

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

TAMIRES DE FREITAS OLIVEIRA

Estudo fisiológico de *Desmodemus spinosus* exposta  
ao cobre na presença e ausência de bactérias

São Carlos – SP

2018

TAMIRES DE FREITAS OLIVEIRA

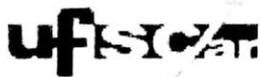
Estudo fisiológico de *Desmodemus spinosus* exposta  
ao cobre na presença e ausência de bactérias

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

Orientadora: Ana Teresa Lombardi

São Carlos – SP

2018



# 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 da candidata Tamires de Freitas Oliveira, realizada em 08/10/2018:

---

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

---

Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini  
UFSCar

---

Profa. Dra. Sílvia Helena Govoni Brondi  
Algaetech

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por me amparar a cada instante e na conclusão desta etapa da minha vida.

Aos meus pais, que foram meu refúgio nos momentos difíceis e felizes.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Algas, em especial a Jaque e Dani, que não mediram esforços para me apoiar e ajudar no que fosse preciso.

Às professoras Ana Teresa e Inessa, pela oportunidade e por todo o conhecimento compartilhado ao longo dos últimos anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

“Deixemos que te diga o tempo, pois mudamente surdo,

ele é o único que sem dizer nada, diz tudo.”

Pedro Calderon de La Banca

## RESUMO

O cobre entra nos corpos d'água por meio de processos físicos e químicos, garantindo sua presença em ambientes aquáticos. Além disso, pode ser despejado em quantidades significativas por atividades industriais, agrícolas e de mineração, gerando resíduos potencialmente tóxicos à saúde da biota aquática. O cobre, é um micronutriente essencial para microalgas e age em processos bioquímicos fundamentais para a manutenção da vida. Entretanto, quando em concentrações acima das usualmente vivenciadas por esses organismos, o cobre pode apresentar efeitos tóxicos e, em consequência, induzir alterações bioquímicas na biomassa algal. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito de comunidade de bactérias do ambiente no metabolismo e sensibilidade da microalga *Desmodesmus spinosus* aos íons de cobre. A pesquisa foi dividida em duas etapas, sendo a primeira realizada para definir as condições da segunda etapa. A etapa 1 consistiu em testar diferentes concentrações de cobre para avaliar parâmetros do crescimento, bioquímica e eficiência fotossintética da microalga. Nessa primeira etapa selecionou-se uma concentração de cobre que apresentasse efeitos nos parâmetros analisados sem ocasionar a morte celular. Esta concentração foi então usada no experimento de exposição à comunidade bacteriana, realizados na segunda etapa. Na etapa 2 foi verificada a influência de bactérias sobre os efeitos do cobre no crescimento, bioquímica e eficiência fotossintética da microalga. As concentrações de cobre testadas na etapa 1 variaram de 0,007 a 3,5  $\mu\text{M}$  e os resultados mostraram que 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  inibiu o crescimento e atividade fotossintética da microalga, ao mesmo tempo em que aumentou a concentração de carboidratos. As interações microalga/bactérias são complexas e podem influenciar nas interpretações do que ocorre no ambiente e em ensaios laboratoriais. Nesta pesquisa concluímos que a presença de bactérias pode alterar a toxicidade do cobre para a microalga. Na etapa 2, a presença de bactérias estimulou o crescimento da microalga, enquanto mantiveram iguais a síntese e acúmulo de clorofila *a* e formaram-se cenóbios com até 8 células, o que não havia sido detectado nos cultivos axênicos. Além disso, na presença de bactérias, 3x mais carboidratos foram acumulados na biomassa algal. Mostramos que *D. spinosus* é uma microalga tolerante ao cobre podendo, por isso,

ser indicada em processos de biorremediação de ambientes contaminados com esse elemento.

**Palavras-chave:** Fitoplâncton. Bactérias. Composição bioquímica. Fotossíntese.

### ABSTRACT

Copper enters water bodies through physical and chemical processes, thus ensuring their presence in aquatic environments. In addition, it can be dumped in significant amounts by industrial, agricultural and mining activities, generating residues potentially toxic to aquatic biota. Copper is an essential micronutrient for microalgae and acts in biochemical processes that are fundamental to maintaining their life. However, when in concentrations above those usually experienced by these organisms, copper may have toxic effects and, as a consequence, induce biochemical changes in algal biomass. This study aimed at investigating the effects bacteria community on copper toxicity to the microalgae *Desmodesmus spinosus* and its interference in metabolic processes such as the synthesis and accumulation of biomolecules. This research was divided into two parts. In the first one we exposed axenic cultures of *D. spinosus* to several copper concentrations in order to define one concentration to be tested in the presence of bacteria, the second part. Growth parameters, biomolecules and photosynthetic activity of the microalga were evaluated in both the absence and presence of bacteria. Our objective in the first part was to select a copper concentration that affected the general microalgae metabolism but did not cause its death. For the first part copper concentrations ranged from 0.007 to 3.5  $\mu\text{M}$  and the results showed that 3.5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  inhibited the growth and photosynthetic activity of the microalga, while increasing the carbohydrate concentration. Microalga / bacterial interactions are complex and can influence the interpretation of what occurs in the environment and in laboratory tests. In this research, we conclude that the presence of bacteria can alter the toxicity of copper to microalgae. In part 2, the presence of bacteria stimulated the growth of microalgae, while kept equal to the synthesis and accumulation of chlorophyll and formed up to 8 cenobia cells, which had not been detected in axenic cultures. In addition, in the presence of bacteria, 3x more carbohydrates were accumulated in the

algal biomass. We showed that *D. spinosus* is a copper-resistant microalgae and can therefore be indicated in bioremediation processes of environments contaminated with this element.

**Keyword:** Phytoplankton. Bacteria. Biochemical composition. Photosynthesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Desenho experimental da Etapa 1 de exposição de *Desmodesmus spinosus* ao cobre em cultivos axênicos..... 19
- Figura 2.** Fluxograma ilustrando o desenho experimental da Etapa 2 com *Desmodesmus spinosus* exposta ao cobre, na concentração nominal de 10  $\mu\text{M}$  na presença e ausência de bactérias. Símbolos: Ax: cultivo axênico; Bact: cultivo contaminado com bactérias; Ax+Cu: cultivo axênico acrescido de 10  $\mu\text{M}$  cobre; Bact+Cu: cultivo contaminado com bactérias e acrescido de 10  $\mu\text{M}$  cobre. .... 21
- Figura 3.** Aclimação e curva de crescimento de *D. spinosus* durante exposição ao cobre livre. Os símbolos representam as diferentes concentrações do metal, em  $\mu\text{M}$ , sendo que 0.007 equivale ao controle. Apresentamos o logaritmo natural da abundância de cenóbios (cenóbios  $\text{mL}^{-1}$ ) em função do tempo experimental (dias). A seta indica momento de amostragem na fase exponencial de crescimento (48 h após inóculo do 11<sup>o</sup> dia). Barras de erros representam o desvio-padrão (n=3).... 30
- Figura 4.** Parâmetros do crescimento populacional nas culturas de *D. spinosus* no 13<sup>o</sup> dia em função do Log da concentração de cobre livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ): (a) Abundância de cenóbios (cenóbios  $\text{mL}^{-1}$ ), (b) Concentração da clorofila a ( $\text{pg cél}^{-1}$ ) e a (c) taxa de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) calculada a partir dos dados de abundância populacional. Barras de erro indicam o desvio-padrão (n=3)..... 31
- Figura 5.** Carboidratos totais e proteínas totais em função das concentrações de cobre ( $\mu\text{M}$ ) para os tratamentos no 13<sup>o</sup> dia exposição ao metal. Barras de erro indicam o desvio-padrão (n = 3) e asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )..... 32
- Figura 6.** Rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e efetivo ( $\Phi' M$ ) e decaimentos de fluorescência (qP, NPQ) nos cultivos de *D. spinosus* mantidos nas várias concentrações de cobre livre ( $\mu\text{M}$ ) no 13<sup>o</sup> dia de exposição. Valores de fluorescência reportados em unidades arbitrárias (U.A.). Barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )..... 33
- Figura 7.** Curvas rápidas de saturação luminosa reportada como taxa de transporte de elétrons (ETRrelativa) em função da intensidade luminosa ( $\mu\text{mol de fótons m}^2\text{ s}^{-1}$ ) para os tratamentos no 13<sup>o</sup> experimental. Cada símbolo representa uma concentração de cobre livre ( $\mu\text{M}$ ). Barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3). .... 33
- Figura 8.** Logaritmo natural da abundância de células (a) e fluorescência da clorofila a (b) em função do tempo experimental de 96 horas. Barras de erros indicam o desvio-padrão (n=3)..... 41

