 e somente no cultivo unialgal de *C. sorokiniana* exposto a $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ cobre livre houve diminuição significativa para valores menores que 0,6 (Fig. 16). Em relação aos co-cultivos, o controle e a concentração de 2×10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ apresentaram uma leve queda nos valores de eficiência fotossintética máxima ao longo do experimento, ainda assim mantendo-se acima de 0,6. A maior concentração de cobre testada causou redução significativa da Φ_m do co-cultivo, registrando valores similares aos encontrados no cultivo individual de *C. sorokiniana* (< 0,6).

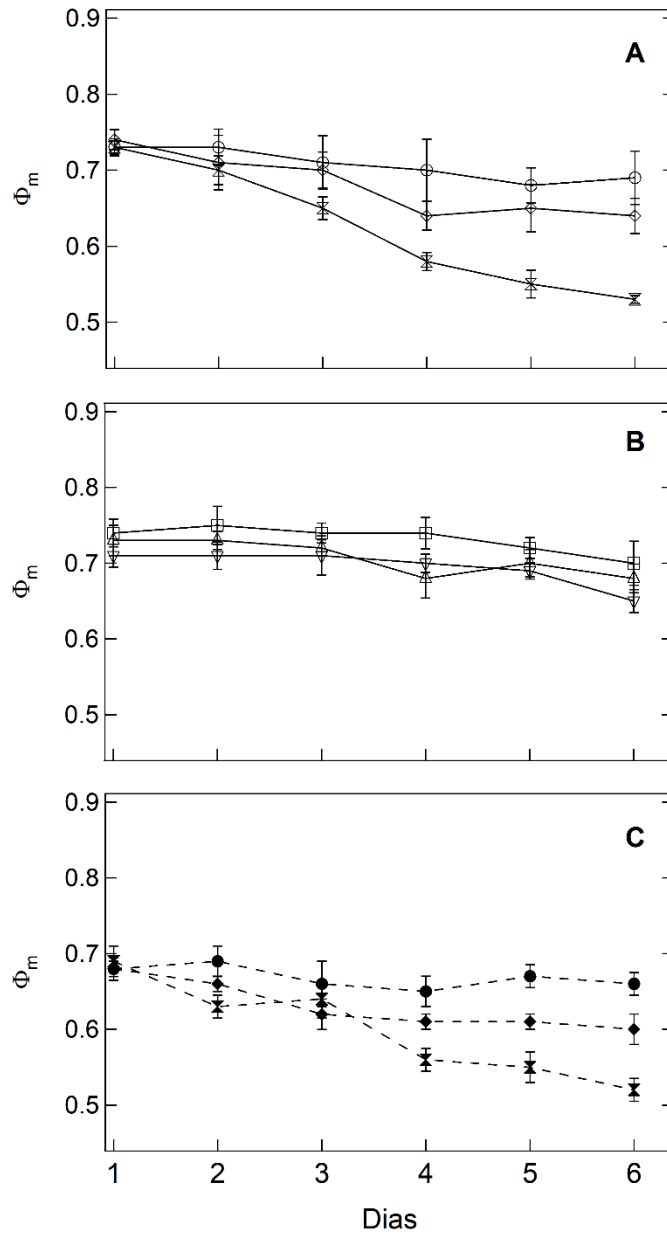


Figura 16. Eficiência fotossintética máxima (Φ_m) de (A) *C. sorokiniana* (\circ controle, \diamond 2×10^{-7} , \boxtimes $1,5 \times 10^{-6}$), de (B) *K. obesa* (\square controle, Δ 2×10^{-7} , ∇ $1,5 \times 10^{-6}$) e do (C) co-cultivo (\bullet controle, \blacklozenge 2×10^{-7} , e \blacksquare $1,5 \times 10^{-6}$) em função do tempo experimental (dias). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

Efeitos do cobre nos parâmetros fotossintéticos de *C. sorokiniana* e *K. obesa*

A eficiência quântica efetivas de ambas as microalgas registraram valores significativamente menores ($p < 0,05$) que 0,3 na concentração mais alta de cobre ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (Fig. 17A). Os valores de decaimento fotoquímica (qP) sofreram reduções de ~ 40% em relação aos controles de ambas as microalgas na concentração $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre e reduzindo em 93% em *C. sorokiniana* e 71% em *K. obesa* expostas a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ (Fig. 17B). O decaimento não fotoquímico (NPQ) aumentou significativamente em relação ao controle para todas as concentrações de cobre em *C. sorokiniana* (5x em $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e cerca de 14x em $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$), mas para *K. obesa* somente houve aumento expressivo de NPQ na maior concentração de cobre.