- Figura 9.** Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) de *D. spinosus* no obtida até 48 h. Barras de erro indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p<0,05$ )..... 42
- Figura 10.** Curva do crescimento bacteriano em função do tempo experimental de 96 horas. Barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ). ..... 42
- Figura 11.** Porcentagem do número de células por cenóbios em função dos diferentes tratamentos em 96 horas de exposição ao cobre. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ) e barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ). ..... 43
- Figura 12.** Imagens ampliadas 40x dos cultivos em 96 horas de exposição ao cobre mostrando os cenóbios formados..... 44
- Figura 13.** Carboidratos totais e Proteínas totais em função dos tratamentos para o tempo experimental de 48 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ) e barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ). ..... 45
- Figura 14.** (a) Rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e efetivo ( $\Phi'_{M}$ ) e (b) dissipações fotoquímica - qP e não-fotoquímica - NPQ nos cultivos de *D. spinosus* em 48 horas de exposição ao cobre. Valores de fluorescência reportados em unidades arbitrárias (U.A.). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ) e barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ). ..... 46
- Figura 15.** Curvas rápidas de saturação luminosa reportada como taxa de transporte de elétrons (ETR relativa) em função da intensidade luminosa ( $\mu$  mol de fótons  $m^2 s^{-1}$ ) para os tratamentos em 48 h do tempo experimental. Barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ). ..... 47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Íons de cobre livre e concentração inicial de cobre total adicionado.**  
Valores das concentrações reportados em mol L<sup>-1</sup> e μM..... 29
- Tabela 2: Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas de saturação de luz no 13<sup>o</sup> dia de exposição ao cobre.** Valores médios de ETRrelativa máxima (ETR<sub>m</sub>), inclinação inicial da curva ( $\alpha$ ) e intensidade luminosa de saturação (E<sub>k</sub>). Desvio padrão entre parênteses (n=3). Letras indicam diferenças estatísticas (p<0,05)..... 34
- Tabela 3: Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas de saturação de luz em 48 horas de exposição ao cobre.** Valores médios de ETR relativa máxima (mETR), inclinação inicial da curva ( $\alpha$ ) e intensidade luminosa de saturação (E<sub>k</sub>). Desvio padrão entre parênteses (n=3). Letras indicam diferenças estatísticas (p<0,05)..... 47

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1    Objetivos específicos.....	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1    Condições de cultivo.....	18
3.2    Taxas de crescimento e cálculo da EC <sub>50</sub> .....	23
3.3    Determinação de cobre livre.....	25
3.4    Carboidratos e proteínas intracelulares totais.....	25
3.5    Análises fotossintéticas.....	26
3.6    Análise estatística.....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
4.1 <b>CAPÍTULO 1:</b> Efeitos do cobre no metabolismo da microalga <i>Desmodesmus spinosus</i> (Chlorophyceae, Scenedesmaceae).....	29
4.1.1    RESULTADOS.....	29
4.1.2    DISCUSSÃO.....	34
4.1.3    CONCLUSÃO.....	39
4.2 <b>CAPÍTULO 2:</b> A influência das bactérias no metabolismo da microalga <i>Desmodesmus spinosus</i> ao cobre.....	40
4.2.1    RESULTADOS.....	40
4.2.2    DISCUSSÃO.....	48
4.2.3    CONCLUSÃO.....	55
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas em geral são de grande interesse às indústrias de alimento e farmacêutica, em áreas ambientais e da biomedicina (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012). Esses organismos, em sua maioria fotossintéticos, respondem às perturbações antrópicas sofridas no meio e possuem, ao longo do tempo, a capacidade de aclimatar-se às diferentes condições ambientais, como por exemplo, através de alteração em sua composição bioquímica. Além de sua importância ecológica, as microalgas também são capazes de produzir quantidades significativas de biomassa a fim de que possam ser utilizadas como fertilizantes, material cimentante em peletização de sementes (MONTANHIM, et al., 2014), bem como a produção de lipídeos e pigmentos que as tornam uma opção na geração de energia através dos biocombustíveis (MENEZES et al., 2013). Microalgas também produzem biomoléculas como os carboidratos e proteínas (CARDOSO; ELIZA; MARQUES, 2011) e, para a obtenção e manutenção de biomoléculas existem alguns elementos que são essenciais como, por exemplo o nitrogênio, fósforo, cobre, enxofre, dentre outros (BEER et al., 2009).

O cobre é um desses micronutrientes essenciais ao fitoplâncton e age em processos bioquímicos fundamentais para a manutenção da vida, como por exemplo, na cadeia respiratória, na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos, e também atua em diversas reações como cofator enzimático e, junto com enzimas, na cadeia de transporte de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2004). A resolução CONAMA n° 430, de 13 de maio de 2011, estabelece padrões de qualidade da água doce com concentração de cobre dissolvido igual à  $1 \text{ mg L}^{-1}$

(equivalente à  $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) e é considerada ambientalmente segura para os microrganismos nos corpos d'água. Entretanto, quando em concentrações acima das requeridas pelo fitoplâncton, esse metal pode apresentar efeitos tóxicos (ANDREAZZA et al., 2013; KÜPPER; KÜPPER; SPILLER, 1996; LOMBARDI; MALDONADO, 2011) e, em consequência induzir alterações bioquímicas na biomassa algal. O cobre atinge os corpos d'água por meio de processos físicos e químicos, como o intemperismo ou infiltração em solos e rochas, o que garante sua presença em ambientes aquáticos (MARTIM; SANTOS, 2013). Além disso, pode ser despejado em quantidades significativas por atividades industriais, agrícolas e de mineração, gerando resíduos potencialmente tóxicos à saúde da biota aquática (YRUELA, 2005). Este metal pode ser encontrado ionizado em três principais formas no ambiente,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{3+}$ , e é principalmente na forma do íon hidratado  $\text{Cu}^{2+}$  que está biodisponível. Este estado de oxidação (+2) é o mais estável e abundante dentre as três formas (COUTINHO; COUTINHO; MAZO, 2009).

Em ambientes naturais que recebem ações antropogênicas onde o cobre entra como contaminante, os microrganismos podem ficar expostos ao metal por longos períodos de tempo, assim, diversos mecanismos de sobrevivência/adaptação relacionados à presença de metais estão presentes nas microalgas, sendo a biossíntese de proteínas quelantes de metais (fitoquelatinas) um deles (MEJÁRE; BÜLOW, 2001). Na presença de cobre e dependendo de sua concentração, a microalga pode apresentar estresse oxidativo (HAMED et al., 2017), alterações nos processos fotossintéticos (LOMBARDI; MALDONADO, 2011), aumento da produtividade lipídica (YANG et al., 2015) e também, alteração nas proteínas e carboidratos (PISTOCCHI et al., 1997; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018). Organismos aquáticos tendem a acumular esses metais ou outros contaminantes

orgânicos em seus tecidos, podendo ofertar grandes riscos de contaminação de toda uma cadeia trófica. Neste contexto, microalgas têm sido destaque nos estudos de tratamento de efluentes e bio sorção de metais tóxicos (DAL MAGRO et al., 2013; MEZZOMO et al., 2010). As microalgas clorofíceas são comumente empregadas em bioensaios toxicológicos, pois são facilmente cultivadas em laboratório. E estes estudos são importantes para determinar o efeito tóxico de agentes estressores após exposição a diferentes doses.

Apesar do grande interesse em microalgas como fonte de estudos ecotoxicológicos e sua importância nos ecossistemas aquáticos, poucas informações estão disponíveis acerca da influência que a comunidade bacteriana pode causar sobre os efeitos de metais nas microalgas. Sabe-se que a interação microalgas-bactérias pode resultar em efeitos sobre a biomassa das microalgas podendo inibir ou estimular o seu crescimento (WANG et al., 2014).

Em ambientes naturais, a interação fitoplâncton-bactéria é importante para os ciclos biogeoquímicos dos elementos, como o carbono, nitrogênio, entre outros. Sabe-se, por exemplo, que a fixação do nitrogênio por algumas cianobactérias pode ser estimulada na presença de bactérias (PAERL, 1977). O estudo dessas interações são de importância ecológica e biogeoquímica, uma vez que são fatores fundamentais na construção e manutenção das comunidades aquáticas. Dados da literatura mostram que em um processo sinérgico, as bactérias fornecem o CO<sub>2</sub>, vitaminas e muitas vezes fatores promotores de crescimento (CROFT et al., 2005; LE CHEVANTON et al., 2013; PAERL et al., 2015) às microalgas, que por sua vez, através da fotossíntese, produzem O<sub>2</sub> e matéria orgânica que auxiliam no crescimento bacteriano (GROSSART; SIMON, 2007). Além disso, as bactérias podem contribuir com o crescimento das microalgas através da

remineralização de nutrientes (JIANG et al., 2007). Segundo Goecke et al. (2010) as bactérias influenciam o comportamento das algas de diversas maneiras incluindo a morfogênese, formação de colônias e a germinação de esporos. No entanto, a relação é complexa e embora muitas interações sejam favoráveis, há também as desfavoráveis, em que as bactérias inibem o crescimento das microalgas com a produção de metabólitos extracelulares, enzimas e antibióticos (BRUCKNER et al., 2008; FUKAMI; NISHIJIMA; ISHIDA, 1997; SHI et al., 2009) ou mesmo pela competição por nutrientes do meio em que coexistem (DANGER et al., 2007). Desta forma, as bactérias podem controlar a dinâmica das populações algais e, da mesma maneira o fitoplâncton pode influenciar a dinâmica da comunidade bacteriana (FUKAMI; NISHIJIMA; ISHIDA, 1997). Nas pesquisas de Wang et al. (2012) uma cepa isolada de uma comunidade bacteriana demonstrou capacidade em agregar *Nannochloropsis oceanica* e outras microalgas. Abed, (2010) e Abed e Köster, (2005) observaram que a habilidade de *Oscillatoria sp.* e espécies de cianobactérias em degradar hidrocarbonetos não era exclusividade própria, mas ocorria devido à associação de bactérias aeróbicas.

Sobre a relação microalga-bactéria-metal, sabe-se que biofilmes bacterianos podem interferir na toxicidade dos metais às microalgas através de efeitos protetores gerados pelas substâncias poliméricas extracelulares (LEVY et al., 2009). Koukal et al., (2007) mostrou que a relação entre bactérias e microalgas é complexa e inclui a proteção do estresse causado por metais através da produção de polímeros extracelulares e ligação ou transformação de metais através da produção de exsudatos. No entanto, ainda são raras as informações relacionadas à interferência de bactérias na composição bioquímica e atividades fotossintéticas de microalgas expostas a metais.

Desta forma, como as microalgas fazem parte dos principais produtores primários em ecossistemas aquáticos, estudos sobre bactérias associadas a culturas unialgais em exposição ao metal podem elucidar o papel desses micróbios na produção de biomassa algal e mostrar como interferem na toxicidade do metal, já que são raras estas informações na literatura. Mesmo em testes ecotoxicológicos, que são feitos sob condições controladas de laboratório e nos quais os cultivos raramente são axênicos, a presença de bactérias pode ser agente de interferência e diferentes interpretações podem ser obtidas na presença e ausência de bactérias. Nesta pesquisa, abordamos sob o aspecto fisiológico da microalga, os efeitos de uma comunidade bacteriana sobre *Desmodesmus spinosus* exposta ao cobre. Nossos resultados são uma contribuição ao entendimento de processos que interferem na resposta de microalgas ao cobre em situação similar ao ambiente.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos dos íons de cobre sobre a fisiologia e bioquímica de *Desmodesmus spinosus* na presença e ausência de uma comunidade bacteriana.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes concentrações de cobre sobre o crescimento e fisiologia de *Desmodesmus spinosus* previamente aclimatada ao metal.
- Analisar as respostas fisiológicas de *Desmodesmus spinosus* ao cobre, em cultivos axênicos e não-axênicos, avaliando-se, na microalga, proteínas totais, carboidratos totais e a eficiência fotossintética.

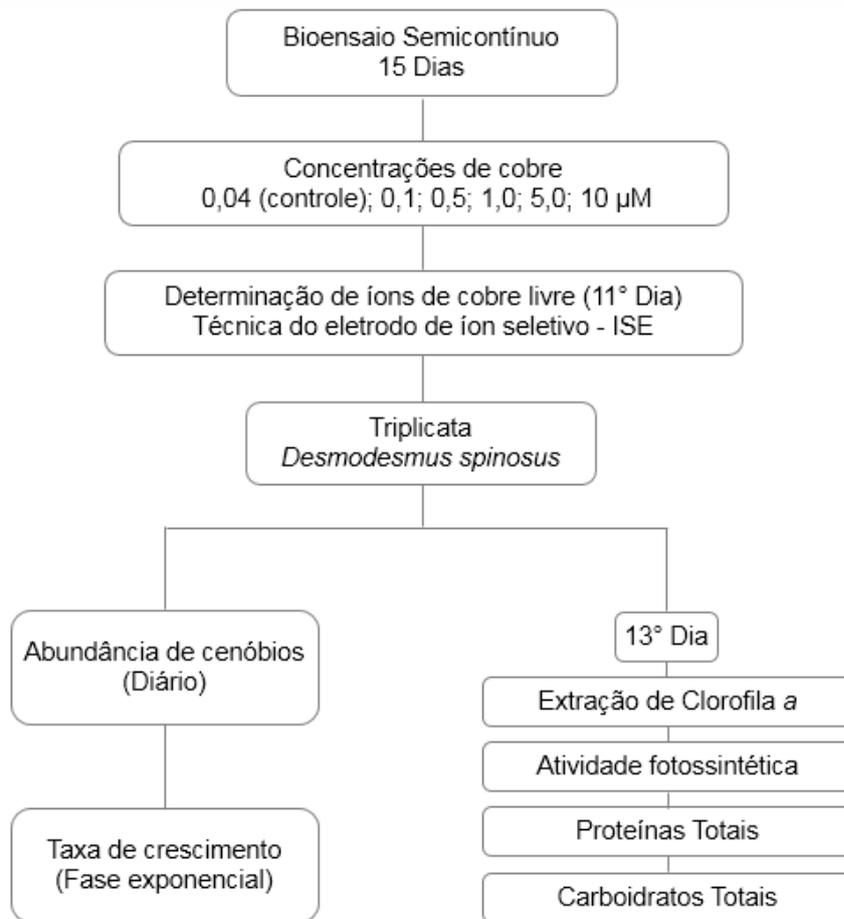
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi dividida em duas etapas ou partes experimentais, sendo que a primeira deu suporte e definiu as condições da segunda etapa. A primeira etapa consistiu em testar diferentes concentrações de cobre com intuito em avaliar parâmetros de crescimento, bioquímica e eficiência fotossintética da microalga e definir a concentração de cobre a ser usada na etapa dois. Nessa, avaliamos o efeito de uma comunidade bacteriana na toxicidade do metal para a microalga, considerando os efeitos no crescimento, bioquímica e eficiência fotossintética da microalga.

#### 3.1 Condições de cultivo

A microalga Chlorophyta de água doce *Desmodesmus spinosus* Chodat (basinômio *Scenedesmus spinosus*), família Scenedesmaceae, com distribuição cosmopolita (ROSINI, 2013) foi a espécie usada nesta pesquisa. A cepa (CCMA-UFSCar 62) foi obtida em cultivo axênico da Coleção de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar). Condições controladas de luz ( $190 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura ( $24 + 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e fotoper\u00edodo (12 h claro: 12 h escuro) foram usadas para os cultivos, realizados em meio W.C. (GUILLARD e LORENZEN, 1972). Aos cultivos foi acrescentado o tamp\u00e3o HEPES (BioPerformance certified, >99,5%, Sigma – Aldrich Brasil Ltda) em concentra\u00e7\u00e3o final de  $10^{-3} \text{ M}$ , que manteve o pH dos cultivos pr\u00f3ximo de 7,0 independente da concentra\u00e7\u00e3o de metal testada. De acordo com Ferreira et al. (2015) este tamp\u00e3o possui baixa capacidade de complexa\u00e7\u00e3o com metais e por isso torna-se adequado

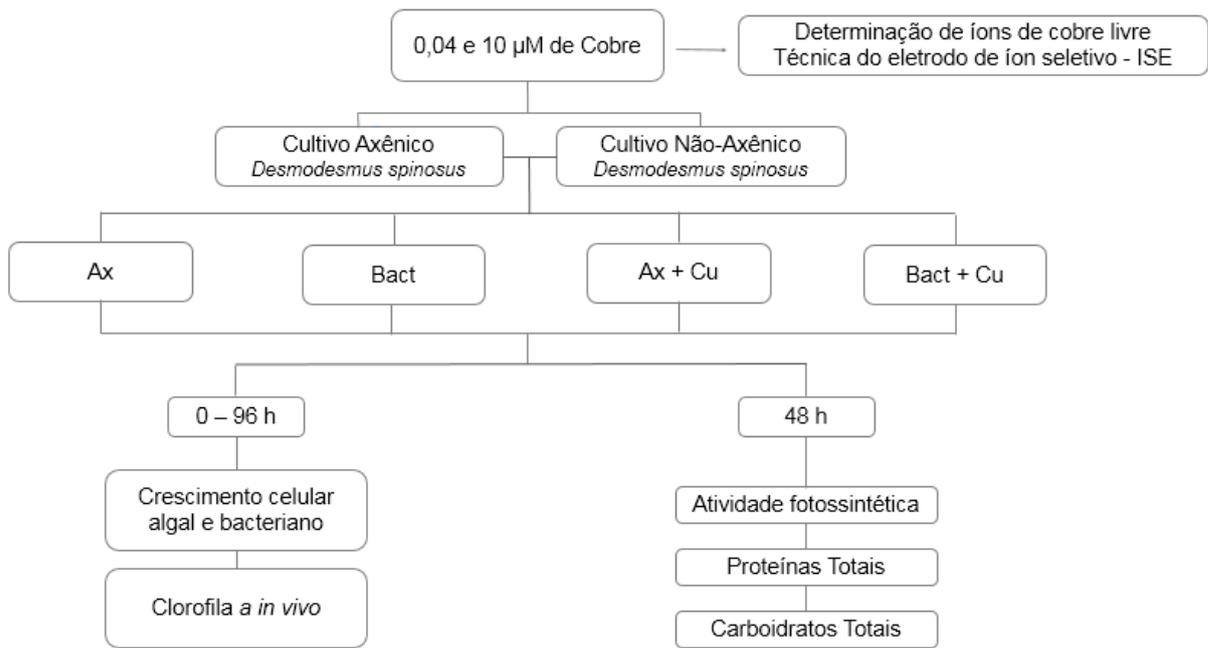
para estudos envolvendo elementos metálicos não exercendo efeitos adversos para as microalgas na concentração usada (KNAUER; BEHRA; SIGG, 1997). A seguir apresenta-se um fluxograma para cada uma das etapas experimentais (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Desenho experimental da Etapa 1 de exposição de *Desmodesmus spinosus* ao cobre em cultivos axênicos.