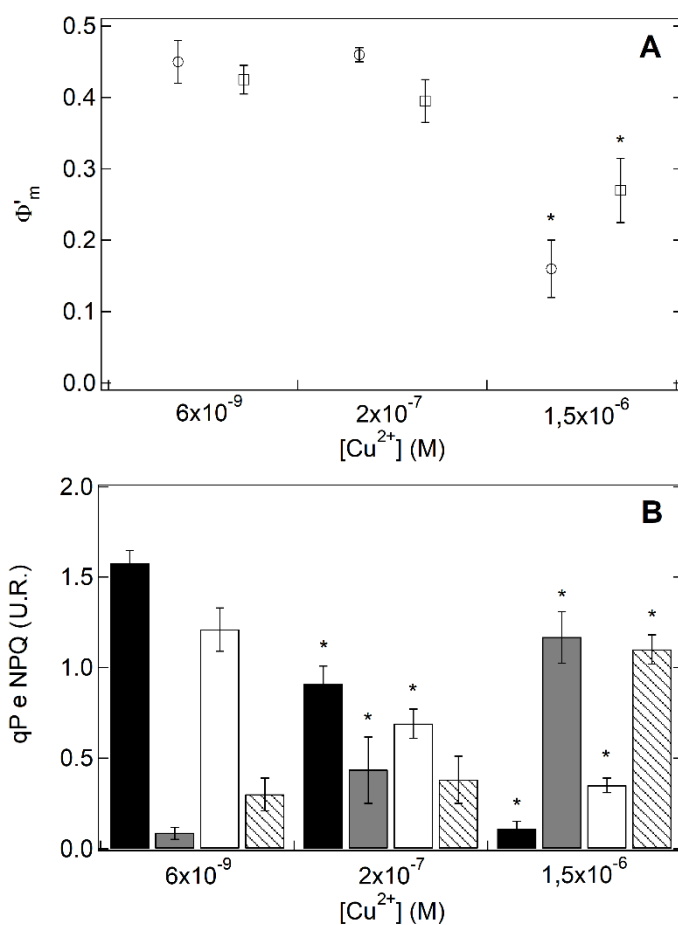


Figura 17. (A) Eficiência quântica efetiva (Φ'_m) de *C. sorokiniana* (\circ) e *K. obesa* (\square). (B) Dissipação fotoquímica (qP) e dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *C. sorokiniana* (qP: colunas pretas; NPQ: colunas cinzas) e de *K. obesa* (qP: colunas brancas; NPQ: colunas hachuradas). Valores obtidos após 72 h de exposição ao cobre. Em ambos, o símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

As curvas rápidas de saturação de luz (RLC) representadas na Figura 18A mostram que houve variação nas respostas das células conforme o tratamento, tendo-se respostas diferentes para as diferentes espécies. Para a espécie *C. sorokiniana*, houve redução expressiva da $rETR_{max}$ (Fig. 18B) na maior concentração de cobre testada, tendência que também se observa no parâmetro E_k (Fig. 18C). Entretanto, para *K. obesa* houve redução significativa de $rETR_{max}$ e E_k ($p < 0,05$) em todos os tratamentos sem variação nos valores de α (Fig. 18D), que mantiveram-se em $\sim 0,7$ em todas as concentrações de cobre. Esta mesma tendência foi obtida para *C. sorokiniana* no controle e na concentração de 2×10^{-7} mol L⁻¹ ($\alpha > 0,5$), porém uma queda significativa no valor de α (0,3) foi obtido na maior concentração de cobre ($1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹).