Para os tratamentos de exposição ao cobre da etapa 1 foram usadas concentrações nominais de 0,04 (controle), 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 µM a partir de um padrão de cobre para espectroscopia de absorção atômica (AAS, SIGMA-ALDRICH). Para cada concentração do metal a microalga foi aclimatada por 10 dias e, neste período, a cada 48 h uma alíquota de cultura era removida e inoculada em

meio fresco e estéril com a respectiva concentração de cobre, procurando manter-se a abundância celular próximo a  $5 \times 10^4$  cenóbios  $\text{mL}^{-1}$  e as células sempre em fase exponencial de crescimento. Este procedimento, que caracteriza cultivos semicontínuos, teve por objetivo garantir que as respostas fisiológicas retratassem, de fato, aquela em exposição às concentrações de cobre testadas. A contagem de cenóbios foi feita diariamente utilizando-se um citômetro de fluxo (Muse Cell Analyser, Merck Millipore®, USA). Monitorou-se também o pH (pHâmetro Hanna instruments, HI 8424, USA). No 11º dia, e após 10 dias de aclimação ao cobre, a microalga foi inoculada em 3 réplicas experimentais nas suas respectivas concentrações e cultivadas por mais 5 dias, expondo a fase exponencial e estacionária de crescimento. As taxas de crescimento específicas foram calculadas com base na abundância de cenóbios considerando-se os valores do 11º ao 13º dias experimentais. No 13º dia experimental, foram retiradas amostras para a realização de curvas rápidas de saturação luminosa de acordo com o procedimento descrito em Camargo e Lombardi (2017), determinação da concentração de clorofila *a* (SHOAF; LIUM, 1976), da concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e de carboidratos totais (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013) na biomassa algal.



**Figura 2.** Fluxograma ilustrando o desenho experimental da Etapa 2 com *Desmodesmus spinosus* exposta ao cobre, na concentração nominal de 10  $\mu\text{M}$  na presença e ausência de bactérias. Símbolos: Ax: cultivo axênico; Bact: cultivo contaminado com bactérias; Ax+Cu: cultivo axênico acrescido de 10  $\mu\text{M}$  cobre; Bact+Cu: cultivo contaminado com bactérias e acrescido de 10  $\mu\text{M}$  cobre.

O bioensaio da etapa 2 foi realizado utilizando a concentração de cobre adicionado de 10  $\mu\text{M}$  (equivalente à 3,5  $\mu\text{M}$  de cobre livre), definido durante a etapa 1. Previamente ao início do experimento da etapa 2 foi realizada a contaminação do cultivo axênico de *Desmodesmus spinosus* com uma comunidade bacteriana.

Com o objetivo de coletar uma alta diversidade de bactérias para a contaminação do cultivo axênico de *Desmodesmus spinosus*, inicialmente uma coleta de dois litros de água foi realizada no Lago Monjolinho localizado na Universidade Federal de São Carlos. Após a coleta, zooplâncton, protozoários e microalgas foram removidos através de filtração em filtros de fibra de vidro com porosidade de 0,6  $\mu\text{m}$  (GF-6 Macherey-Nagel). Uma alíquota de 500 ml do filtrado de bactérias foi adicionado a 9,5 L de meio W.C. juntamente com inóculo de  $5 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$  da microalga axênica. A cultura foi mantida aberta e borbulhando por 96 horas

e, diariamente, era exposta na área externa do laboratório entre 10 e 12 h a.m. para contaminação com outras bactérias ali presentes. Após o primeiro inóculo, a cada 96 horas o cultivo era repicado para um novo meio com metade do volume anterior até alcançar 250 mL (10 L → 5 L → 2,5 L → 500 mL → 250 mL). Logo, a cultura foi mantida com 250 mL e sem borbulhamento até o início da segunda etapa da pesquisa.

O bioensaio da etapa 2 teve duração de 5 dias (96 horas) e foi realizado com 4 tratamentos diferentes em triplicatas. O tratamento (I) consistia de cultivo axênico (Ax), (II) cultivo não-axênico (Bact), (III) cultivo axênico com adição extra de cobre (Ax+Cu) e (IV) cultivo não-axênico com adição extra de cobre (Bact+Cu). Para confirmar a quantidade de cobre selecionada da etapa anterior foi feita a determinação de cobre livre (Técnica do eletrodo de íon seletivo – ISE-Cu) (LOMBARDI et al., 2007) para os tratamentos com e sem adição extra de cobre. Foi monitorado diariamente o crescimento celular da microalga utilizando-se um microscópio (Nikon Eclipse modelo 22 E200, Japan), a clorofila *a in vivo* (Turner Designs, Trilogy, USA), e também as medidas de pH (pHâmetro Hanna instruments, HI 8424, USA).

O crescimento bacteriano também foi obtido diariamente para os tratamentos não-axênicos. A contagem das células bacterianas foi feita em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). As células foram coradas com SYTO-13 (Molecular Probes) por 10 minutos no escuro a uma concentração final de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e adicionadas de esferas de látex fluorescentes de 2  $\mu\text{m}$  como padrão interno. Os citogramas foram analisados no software FlowJo v7.6, e as bactérias enumeradas utilizando o gráfico de dispersão lateral (SSC) por fluorescência verde (FL1) como descrito em Sarmiento et al., (2008).

Em 48 horas de cultivo, foram retiradas amostras para a realização de curvas rápidas de saturação luminosa de acordo com o procedimento descrito em Camargo e Lombardi, (2017), concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e carboidratos totais (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013) da biomassa algal.

Em 96 h de experimento os efeitos do cobre e das bactérias em de *D. spinosus* foram avaliados pela quantificação do número de células por cenóbios em cada tratamento experimental. Os indivíduos foram classificados em 4 categorias: células livres (unicelular), cenóbios de 2 células, cenóbios de 4 células e cenóbios de 8 células. Imagens dos cultivos mostrando os cenóbios formados também foram obtidas no último dia experimental pelo programa NIS-Elements F4.00.00.

A axenicidade dos cultivos foi conferida no último dia de experimento por meio de teste utilizando peptona e glicose (250 mg L<sup>-1</sup> de cada) (ANDERSEN, 2005) onde a cultura algal é inoculada e encubada. Para a realização deste teste foram distribuídos 10 mL do meio de cultivo com peptona e glicose em tubos de ensaio que receberam uma gota da cultura algal de cada amostra, os tubos foram vedados e encubados nas mesmas condições em que ocorreram os experimentos. Após 24 h verificou-se visualmente a ausência (meio translúcido) ou presença (meio leitoso) de bactérias no meio de cultivo.

### 3.2 Taxas de crescimento e cálculo da EC<sub>50</sub>

As taxas de crescimento específicas para a microalga foram calculadas com base na abundância de células, considerando-se a fase exponencial de

crescimento. Para tanto foi representado graficamente o logaritmo natural da abundância de cenóbios em função do tempo experimental, cuja curva foi ajustada por regressão linear. Na fase exponencial, a reta obtida foi ajustada por regressão linear e o coeficiente angular resultante representa a taxa de crescimento específica.

A taxa de crescimento populacional das bactérias foi realizada conforme descrito em Andersen (2005) de acordo com a equação (1).

$$(1) \quad r = [\text{Ln} (N_2) - \text{Ln} (N_1)] / \text{Dt}$$

Onde,  $N_1$  é o tamanho da população no início de um intervalo de tempo,  $N_2$  é o tamanho da população no final do intervalo de tempo,  $r$  é a taxa intrínseca de crescimento e  $\text{Dt}$  é a variação do tempo. Em ambos os tratamentos com bactérias, utilizou-se  $N_1$  do início dos cultivos (dia 0) e  $N_2$  ao final do crescimento exponencial.

A concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  que ocasionou redução de 50% da população microalgal em comparação ao controle foi obtida a partir do cálculo da  $\text{EC}_{50}$ . Para tanto plotou-se abundância de cenóbios ( $Y$ ) em função do log da concentração de cobre livre ( $X$ ). A porção linear do decaimento da abundância de cenóbios foi ajustada por regressão linear ( $Y = ax + b$ ) e o valor de  $\text{EC}_{50}$  obtido de acordo com a equação 2.

$$(2) \quad \text{EC}_{50} = \frac{(0,5 Y - b)}{a}$$

### 3.3 Determinação de cobre livre

A concentração inicial de cobre livre no meio de cultura foi determinada nas duas etapas da pesquisa. Para tanto, o meio de cultura foi preparado com 24 h de antecedência à inoculação da microalga, garantindo equilíbrio químico do metal no meio. Antes de inocular as células, uma alíquota de 50 mL foi retirada do meio de cultivo e procedida a quantificação dos íons de  $\text{Cu}^{2+}$  por potenciometria, usando-se um eletrodo seletivo ao íon cobre (ISE-Cu). Para essa determinação seguimos o procedimento descrito em Lombardi et al. (2007). A força iônica das amostras foi ajustada para  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  com  $\text{NaNO}_3$  ultrapuro (Sigma-Aldrich, Alemanha) e o  $\text{Cu}^{2+}$  foi determinado utilizando-se um potenciômetro (Thermo Fisher Scientific, Orion Star A214, Singapura) com eletrodo seletivo de cobre (Thermo Fisher Scientific, Orion 9429BN, Estados Unidos) e eletrodo de referência de dupla junção (Thermo Fisher Scientific, Orion 900200, Estados Unidos). No dia da determinação realizou-se uma curva de calibração feita a partir de diluição serial do padrão comercial monoelementar de cobre para AAS/ICP adquirido em concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (SpecSol<sup>®</sup>, Brasil). A curva de calibração teve amplitude de concentração de  $4 \times 10^{-7}$  à  $6,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . A curva de calibração foi complementada com um tampão metálico para aumentar o limite de detecção do  $\text{Cu}^{2+}$  para aproximadamente  $6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$  (LOMBARDI et al., 2007).

### 3.4 Carboidratos e proteínas intracelulares totais

Para as análises de biomoléculas as amostras para a quantificação de carboidratos intracelulares totais foram realizadas segundo método colorimétrico

com ácido sulfúrico descrito por Albalasmeh; Berhe; Ghezzehei (2013) e, para a extração de proteínas intracelulares totais seguimos o protocolo de Bradford (1976) que utiliza albumina sérica bovina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) como referência para uma curva-padrão. Para carboidratos e proteínas, uma alíquota de 20 e 50 mL, respectivamente, foram retiradas de cada réplica e centrifugadas (15 min;  $2168 \text{ xg}$  à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), os pellets de biomassa foram mantidos congelados até a análise final com respectivos 1 e 0,5 mL de sobrenadante. É importante ressaltar que na etapa 2 as amostras de todos os tratamentos não-axênicos foram lavadas com meio de cultivo estéril e centrifugadas duas vezes para a remoção da comunidade bacteriana antes das análises.

### 3.5 Análises fotossintéticas

Os parâmetros fotossintéticos foram obtidos utilizando-se um fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz GmbH, Germany), que forneceu o rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ), o rendimento operacional ( $\Phi'_M$ ) e decaimentos fotossintéticos (qP e NPQ), bem como a obtenção da curva de saturação de luz. Para o  $\Phi_M$  as células foram adaptadas ao escuro por 20 minutos. Em seguida, na presença de luz actínica, foi obtido o  $\Phi'_M$ , os decaimentos fotossintéticos e as curvas de saturação luminosa.

A curva de saturação de luz traz informações importantes a taxa de transporte de elétrons entre o fotossistema II e fotossistema I (ETR), a irradiância de saturação de luminosidade ( $E_k$ ), e o alfa ( $\alpha$ ), que representa a inclinação inicial da

curva e diz respeito ao aproveitamento da luz incidente (CAMARGO; LOMBARDI, 2017).

A adaptação das amostras ao escuro torna os centros de reação oxidados, “abertos” (KRAUSE; WEIS, 1991), aptos a receber elétrons oriundos da quebra da molécula de água. Após cálculos realizados no próprio PhytoPAM, valores estimados de acordo com a equação 2 são fornecidos. Assim, obtem-se os valores de fluorescência inicial,  $F_0$ , fluorescência máxima,  $F_m$ , fluorescência variável,  $F_v$ , e o rendimento quântico máximo do fotossistema II - PSII ( $F_v/F_m$ ),  $F'_0$  é calculado por equação apresentada em Oxborough; Baker (1997).

$$(2) \quad F'_0 = F_0 / ((F_v/F_m) + (F_0/F_m'))$$

Com todos esses parâmetros é possível estimar os valores das dissipações (Fotoquímico –  $q_P$ , (SCHREIBER; SCHLIWA; BILGER, 1986) e não-fotoquímico – NPQ, (BILGER; BJÖRKMAN, 1990). A dissipação fotoquímica  $q_P$  representa a quantidade de energia de ativação capturada pelos centros de reação enquanto que a dissipação não-fotoquímica - NPQ é o mecanismo de dissipação de calor que age na defesa contra danos oxidativos e excesso de luz (FRANCO et al., 2012). As equações para estimativas das dissipações estão representadas a seguir.

$$(3) \quad q_P = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$$

$$(4) \quad NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

A curva de saturação de luz também traz informações importantes sobre o desempenho do processo fotossintético. Com ela é possível obter a ETR relativa (Equação 5), taxa de transporte de elétrons entre o fotossistema II e fotossistema I. Com as curvas de saturação luminosa obtivemos também os valores de irradiância de saturação de luminosidade ( $E_k$ ) para *D. spinosus*, e o valor  $\alpha$  (alfa) que representa a inclinação inicial da curva.

$$(5) \quad ETR = \phi'_m \times PAR$$

### 3.6 Análise estatística

Os resultados foram testados para normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e analisados usando ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança para detectar diferenças significativas entre os tratamentos utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2014) e Minitab 17.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CAPÍTULO 1: Efeitos do cobre no metabolismo da microalga

*Desmodesmus spinosus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae)

#### 4.1.1 RESULTADOS

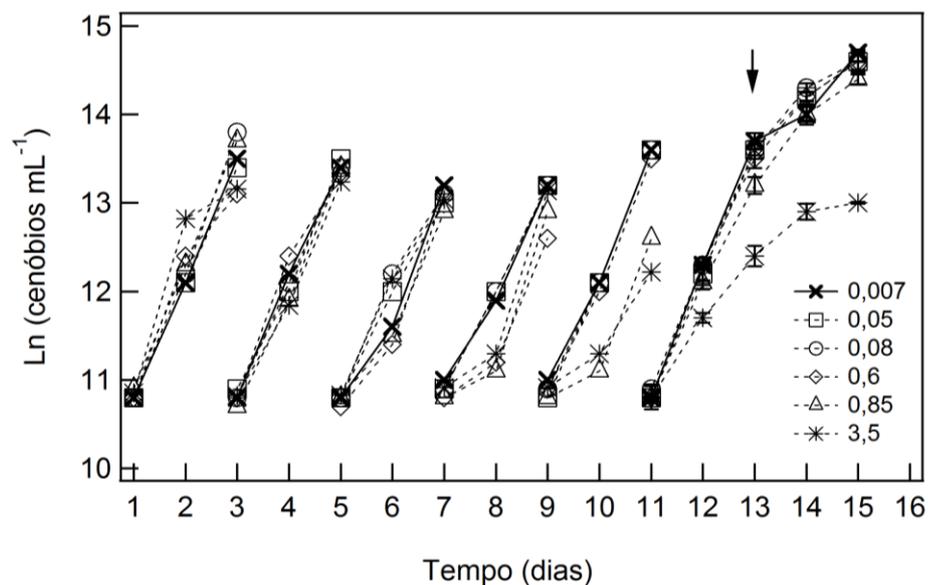
Em ordem crescente de concentração, os valores de  $\text{Cu}^{2+}$  livre determinados ao início dos cultivos são apresentados na Tabela 1 e corresponderam a cerca de 5 a 2x menos cobre em comparação à quantidade adicionada (concentração nominal).

**Tabela 1:** Íons de cobre livre determinado e concentração inicial de cobre total adicionado.

Tratamentos	[Cu] adicionado ( $\mu\text{M}$ )	[Cu] determinado ( $\mu\text{M}$ )
Controle	0,04	0,007
T1	0,1	0,05
T2	0,5	0,08
T3	1,0	0,60
T4	5,0	0,85
T5	10,0	3,53

Na figura 3 é possível observar o crescimento da microalga *D. spinosus* durante a aclimatação em sistema semicontínuo, sempre mantida em fase exponencial de crescimento. O crescimento mostrado do 11° ao 15° dia de exposição ao cobre inclui também o início de fase estacionária. Mediante aos resultados obtidos, podemos observar o potencial adaptativo da microalga, que com

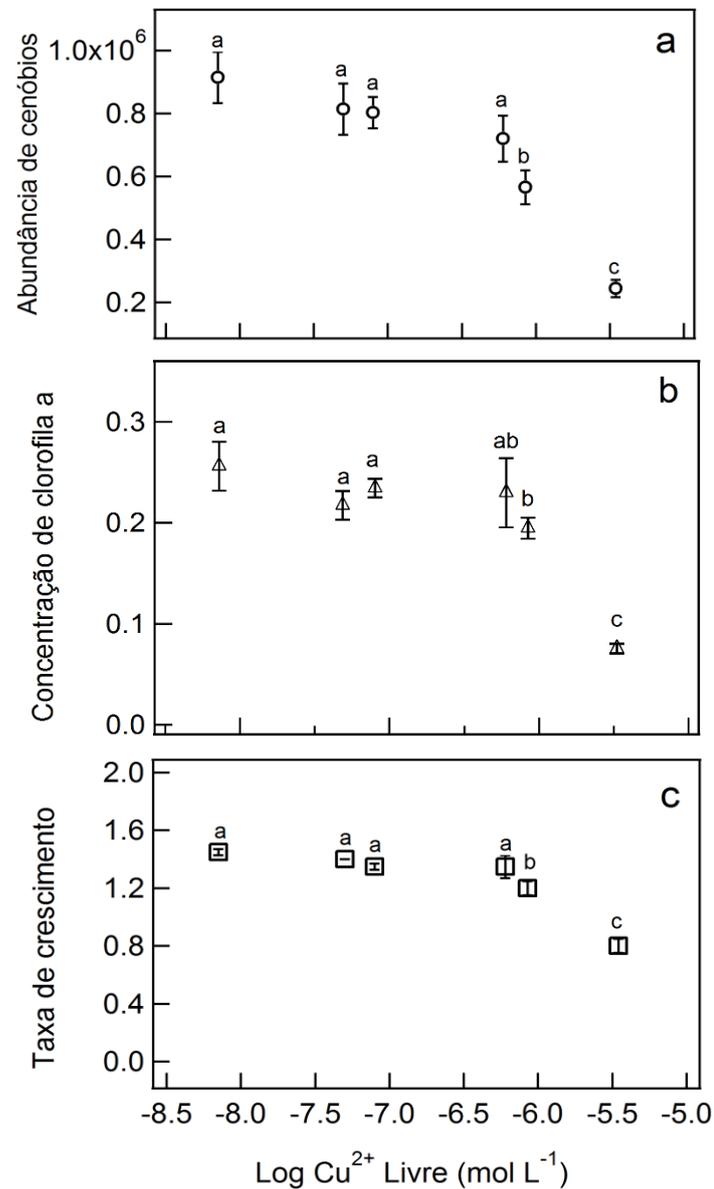
o passar do tempo de exposição ao metal, retoma o crescimento para a concentração intermediária do cobre. Esta situação pode ser observada a partir do quinto dia experimental e refere-se à concentração de  $0,6 \mu\text{M Cu}^{2+}$ . A curva de crescimento (11<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dias) mostra que após 48 horas do início do inóculo há uma desaceleração do crescimento de *D. spinosus* evidenciando o fim da fase exponencial de crescimento.