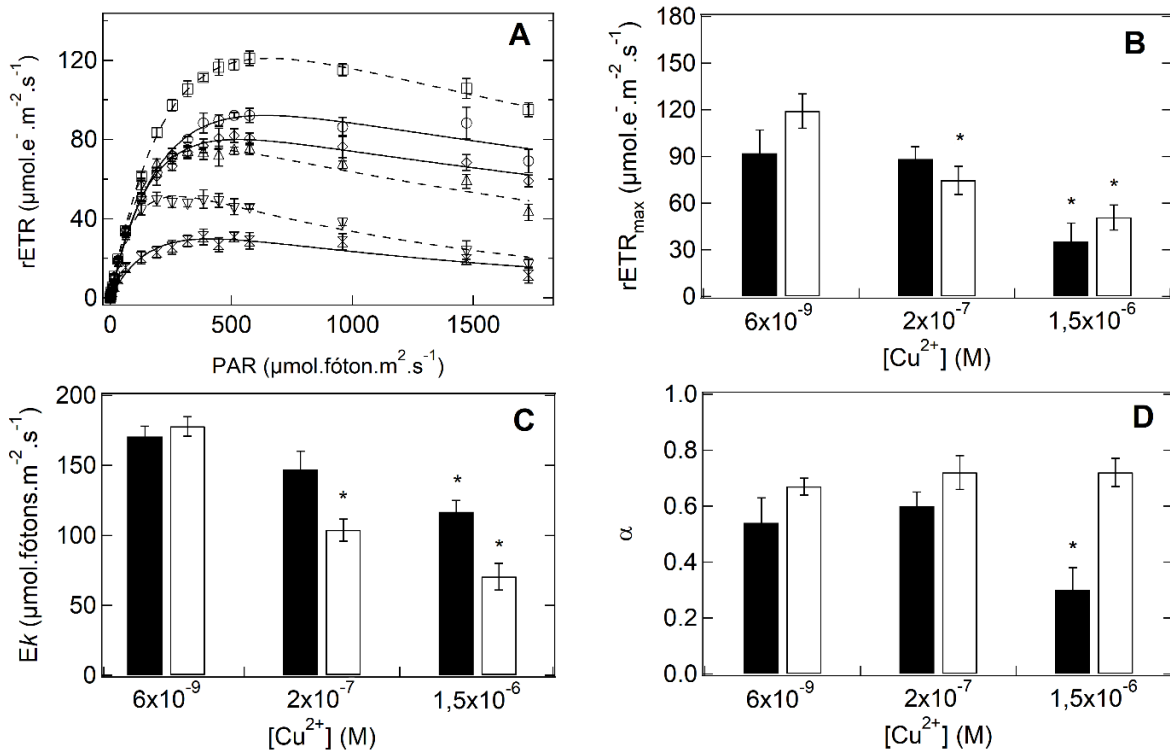


Figura 18. (A) Curvas rápidas de saturação de luz reportadas como taxa relativa de transporte de elétrons em função dos valores de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) após 72 h de crescimento de *C. sorokiniana* (linhas contínuas: \circ controle, \diamond 2×10^{-7} , \boxtimes $1,5 \times 10^{-6}$) e de *K. obesa* (linhas tracejadas: \square controle, Δ 2×10^{-7} , ∇ $1,5 \times 10^{-6}$). Parâmetros da curva de luz: (B) Taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) para *C. sorokiniana* (barras pretas) e *K. obesa* (barras brancas), (C) irradiância saturante mínima (E_k) para *C. sorokiniana* (barras pretas) e *K. obesa* (barras brancas) e (D) eficiência de captura de luz (α) para *C. sorokiniana* (barras pretas) e *K. obesa* (barras brancas) nas concentrações de cobre. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$). Em todos, o símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.2.2. DISCUSSÃO

Efeitos do cobre nas dinâmicas populacionais de C. sorokiniana e K. obesa em co-cultivo

Nas condições de crescimento controle, com baixa concentração de cobre (6×10^{-9} mol L⁻¹ Cu²⁺) as espécies de microalgas testadas apresentaram comportamentos de crescimento distintos. Enquanto *Chlorella sorokiniana* se beneficiou da condição unialgal, apresentando mais células, mais clorofila *a* e registrando a sua maior taxa de crescimento, *Kirchneriella obesa* foi estimulada pelo co-cultivo, produzindo mais células com uma taxa de crescimento um pouco maior que aquela observada em seu crescimento unialgal. É mais comum observar a limitação de crescimento em co-cultivos, uma vez que se acredita que haja a competição por nutrientes e luz entre as diferentes espécies (FERGOLA et al., 2007; NAN et al., 2004). Como o meio de cultura utilizado, o BG-11, é considerado um meio rico em nutrientes, espera-se que não tenha ocorrido limitação nutricional no curto período experimental testado. Um outro fator discutido na literatura é a produção de agentes alelopáticos que inibem o crescimento de algumas espécies de micro-organismos, de acordo com sensibilidades específicas (CHIANG et al., 2004; ZHAO et al., 2014). O gênero *Chlorella* é conhecido pela produção de clorelina, particularmente a espécie *C. vulgaris* (PRATT et al., 1944; DELLAGRECA et al., 2010). No entanto, a espécie *C. sorokiniana* ainda não foi descrita como produtora de clorelina. Caso ela tenha produzido e liberado os ácidos graxos responsáveis pelos efeitos alelopáticos descritos na literatura, estes não afetaram *K. obesa*. Isto pode estar ligado a diversos fatores: diferenças em atividades metabólicas, tamanho celular distinto, presença de cápsula mucilaginosa em *K. obesa* e grande disparidade nas taxas de crescimento destas espécies. Esta tendência de estímulo de uma espécie em co-cultivos foi observada por DellaGreca et al. (2010). Os autores observaram que tanto *Pseudokirchneriella subcapitata* quanto *C. vulgaris* são estimuladas por baixas concentrações de clorelina e de ácidos graxos livres ($< 3,2$ mg L⁻¹) obtidas através da filtração de meio de cultura do co-cultivo destas espécies. Contudo, em altas concentrações de clorelina (> 26 mg L⁻¹), ambas as espécies são afetadas, sendo *P. subcapitata* extremamente sensível. Microalgas em co-cultivos são capazes de alterar o metabolismo e a síntese de biomoléculas uma das outras através de substâncias liberadas no meio extracelular ao longo do tempo, causando tanto efeitos inibitórios quanto de estímulo, dependendo da concentração de biocompostos liberados no meio e da sensibilidade espécie-específica (DUNKER et al., 2013; MAGDOULI et al., 2016; ONCEL et al., 2011).

Com a adição de um fator de estresse, o aumento do cobre no meio de cultivo, as relações interespecíficas de *C. sorokiniana* e *K. obesa* foram refletidas em seus parâmetros de crescimento. Em 2×10^{-7} mol L⁻¹ de cobre livre ambas as espécies em co-cultivo não registraram queda nas taxas de crescimento em relação ao controle, obtendo valores maiores que aqueles observados nos cultivos unialgais expostos a esta mesma concentração de cobre. Os biovolumes nesta concentração também não tiveram um

grande incremento. Muitos trabalhos discutem os efeitos da ausência de ferro em co-cultivos, mostrando que a presença de bactérias produtoras de sideróforos, compostos quelantes de ferro com alta afinidade, contribui para a sobrevivência e estimula o crescimento de microalgas (KEAN et al., 2015; KESHTACHER-LIEBSO et al., 1995; RAJAPITAMAHUNI et al., 2018). Ainda assim, existe uma escassez de trabalhos na literatura discutindo o efeito de outros metais em co-cultivos. Contudo, outros agentes estressores foram testados, como a limitação de luz e de nutrientes. Barreiro e Hairston (2013) observaram que um filtrado sem células do meio de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* combinado com outros fatores de estresse (limitação de fósforo, nitrogênio e redução da intensidade luminosa) é capaz de inibir o crescimento de diversos micro-organismos, tais como *Microcystis aeruginosa*, *Ochromonas danica* e *Cryptomonas ozolinii*. Assim, os autores concluem que a limitação nutricional e de luz agrava os efeitos alelopáticos causados por *C. reinhardtii*. Resultados similares foram descritos por Antunes et al. (2012), ao testar o efeito de *Cylindrospermopsis raciborskii* (produtora de cylindrospermopsina) sob *Ankistrodesmus falcatus*. Os efeitos alelopáticos observados em *A. falcatus*, como redução do volume celular e da taxa de crescimento, estão ligados ao valor do inoculo inicial de *C. raciborskii* usado, devido a uma produção mais intensa de cylindrospermopsina. O efeito de redução de crescimento em *A. falcatus* é agravado pela combinação do co-cultivo com a redução das concentrações de ferro, aumento da intensidade luminosa e alcalinização do meio. Contrário a este efeito, observamos uma redução dos efeitos estressantes do cobre quando na condição de co-cultivo, em comparação às culturas unialgais. Isto pode estar associado a uma produção de distintos agentes extracelulares com função quelante, tais como polissacarídeos (PISTOCCHI et al., 1997) ou proteínas ligantes de metais (SABATINI et al., 2009), o que diminuiria a biodisponibilidade do cobre no meio. Na mais alta concentração de cobre testada, no entanto, todos os parâmetros de crescimento foram afetados, tanto em co-cultivo quanto em culturas unialgais.

É importante, entretanto, ressaltar que a diferença de densidade celular inicial entre os cultivos unialgais e o co-cultivo pode ter afetado parte dos resultados observados. A maior quantidade de células no co-cultivo prevê que, potencialmente, estas células ficaram expostas a menos íons de cobre, como observado na Figura 13. Deste modo, um efeito de atenuação da toxicidade não pode ser descartado. Apesar desta diferença na densidade celular, e mesmo que tenhamos determinado a concentração de cobre livre inicial, sabe-se que outros fatores influenciam na especiação e biodisponibilidade de metais em meios de cultura, como por exemplo fatores físico-químicos (pH e temperatura), a afinidade química e polar com outras moléculas e também a presença de exsudados com função quelante, tais como exopolissacarídeos (PISTOCCHI et al., 1997; SABATINI et al., 2009).

Os efeitos do cobre sobre a fisiologia de microalgas são bem conhecidos e discutidos na literatura para uma gama de espécies. A diminuição da densidade celular e a queda nas taxas de crescimento estão

associadas a efeitos diretos do cobre sobre o aparato fotossintético das microalgas e efeitos indiretos que contribuem para a produção de ROS, danificando a membrana plasmática e a ultraestrutura intracelular (ANGEL et al., 2017; JIANG et al., 2001; TRIPATHI et al., 2006). A redução de síntese de clorofila *a* observada para culturas separadas e conjuntas de *C. sorokiniana* e *K. obesa* provavelmente está relacionado a ação toxica do cobre sobre a síntese de pigmentos (PERALES-VELA et al., 2007; PINTO et al., 2003). O aumento em biovolume, que pode ser interpretado como uma estratégia de sobrevivência devido ao cobre (ECHEVESTE et al., 2017; MACHADO; SOARES, 2014), também expressa um comportamento mais relacionado a toxicidade causada pelo metal do que possíveis efeitos alelopáticos associados ao co-cultivo. Ainda assim, *K. obesa* teve seu crescimento favorecido no co-cultivo em detrimento do crescimento de *C. sorokiniana*. Isto pode estar relacionado ao tamanho celular e à presença da mucilagem, provendo uma proteção adicional para as células de *K. obesa*.

Efeitos do cobre no rendimento fotossintético máximo de C. sorokiniana e K. obesa em co-cultivo

De modo geral, discute-se que os efeitos positivos ou negativos causados por um co-cultivo de microalgas estão intrinsecamente relacionados às espécies utilizadas e possíveis relações que estas desenvolvem no ambiente natural (DUNKER et al., 2013; FERGOLA et al., 2007; ZHAO et al., 2014). Neste estudo, *C. sorokiniana* e *K. obesa* não demonstraram relações antagonistas em relação ao seu crescimento conjunto. Contudo, ao analisar o rendimento fotossintético máximo do aparato fotossintético do co-cultivo, nota-se que este foi inferior aos valores obtidos nos cultivos unialgais, especialmente no controle. Visto que neste tratamento o cobre não era um fator estressante, pode-se atribuir esta pequena redução nos valores de rendimento quântico máximo a um possível efeito de limitação da luz causado pelo sombreamento devido a presença de um número maior de células no meio (MAGDOULI et al., 2016). Como esperado, o cobre reduziu o rendimento fotossintético máximo de todos os tratamentos expostos a 2×10^{-7} e $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ Cu²⁺, sendo o co-cultivo e a cultura unialgal de *C. sorokiniana* as condições com menores valores médios (abaixo de 0,7 após o terceiro dia de experimento). O Φ_m é um parâmetro que varia de acordo com a sensibilidade de cada espécie e, de modo geral, demonstra a saúde celular para valores > 0,7 (JUNEAU; HARRISON, 2005; LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Assim, o cobre afetou o aparato fotossintético destas microalgas, reduzindo seu rendimento fotossintético máximo, através de ações específicas em moléculas como a plastoquinona e a plastocianina, ambas essenciais no transporte de elétrons entre o PSII e o PSI e que já foram descritas como suscetíveis a danos mediados por cobre (KNAUERT; KNAUER, 2008; MALLICK; MOHN, 2003; MOHANTY et al., 1989).