**Figura 3.** Aclimação e curva de crescimento de *D. spinosus* durante exposição ao cobre livre. Os símbolos representam as diferentes concentrações do metal, em  $\mu\text{M}$ , sendo que 0,007 equivale ao controle. Apresentamos o logaritmo natural da abundância de cenóbios ( $\text{cenóbios mL}^{-1}$ ) em função do tempo experimental (dias). A seta indica momento de amostragem na fase exponencial de crescimento (48 h após inóculo do 11<sup>o</sup> dia). Barras de erros representam o desvio-padrão ( $n=3$ ).

Os resultados obtidos quanto ao crescimento populacional (abundância de cenóbios e concentração de clorofila *a*, assim como as taxas de crescimento para todas as concentrações de cobre são mostrados na figura 4. Observa-se o estresse causado pelo cobre a partir de  $0,85 \mu\text{M Cu}^{2+}$  onde há redução nos parâmetros do crescimento populacional e, na figura 4c, foram calculados reduções de 17% na taxa

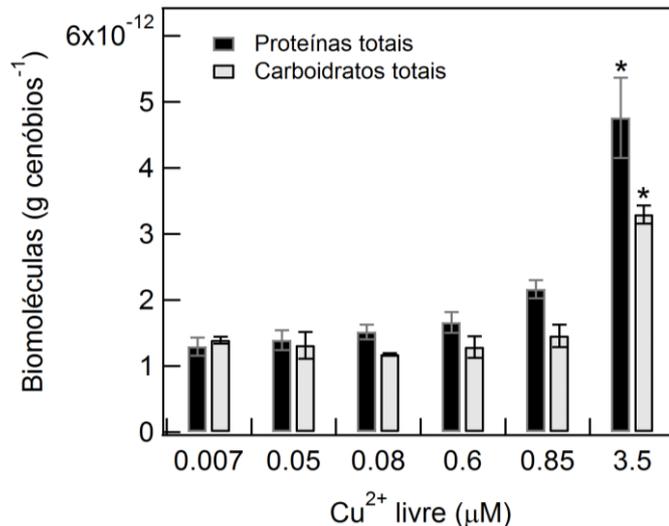
de crescimento em  $0,85 \mu\text{M Cu}^{2+}$  e de 45% em  $3,5 \mu\text{M Cu}^{2+}$  em comparação ao tratamento controle.



**Figura 4.** Parâmetros do crescimento populacional nas culturas de *D. spinosus* no 13º dia em função do Log da concentração de cobre livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ): (a) Abundância de cenóbios ( $\text{cenóbios mL}^{-1}$ ), (b) Concentração da clorofila a ( $\text{pg cél}^{-1}$ ) e a (c) taxa de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) calculada a partir dos dados de abundância populacional. Barras de erro indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ).

Os resultados da quantificação das biomoléculas, carboidratos e proteínas, são mostrados na figura 5. Nota-se que a microalga se mostrou resistente

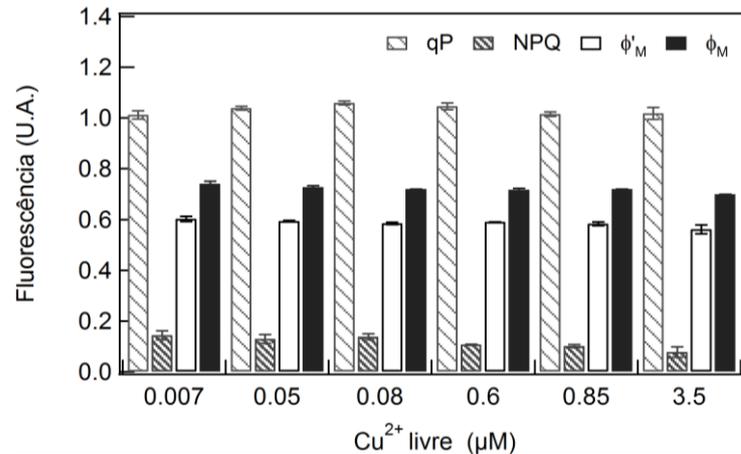
ao cobre até a concentração de  $0,85 \mu\text{M Cu}^{2+}$ . A síntese de biomoléculas em *D. spinosus* foi afetada na maior concentração de cobre testada ( $p < 0,05$ ). Tanto proteínas como carboidratos por cenóbio aumentaram na maior concentração de cobre,  $3,5 \mu\text{M Cu}^{2+}$ .



**Figura 5.** Carboidratos totais e proteínas totais em função das concentrações de cobre ( $\mu\text{M}$ ) para os tratamentos no 13º dia exposição ao metal. Barras de erro indicam o desvio-padrão ( $n = 3$ ) e asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

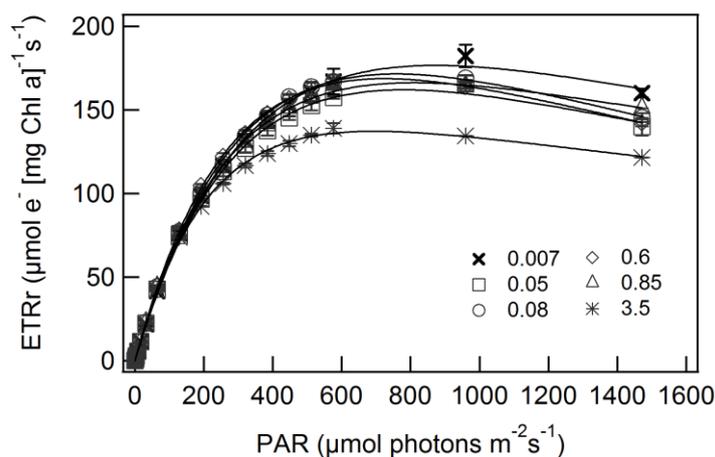
Os dados relacionados às atividades fotossintéticas são demonstrados na figura 6. O acompanhamento de  $\Phi_m$  (Rendimento quântico máximo) e  $\Phi'_m$  (Rendimento quântico operacional), apesar de baixas taxas de crescimento em  $0,6$  e  $0,85 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , indicam que a microalga estava com condições fisiológicas saudáveis e não apresentaram diferenças entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

O decaimento fotoquímico (qP) de  $\sim 1.0$  e baixo decaimento não-fotoquímico (NPQ), indicam que a alga não se encontrava sob estresse fotossintético. O qP e NPQ se mantiveram igual para todas as concentrações ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6.** Rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e efetivo ( $\Phi'_M$ ) e decaimentos de fluorescência (qP, NPQ) nos cultivos de *D. spinosus* mantidos nas várias concentrações de cobre livre ( $\mu\text{M}$ ) no 13º dia de exposição. Valores de fluorescência reportados em unidades arbitrárias (U.A.). Barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

As curvas de saturação luminosa (Figura 7; parâmetros na Tabela 2) obtida para todos os tratamentos, por sua vez, mostram que não houve qualquer efeito no coeficiente máximo de aproveitamento da luz ( $\alpha$ ), mas sim na taxa de transporte de elétrons relativa máxima (ETR<sub>m</sub>) e na intensidade luminosa de saturação ( $E_k$ ) onde houve redução, confirmando o estresse sofrido em 3,5  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>.



**Figura 7.** Curvas rápidas de saturação luminosa reportada como taxa de transporte de elétrons (ETR<sub>relativa</sub>) em função da intensidade luminosa ( $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) para os tratamentos no 13º experimental. Cada símbolo representa uma concentração de cobre livre ( $\mu\text{M}$ ). Barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

**Tabela 2: Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas de saturação de luz no 13º dia de exposição ao cobre.** Valores médios de ETRrelativa máxima (ETR<sub>m</sub>), inclinação inicial da curva ( $\alpha$ ) e intensidade luminosa de saturação (E<sub>k</sub>). Desvio padrão entre parênteses (n=3). Letras indicam diferenças estatísticas (p<0,05).

<b>Tratamentos</b>	<b>ETR<sub>m</sub></b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>E<sub>k</sub></b>
<b>0.007</b>	175.6 (11.4) <sup>a</sup>	0.71 (0.02) <sup>a</sup>	245 (20.5) <sup>a</sup>
<b>0.05</b>	170.2 (15.7) <sup>ab</sup>	0.70 (0.03) <sup>a</sup>	240 (12.6) <sup>a</sup>
<b>0.08</b>	166.6 (8.5) <sup>ab</sup>	0.74 (0.02) <sup>a</sup>	223 (16.8) <sup>ab</sup>
<b>0.6</b>	166.0 (5.1) <sup>ab</sup>	0.75 (0.02) <sup>a</sup>	221 (5.5) <sup>ab</sup>
<b>0.85</b>	165.6 (11.5) <sup>ab</sup>	0.77 (0.05) <sup>a</sup>	215 (16.5) <sup>ab</sup>
<b>3.5</b>	142.6 (9.4) <sup>b</sup>	0.75 (0.02) <sup>a</sup>	190 (8.6) <sup>b</sup>

#### 4.1.2 DISCUSSÃO

A determinação de cobre livre mostrou que até a concentração de 0,08  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  a maioria do cobre adicionado foi complexada pelos ligantes presentes no meio W.C., mas acima dessa concentração, os sítios de ligação, então já preenchidos pelo metal, não aceitavam mais o elemento e a concentração de cobre livre no meio de cultura atingiu o seu valor máximo (3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ). Sabemos que o EDTA presente no meio de cultivo W.C. é um importante agente quelante de metais (AVDEEF; ZABRONSKY; STUTING, 1983) e provavelmente foi o responsável pela complexação do cobre. Como consequência, foi obtida a diminuição da concentração do  $\text{Cu}^{2+}$  em comparação ao cobre nominal. O EDTA é um ligante não específico e, portanto, em meio de cultura liga-se não somente ao ferro, o principal propósito pelo qual é usado, mas também a outros microelementos (AVDEEF; ZABRONSKY; STUTING, 1983; LOMBARDI et al., 2007; TONIETTO et al., 2016).