Efeitos do cobre nos parâmetros fotossintéticos de C. sorokiniana e K. obesa

Avaliando separadamente o efeito do cobre nos parâmetros fotossintéticos de *C. sorokiniana* e *K. obesa* observa-se que ambas as espécies somente registraram redução significativa no rendimento fotossintético efetivo na maior concentração de cobre testada ($1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ cobre livre). O valor abaixo de 0,3 registrado para ambas demonstra danos no aparato fotossintético advindos da toxicidade do cobre. Este efeito é confirmado pela redução das dissipações fotoquímicas (qP) observadas em ambas as microalgas nas duas concentrações de cobre testadas acima do controle. Outras espécies que também registraram redução do qP quando expostas ao cobre são *Chlorolobion braunii* (ECHEVESTE et al., 2017), *Scenedesmus sp.* (MALLICK; MOHN, 2003), *Chlorella vulgaris* (CHEN et al., 2016) e *Chlamydomonas reinhardtii* (JIANG et al., 2016). Discute-se que esta redução está associada tanto a diminuição do fluxo de transporte de elétrons nos fotossistemas como também a danos oxidativos causados pelas ROS, que tem sua produção induzida pelo aumento da concentração de cobre. Uma vez que o cobre afeta o aparato fotossintético, tornando-o menos eficiente e debilitado, a luz pode causar danos às células. Ainda assim, as microalgas possuem mecanismos para se proteger, através da dissipação de energia incidente não utilizada na fotossíntese na forma de calor. A dissipação não-fotoquímica (NPQ) aumentou significativamente em *K. obesa* e em *C. sorokiniana*, o que demonstra que estas espécies, quando expostas ao cobre, assim como *Scenedesmus obliquus* (DEWEZ et al., 2005) e *Scenedesmus incrassatulus* (PERALES-VELA, 2007), são capazes de utilizar esta estratégia para reduzir efeitos de danos associado a luz e sobreviver às altas concentrações de cobre no meio.

Com relação às curvas de saturação rápida de luz, observou-se comportamentos ligeiramente distintos para cada uma das espécies testadas. Para *C. sorokiniana*, a fotoinibição nas curvas de luz e a redução de seus parâmetros só ocorreu significativamente na maior concentração de cobre testada, demonstrando que apesar da redução na síntese de clorofila *a*, diminuição da taxa de crescimento e na dissipação fotoquímica, esta espécie foi menos afetada que *K. obesa*, que apresentou fotoinibição e sofreu redução de $rETR_{max}$ e E_k em ambas as concentrações de cobre acima do controle. Estas alterações na fotossíntese mediadas por cobre podem variar de acordo com a sensibilidade de cada espécie testada, como observado neste estudo e em outras microalgas expostas ao cobre (CHEN et al., 2016; SAKSUANG et al., 1997; WU et al., 2007). A eficiência de captura de luz (α), apresentou comportamentos distintos para cada espécie quando expostas a $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de cobre livre. Enquanto *C. sorokiniana* apresenta uma redução, *K. obesa* manteve um alto valor de α . Este comportamento distinto pode estar associado à presença da cápsula mucilagínosa em *K. obesa* e seu possível efeito atenuante sobre a luz incidente na célula. Este parâmetro é calculado nos pontos iniciais da curva de luz, ou seja, em baixa intensidade luminosa (até 64 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Caso a mucilagem reduza ainda mais a intensidade da radiação incidente, as células de *Kirchneriella obesa* seriam capazes de manter uma alta eficiência de captura de luz, mesmo que seu aparato fotossintético estivesse avariado pelo cobre. Já para *C. sorokiniana*, em que as células não estão

envolvidas por mucilagem, a maior concentração de cobre testada foi capaz de danificar os fotossistemas ao ponto de haver redução da eficiência de captura de luz mesmo sob baixas intensidades luminosas.

4.2.3. CONCLUSÃO

Tanto *Chorella sorokiniana* quanto *Kirchneriella obesa* foram afetadas pelo cobre em ambas as condições de cultivo testadas (unialgais e em co-cultivo). O co-cultivo causou respostas distintas nestas espécies, favorecendo o crescimento de *K. obesa* e reduzindo os efeitos tóxicos do cobre na concentração intermediária testada (2×10^{-7} mol L⁻¹), na qual os decréscimos em densidades celulares e das taxas de crescimento ocorreram menos intensamente quando comparados às culturas unialgais. O biovolume de ambas as espécies de microalgas foi alterado pelo cobre, sem aparente relação com os cultivos separados ou em conjunto. Adicionalmente, foi verificado que o cobre afeta a fotossíntese de microalgas de maneira específica, sendo algumas espécies mais sensíveis aos danos mediados pelo cobre do que outras. As modificações observadas neste estudo para os parâmetros de crescimento e fotossíntese são respostas induzidas por cobre em cultivos unialgais de *C. sorokiniana* e *K. obesa* e em seu co-cultivo, o qual não apresentou exclusão competitiva entre as espécies testadas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fisiologia de *Kirchneriella obesa* foi afetada mesmo em concentrações ambientalmente relevantes de cobre em cultivos unialgais. O indicador mais sensível da toxicidade do cobre foi a taxa de crescimento, mas no amplo espectro de cobre testado os parâmetros fotossintéticos e bioquímicos também foram afetados, particularmente nas concentrações acima de 10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺.

O conteúdo de cobre intracelular e na mucilagem foi quantificado nos cultivos unialgais de *K. obesa*, mostrando que há um mecanismo fisiológico que regula a captação de cobre e que, em concentrações acima da EC50 ($1,25 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ Cu²⁺), a mucilagem sofreu saturação e o cobre foi internalizado mais intensamente, causando efeitos nocivos.

Observou-se redução dos parâmetros de crescimento associados ao aumento da concentração de cobre livre no meio, sendo que o aumento do biovolume registrado nas mais altas concentrações tanto nas monoculturas de *K. obesa* e *C. sorokiniana* quanto no co-cultivo evidenciam que o aumento do volume celular ocorre devido ao cobre e pode estar envolvido com uma estratégia de sobrevivência das microalgas. Estas, não podendo se dividir, aumentam em tamanho e acumulam biomoléculas, além da possível redução da internalização do metal através da alteração da razão superfície/volume (células maiores possuem menor razão superfície/volume).

As respostas fotossintéticas de *K. obesa* e *C. sorokiniana* fortalecem a idéia de que o cobre danifica os aparatos fotossintéticos. Houve uma redução do rendimento fotossintético máximo do co-cultivo e ambas as culturas unialgais registraram diminuição do rendimento fotossintético efetivo, taxa de transporte de elétrons máxima e dissipação fotoquímica. As duas espécies testadas foram capazes de utilizar o mecanismo de dissipação não-fotoquímica associado ao calor (NPQ) em uma tentativa de mitigar danos aos fotossistemas.

Os teores de carboidratos e proteínas totais da cultura unialgal de *K. obesa* apresentaram comportamento semelhante, sendo intensamente acumulados nas células expostas a 10^{-7} mol L⁻¹ Cu²⁺ ou acima. O acúmulo destas biomoléculas provavelmente está relacionado com o metabolismo energético da microalga, a produção de enzimas de detoxificação e de moléculas ligantes de metais com ação extracelular, como já demonstrado na literatura.

Apesar de não observar exclusão competitiva entre as espécies testadas, notou-se que *K. obesa* foi favorecida pelo co-cultivo enquanto *C. sorokiniana* sofreu uma redução de densidade celular no co-cultivo quando comparada com seu cultivo unialgal. A presença de mucilagem e o tamanho celular diferente podem ter sido fatores importantes relacionados ao comportamento observado no co-cultivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afkar, E., Ababna, H., Fathi, A.A., 2010. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. *Am. J. Environ. Sci.* 6, 230-237. <http://dx.doi.org/10.3844/ajessp.2010.230.237>.
- Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A., Ghezzehei, T.A., 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* 2, 253-261.
- Alper, J.S., Gelb, R.I., 1990. Standard errors and confidence intervals in nonlinear regression: comparison of Monte Carlo and parametric statistics. *J. Phys. Chem.* 94, 4747-4751.
- Angel, B.M., Simpson, S.L., Granger, E., Goodwyn, K., Jolley, D.F., 2017. Time-averaged concentrations are effective for predicting chronic toxicity of varying copper pulse exposures for two freshwater green algae species. *Environ. Poll.* 230, 787-797.
- Antunes, J.T., Leão, P.N., Vasconcelos, V.M., 2012. Influence of biotic and abiotic factors on the allelopathic activity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* strain LEGE 99043. *Microbial ecology*, 64(3), 584-592.
- Arumugam, A., Sandhya, M., Ponnusami, V., 2014. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake. *Bioresource technology*, 164, 170-176.
- Asare, M.L., Cobbina, S.J., Akpabey, F.J., Duwiejuah, A.B., Abuntori, Z.N., 2018. Heavy Metal Concentration in Water, Sediment and Fish Species in the Bontanga Reservoir, Ghana. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 10(1), 49-58.
- Ashraf, M., Tariq, J., Jaffar, M., 1991. Contents of trace metals in fish, sediment and water from three freshwater reservoirs on the Indus River, Pakistan. *Fish. Res.* 12, 355-364.
- Barreiro, A., Hairston Jr, N.G., 2013. The influence of resource limitation on the allelopathic effect of *Chlamydomonas reinhardtii* on other unicellular freshwater planktonic organisms. *Journal of plankton research*, 35(6), 1339-1344.
- Baumann, H.A., Morrison, L., Stengel, D.B., 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM—chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1063-1075.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Chen, Z., Song, S., Wen, Y., Zou, Y., Liu, H., 2016. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 17910-17918.
- Chia, M.A., Chimdirim, P.K., Japhet, W.S., 2014. Lead induced antioxidant response and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brebisson under different nitrogen concentrations. *J. Appl. Phycol.*, <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0312-8>.

- Chia, M.A., Lombardi, A.T., Melão, M.D.G.G., Parrish, C.C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aqua. Toxicol.* 160, 87-95.
- Chiang, I.Z., Huang, W.Y., Wu, J.T., 2004. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (chlorophyceae). *Journal of phycology*, 40(3), 474-480.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Rev. Plant Bio.* 53, 159-182.
- DellaGreca, M., Zarrelli, A., Fergola, P., Cerasuolo, M., Pollio, A., Pinto, G., 2010. Fatty acids released by *Chlorella vulgaris* and their role in interference with *Pseudokirchneriella subcapitata*: experiments and modelling. *Journal of chemical ecology*, 36(3), 339-349.
- Denison, D.G.T., Holmes, C.C., Mallick, B.K., Smith, A.F.M., 2004. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression. Wiley Series in Probability and Statistics, John Wiley & Sons, Ltd
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 150-159.
- Dunker, S., Jakob, T., Wilhelm, C., 2013. Contrasting effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and physiology of two green algae, *Oocystis marsonii* and *Scenedesmus obliquus*, revealed by flow cytometry. *Freshwater biology*, 58(8), 1573-1587.
- Echeveste, P., Silva, J.C., Lombardi, A.T., 2017. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. *Ecotox. Environ. Safe.* 143, 228-235.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2007. Aquatic Photosynthesis. Princeton University Press, UK.
- Fergola, P., Cerasuolo, M., Pollio, A., Pinto, G., DellaGreca, M., 2007. Allelopathy and competition between *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: experiments and mathematical model. *Ecological Modelling*, 208(2-4), 205-214.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Apte, S.C., Lim, R.P., 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 742-751.
- Granéli, E., Johansson, N., 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N-or P-deficient conditions. *Harmful Algae*, 2(2), 135-145.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403-424.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., Jones, O.A., 2013. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals* 26, 731-740.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Plant* 167, 191–194. doi: 10.1016/S0015-3796(17)30778-3
- Jiang, W., Liu, D., Liu, X., 2001. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biol. Plantarum.* 44, 105–109.