Poucas são as pesquisas com *Desmodesmus spinosus* (ROSINI, 2013b; RUGNINI et al., 2017, 2018) e, nada foi encontrado como, teor de carboidratos e proteínas e, as atividades fotossintéticas desta microalga. Na presente pesquisa foi detectado sutis respostas fisiológicas e bioquímicas da microalga sob exposição a crescentes concentrações de cobre. Uma vez que o teor de biomoléculas e a fotossíntese quando modificados poderá causar um desequilíbrio no ecossistema. A figura 3 mostra o crescimento de *D. spinosus* nas várias concentrações de cobre incluindo o período de aclimação celular ao metal. Apresentando variação na taxa de crescimento nas concentrações de  $0,60 \mu\text{M Cu}^{2+}$  (taxa crescimento =  $1,35 \pm 0,0866$ ) e  $0,85 \mu\text{M Cu}^{2+}$  (taxa crescimento =  $1,20 \pm 0,0577$ ), sugerimos que possa ter havido uma adaptação da microalga ao metal. Este resultado está de acordo com Takamura et al. (1989), que discutem o potencial adaptativo de microalgas clorofíceas e concluem que elas possuem alta capacidade de adquirir tolerância ao cobre após exposição prolongada. O valor de  $EC_{50}$  de  $1,2 \mu\text{M Cu}^{2+}$  indica que em  $3,5 \mu\text{M Cu}^{2+}$  não haveria recuperação desta população, de fato como obtido nesta pesquisa. Levy et al., (2009) demonstraram para *Chlorella sp.*  $EC_{50} = 4,6 \mu\text{M}$  de cobre dissolvido em cultivo axênico e, para *Pseudokirchneriella subcapitata*, a concentração de  $8 \times 10^{-6} \mu\text{M}$  de Cu dissolvido. Comparada a *P. subcapitata*, uma microalga usada em testes padrões de ecotoxicidade, *D. spinosus* mostrou-se tolerante ao cobre, podendo ser indicada às pesquisas de biorremediação de ambientes contaminados com o metal.

Para os resultados obtidos quanto ao crescimento populacional (abundância de cenóbios e concentração de clorofila a), assim como as taxas de crescimento para todas as concentrações de cobre mostrados na figura 4, observamos que a partir de  $0,85 \mu\text{M Cu}^{2+}$  há redução nos parâmetros do

crescimento populacional e, em 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  a microalga poderia enfrentar problemas relacionados à captação de luz e realização da fotossíntese, o que pode estar relacionado à redução da clorofila *a*. Sabe-se que as clorofilas são pigmentos primários captadores da luz no processo fotossintético (MIAZEK et al., 2015) e é a partir dela que elétrons oriundos da água são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (STREIT et al., 2005). Na figura 4c observamos reduções de 17% na taxa de crescimento em 0,85  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  e de 45% em 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , que estão de acordo com a literatura. Fawaz et al., (2018) realizaram bioensaios com cobre para encontrar a dosagem que inibiria a proliferação de algas em canais de irrigação e mostraram que acima de 3  $\mu\text{M}$  de cobre total houve redução na taxa de crescimento para as três espécies testadas: *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus* e *Oscillatoria agardhii*. Lombardi e Maldonado (2011) investigaram os efeitos do cobre na taxa de crescimento e atividade fotossintética em *Phaeocystis cordata* em sistema semicontínuo. Os autores usaram amplitude de concentração de cobre de 0,002 a 80  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  e, similar ao nosso resultado, mostraram redução na taxa de crescimento da alga à medida em que aumentou-se a concentração do metal. Echeveste et al., (2017) apontam que em clorofíceas há competição dos íons cobre por sítios de ligação de outros nutrientes essenciais à alga e isto prejudica o seu desenvolvimento celular ocasionando queda nas taxas de crescimento. Juneau e Harrison (2005) também obtiveram redução da taxa de crescimento em microalgas expostas ao cobre.

A síntese de biomoléculas em *D. spinosus* foi afetada somente na maior concentração de cobre testada ( $p < 0,05$ ). Tanto proteínas como carboidratos por cenóbio aumentaram na maior concentração de cobre, 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Sabe-se que,

dependendo da concentração de exposição os metais-traço, estes podem alterar a quantidade e qualidade de proteínas (CHIA et al., 2017) e carboidratos (PISTOCCHI et al., 1997) em microalgas. O aumento de biomoléculas em microalgas tem sido relatado como uma estratégia que pode auxiliá-las na sobrevivência quando sofrem estresse por metal ou falta de nutrientes (CHIA et al., 2017). Silva et al. (2018) expos a microalga *Scenedesmus quadricauda* ao cobre e também obteve aumento de carboidratos e proteínas. Os autores atribuíram esse resultado a mecanismos de reparação e proteção das células ao estresse pelo metal. De acordo com Oga, (2008), a capacidade de adaptação bioquímica das microalgas é uma importante propriedade encontrada nesses organismos, sendo responsável pela amplitude de seus limites de resistência às variações do meio, que neste caso, foram variações das concentrações de cobre. Nossos resultados apresentam implicações ecológicas, uma vez que a alteração no teor de biomoléculas em organismos base de cadeias alimentares em ecossistemas aquáticos pode alterar o equilíbrio energético nesses ambientes.

A capacidade fotossintética feita através do rendimento quântico máximo;  $\Phi_M \sim 0.74$  e operacional;  $\Phi'_M \sim 0.60$  (figura 6) não variou nas diferentes concentrações de cobre às quais *D. spinosus* foi exposta, sugerindo que mecanismos de proteção do aparato fotossintético poderiam estar ativados. De acordo com informações da literatura, o rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) diz respeito ao estado fisiológico da microalga (KROMKAMP et al., 2008) e variação neste parâmetro pode estar associada à diminuição do transporte de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I, limitando a reoxidação da plastoquinona A (MALLICK; MOHN, 2003) uma aceptora de elétrons. O decaimento fotoquímico (qP) de  $\sim 1.0$  e baixo decaimento não-fotoquímico (NPQ), indicam que a alga não se

encontrava sob estresse fotossintético, mesmo apresentando taxas de crescimento mais baixas em 0,85 e 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Os resultados de qP confirmam que a energia absorvida pela clorofila *a* foi direcionada para a fotoquímica e pouca variação foi observada no NPQ. De acordo com Lombardi e Maldonado (2011), é graças à manutenção quase constante dos parâmetros ambientais (intensidade luminosa e concentração de nutrientes) no entorno das células algais dada por cultivos semicontínuos, que pequenas diferenças frente ao cobre são detectáveis.

As curvas de saturação luminosa (Figura 7; parâmetros na Tabela 2) mostram que não houve qualquer efeito do cobre no coeficiente máximo de aproveitamento da luz ( $\alpha$ ), mas sim na taxa de transporte de elétrons relativa máxima (ETR<sub>m</sub>) e na intensidade luminosa de saturação ( $E_k$ ). Tanto a ETR<sub>m</sub> como  $E_k$  diminuíram em 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  e esta redução pode ser decorrência de modificações na clorofila *a*, pigmento fotossintético essencial. Segundo Filippis (1978) e Gross et al. (1970), o íon magnésio (Mg) central presente na clorofila *a*, pode ser substituído pelo cobre, comprometendo a fluorescência emitida pela alga. Watanabe et al. (1985) demonstraram que a clorofila *a* composta pelo íon Mg possui maior capacidade de liberação de elétrons do que quando comparada com o pigmento tendo o íon Mg substituído por outro elemento. Assim, a fluorescência da clorofila *a* pode ser uma boa ferramenta para a averiguação do estado fisiológico de microalgas de forma rápida e precisa.

Em geral, apesar de *Desmodesmus spinosus* poder ser considerada tolerante ao cobre, as concentrações de cobre testadas no presente trabalho são 3x menores ao limite estipulado pela resolução CONAMA n°430 e indicaram efeitos negativos do metal após tempos de exposição prolongado. A microalga exposta a 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , apresentou crescimento instável e lento, o que possivelmente pode

levar ao desaparecimento da espécie em locais com a contaminação em concentrações próximas a essa.

#### 4.1.3 CONCLUSÃO

*D. spinosus* apresentou alta resistência ao cobre sendo a taxa de crescimento, clorofila *a*, ETR<sub>m</sub> e E<sub>k</sub> afetadas somente na concentração de 3,5 µM de cobre livre, a maior concentração testada nesta pesquisa.