- Jiang, Y., Zhu, Y., Hu, Z., Lei, A., Wang, J., 2016. Towards elucidation of the toxic mechanism of copper on the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotox.* 25, 1417-1425.
- Johnson, D.J., Sanderson, H., Brain, R.A., Wilson, C.J., Solomon, K.R., 2007. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotox. Environ. Safe.* 67, 128-139.
- Juneau, P., Harrison, P.J., 2005. Comparison by PAM Fluorometry of Photosynthetic Activity of Nine Marine Phytoplankton Grown Under Identical Conditions. *Photochemistry and photobiology*, 81(3), 649-653.
- Juneau, P., Berdey, El., Popovic, R., 2002. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch Environ Contam Toxicol.* 42, 155-164.
- Kean, M.A., Delgado, E.B., Mensink, B.P., Bugter, M.H.J., 2015. Iron chelating agents and their effects on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricorutum* and *Spirulina platensis* in comparison to Fe-EDTA. *J. Algal Biomass Util*, 6, 56-73.
- Keshtacher-Liebso, E., Hadar, Y., Chen, Y., 1995. Oligotrophic bacteria enhance algal growth under iron-deficient conditions. *Applied and environmental microbiology*, 61(6), 2439-2441.
- Klausner, R.D., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L., Karnovsky, M.J., 1980. Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 255(4), 1286-1295.
- Knauer, K., Behra, R., Sigg, L., 1997. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 33, 596-601.
- Knauert, S., Knauer, K., 2008. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *J. Phycol.* 44, 311-319.
- Langston, W.J., 2017. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. In *Heavy metals in the marine environment*, CRC Press, US, pp. 101-120.
- Levy, J.L., Stauber, J.L., Jolley, D.F., 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total Environ.* 387, 141-154.
- Levy, J.L., Angel, B.M., Stauber, J.L., Poon, W.L., Simpson, S.L., Cheng, S.H., Jolley, D.F., 2008. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aqua. Toxicol.* 89, 82-93.
- Liu, L., Chen, J., Lim, P.E., Wei, D., 2018a. Dual-species cultivation of microalgae and yeast for enhanced biomass and microbial lipid production. *Journal of Applied Phycology*, 1-11.
- Liu, L., Chen, J., Lim, P.E., Wei, D., 2018b. Enhanced single cell oil production by mixed culture of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula glutinis* using cassava bagasse hydrolysate as carbon source. *Bioresource technology*, 255, 140-148.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J., Duncan, M.J., 1994. Light and photosynthesis. In *Seaweed Ecology and Physiology*, Cambridge Press, England, pp.123-162.

- Lombardi, A.T., Hidalgo, T.M.R., Vieira, A.A.H., 2005. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* 60, 453-459.
- Lombardi, A.T., Hidalgo, T.M.R., Vieira, A.A.H., Sartori, A.L., 2007. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycol.* 46, 74-78.
- Lombardi, A.T., Maldonado, M.T., 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynth. Res.* 108, 77-87.
- Lombardi, A.T., Vieira, A.A., Sartori, L.A., 2002. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). *J. Phycol.* 38, 332-337.
- Lombardi, A.T., Vieira, A.A.H., 2000. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. *Phycol.* 39, 118-125.
- Machado, M.D., Soares, E.V., 2014. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. *Aqua. Toxicol.* 147, 1-6.
- Mackinnon, J.G., 2008. Durbin-Watson Statistic. *The New Palgrave Dictionary of Economics*, Palgrave Macmillan, UK.
- Magdouli, S., Brar, S.K., Blais, J.F., 2016. Co-culture for lipid production: advances and challenges. *Biomass and Bioenergy*, 92, 20-30.
- Maldonado, M.T., Allen, A.E., Chong, J.S., Lin, K., Leus, D., Karpenko, N., Harris, S.L., 2006. Copper-dependent iron transport in coastal and oceanic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1729-1743.
- Mallick, N., 2004. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *J. Plant Physiol.* 161, 591.
- Mallick, N., Mohn, F.H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotox. Environ. Safe* 55, 64-69.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631-645.
- McCracken, M.D., Middaugh, R.E., Middaugh, R.S., 1980. A chemical characterization of an algal inhibitor obtained from *Chlamydomonas*. *Hydrobiologia*, 70(3), 271-276.
- McKnight, D., 1981. Chemical and biological processes controlling the response of a freshwater ecosystem to copper stress: A field study of the CuSO₄ treatment of Mill Pond Reservoir, Burlington, Massachusetts. *Limnol. Oceanogr.* 26, 518-531.
- Moffett, J.W., Brand, L.E., 1996. Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. *Limnol. Oceanogr.* 41, 388-395.
- Mohanty, N., Vass, I., Demeter, S. (1989). Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, QB. *Plant Physiology*, 90(1), 175-179.
- Morris, C.A., Nicolaus, B., Sampson, V., Harwood, J.L., Kille, P., 1999. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochem. J.* 338, 553-560.

- Nan, C., Zhang, H., Zhao, G., 2004. Allelopathic interactions between the macroalga *Ulva pertusa* and eight microalgal species. *Journal of Sea Research*, 52(4), 259-268.
- Nriagu, J.O. 1996. A history of global metal pollution. *Science* 272 (5259), 223-223.
- Oncel, S.S., Imamoglu, E., Gunerken, E., Sukan, F.V., 2011. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono- cultures and co- cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(3), 414-420.
- Perales-Vela, H.V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., Cañizares-Villanueva, R.O., 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* 11, 2274-2281.
- Pinto, E., Sigaud- kutner, T.C., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39, 1008–1018.
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Balboni, V., Boni, L., 1997. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium sp.* *Eur. J. Phycol.* 32, 125-132.
- Platt T., Gallegos C., Harrison W., 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38, 687–701.
- Pratt, R., Daniels, T.C., Eiler, J.J., Gunnison, J.B., Kumler, W.D., Oneto, J.F., Strait, L.A., Spoehr, H.A., Hardin, G.J., Milner, H.W., Smith, J.H.C., 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, pp.351-2.
- Pratt, R., Fong, J., 1940. Studies on *Chlorella vulgaris* II. Further evidence that *Chlorella* cells form a growth-inhibiting substance. *American Journal of Botany*, 27(6), 431-436.
- Price, N.M., Morel, F.M.M., 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* 344 (6267), 658.
- Rajapitamahuni, S., Bachani, P., Sardar, R.K., Mishra, S., 2018. Co-cultivation of siderophore-producing bacteria *Idiomarina loihiensis* RS14 with *Chlorella variabilis* ATCC 12198, evaluation of micro-algal growth, lipid, and protein content under iron starvation. *Journal of Applied Phycology*, 1-11.
- Ralph, P.J., Gademann, R., 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat. Bot.* 82, 222-237.
- Ralph, P.J., Polk, S.M., Moore, K.A., Orth, R.J., Smith Jr, W.O., 2002. Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable irradiance. *J. Experim. Marine Bio. Ecol.* 271, 189-207.
- Rausch, T., 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78, 237-251.
- Reynolds, C.S. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Reynolds, C.S., 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia* 578, 37-45.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiol.* 111, 1–61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- Sabatini, S.E., Juarez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., de Molina, M.D.C.R., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotox. Environ. Safe* 72, 1200-1206.

- Schoo, K.L., Malzahn, A.M., Krause, E., Boersma, M., 2013. Increased carbon dioxide availability alters phytoplankton stoichiometry and affects carbon cycling and growth of a marine planktonic herbivore. *Mar. Biol.* 8, 2145-2155.
- Silva, J.C., Echeveste, P., Lombardi, A.T., 2018. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotox. Environ. Safe* 161, 57-63.
- Silva-Benavides, A.M., Torzillo, G., 2012. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of applied phycology*, 24(2), 267-276.
- Spoehr, H.A., Milner, H.W., 1949. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant physiology*, 24(1), 120.
- Stryer, L. 1988. *Biochemistry* (3rd Edition). W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1998. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* 219, 165-181.
- Tien, C.J., 2002. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochem.* 38, 605-613.
- Tikhonov, A.N. (2014). The cytochrome b6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 163-183.
- Tonietto, A.E., Lombardi, A.T., Choueri, R.B. Vieira, A.A.H., 2015. Chemical behavior of Cu, Zn, Cd and Pb in a eutrophic reservoir: speciation and complexation capacity. *Environ. Sci. Poll. Res.* 22, 15920 – 15930.
- Tripathi, B.N., Gaur, J.P., 2006. Physiological behavior of *Scenedesmus sp.* during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma* 229,1-9.
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K., Amar, A., Gaur, J.P., 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus sp.* during short-and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere* 62, 538-544.
- van Hullebusch, E., Chatenet, P., Deluchat, V., Chazal, P.M., Froissard, D., Botineau, M., Baudu, M., 2003. Copper accumulation in a reservoir ecosystem following copper sulfate treatment (St. Germain Les Belles, France). *Water Air Soil Poll.* 150, 3-22.
- White, K.J., 1992. The Durbin-Watson test for autocorrelation in nonlinear models. *Rev. Econ. Stat.*, 370-373.
- Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 174–185.
- Wu, J.T., Lorenzen, H., 1984. Effect of copper on photosynthesis in synchronous *Chlorella* cells. *Bot. Bull. Acad. Sinica*, 25, 125-32.
- Wu, Z.X., Gan, N.Q., Huang, Q., Song, L.R., 2007. Response of *Microcystis* to copper stress—do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance?. *Environ. Poll.* 147, 324-330.
- Xue, H.B., Sigg, L., 1990. Binding of Cu (II) to algae in a metal buffer. *Water Res.* 9, 1129-1136.
- Yan, H., Pan, G., 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* 5, 471-476.

- Yen, H.W., Chen, P.W., Chen, L.J., 2015. The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation. *Bioresource technology*, 184, 148-152.
- Yentsch, C., Lee, R.W., 1966. A study of photosynthetic light reactions, and a new interpretation of sun and shade phytoplankton. *J. Mar. Res.* 24, 319-337.
- Zhang, Z., Ji, H., Gong, G., Zhang, X., Tan, T., 2014. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresource technology*, 164, 93-99.
- Zhao, P., Yu, X., Li, J., Tang, X., Huang, Z., 2014. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella sp.* U4341 and *Monoraphidium sp.* FXY-10. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(1), 72-77.