A concentração das biomoléculas carboidratos e proteínas aumentaram em *D. spinosus* em células expostas à concentração de 3,5 µM Cu<sup>2+</sup>.

A capacidade fotossintética (rendimentos máximo e operacional) permaneceu similar ao controle independente da concentração de cobre.

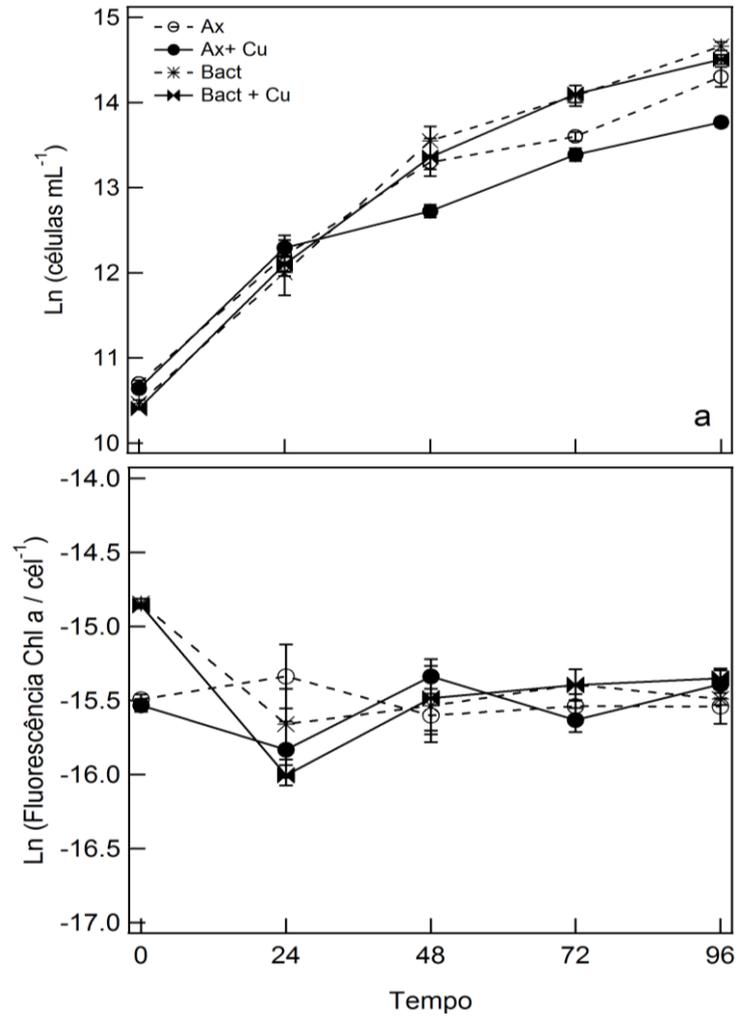
Em geral, os resultados mostraram que *D. spinosus* foi resistente ao metal cobre, suportando concentrações de até 0,6 µM de cobre livre sem a detecção de qualquer efeito fisiológico dentre os abordados nesta pesquisa, tornando-a uma boa candidata à remediação de ambientes contaminados com este metal.

## 4.2 **CAPÍTULO 2:** A influência das bactérias no metabolismo da microalga *Desmodesmus spinosus* ao cobre

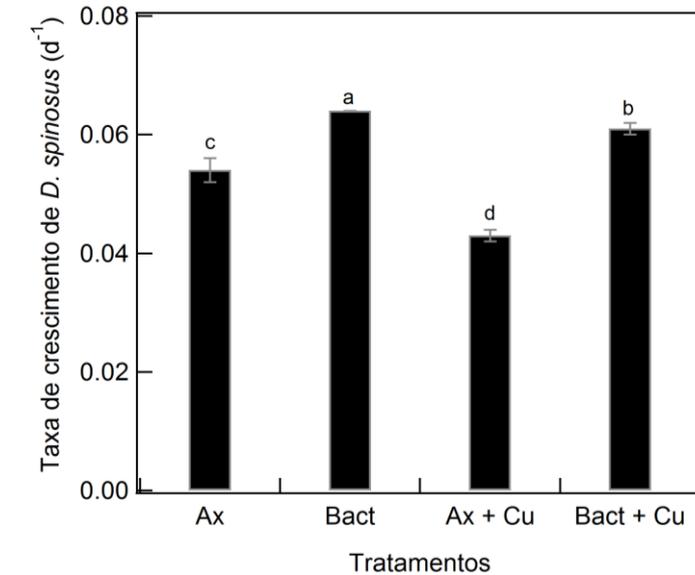
### 4.2.1 RESULTADOS

Os resultados de axenicidade para os cultivos foram negativos para a presença de bactérias nos tratamentos axênicos, o meio permaneceu translúcido após 24 h e somente a microalga cresceu após 48 h. Para os tratamentos não-axênicos, houve o crescimento de bactérias, detectado em 24 h, o que tornou o meio leitoso. A quantificação de cobre livre mostrou que para o tratamento controle foi obtido  $4,9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,004 \text{ } \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) e para o tratamento com adição extra de cobre obteve-se  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $3,0 \text{ } \mu\text{M Cu}^{2+}$ ). O pH do meio manteve-se neutro, entre 6,8 e 7,4, durante todo o experimento.

Após 48 h experimental, o crescimento de *D. spinosus* na presença de bactérias e cobre (Bact+Cu) e sem cobre (Bact) foi maior do que os tratamentos axênicos (Ax e Ax+Cu), para o parâmetro de crescimento celular (Figura 8a), e sem alteração para a fluorescência da clorofila *a* (Figura 8b). A taxa de crescimento (Figura 9) confirma os resultados demonstrando maior crescimento algal quando na presença de bactérias. A menor taxa de crescimento do tratamento axênico com cobre (Ax+Cu) demonstrou a maior sensibilidade da microalga ao metal quando em cultivo axênico, comparada aos demais tratamentos.

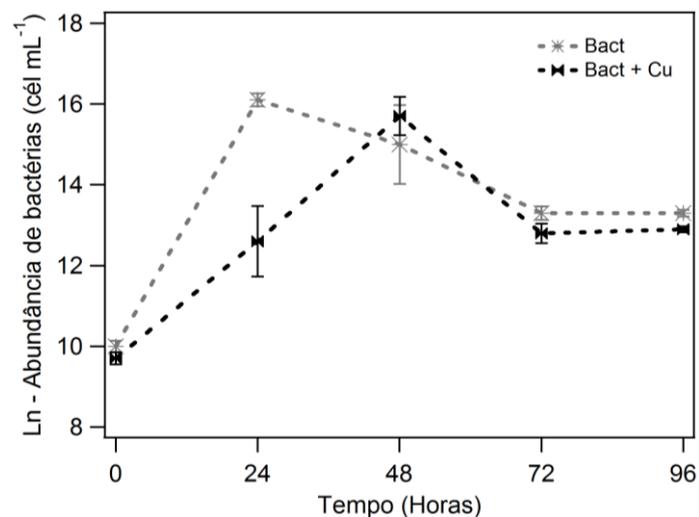


**Figura 8.** Logaritmo natural da abundância de células (a) e fluorescência da clorofila a (b) em função do tempo experimental de 96 horas. Barras de erros indicam o desvio-padrão (n=3).



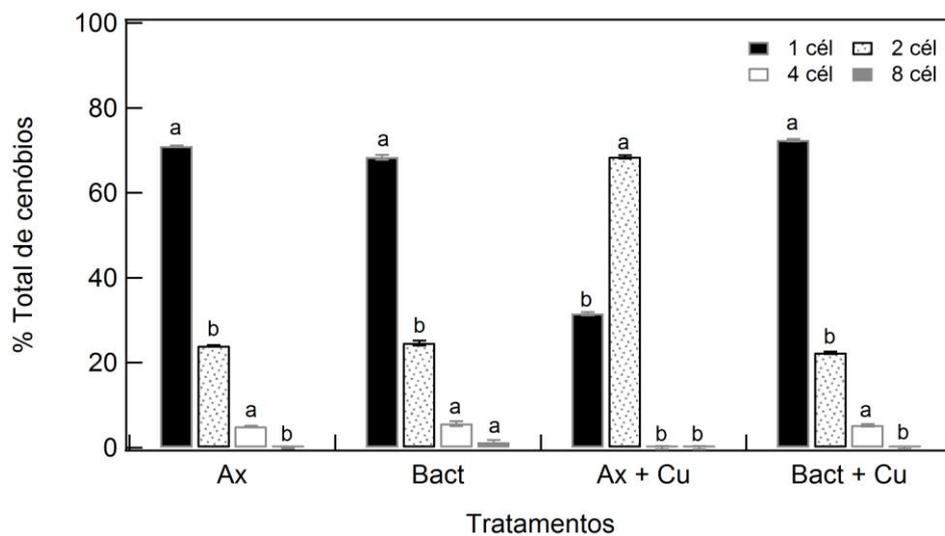
**Figura 9.** Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) de *D. spinosus* no obtida até 48 h. Barras de erro indicam o desvio-padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

A adição de cobre afetou também o crescimento das bactérias em co-cultivo com a microalga, retardando seu crescimento. Em ambos os tratamentos Bact e Bact+Cu as densidades bacterianas atingiram valores máximos semelhantes, mas no tratamento Bact a densidade máxima de bactérias ocorreu em 24 horas (Figura 10) com taxa de crescimento =  $0,23 d^{-1}$ , enquanto que em Bact+Cu a densidade máxima foi atingida em 48h com taxa de crescimento =  $0,11 d^{-1}$ .

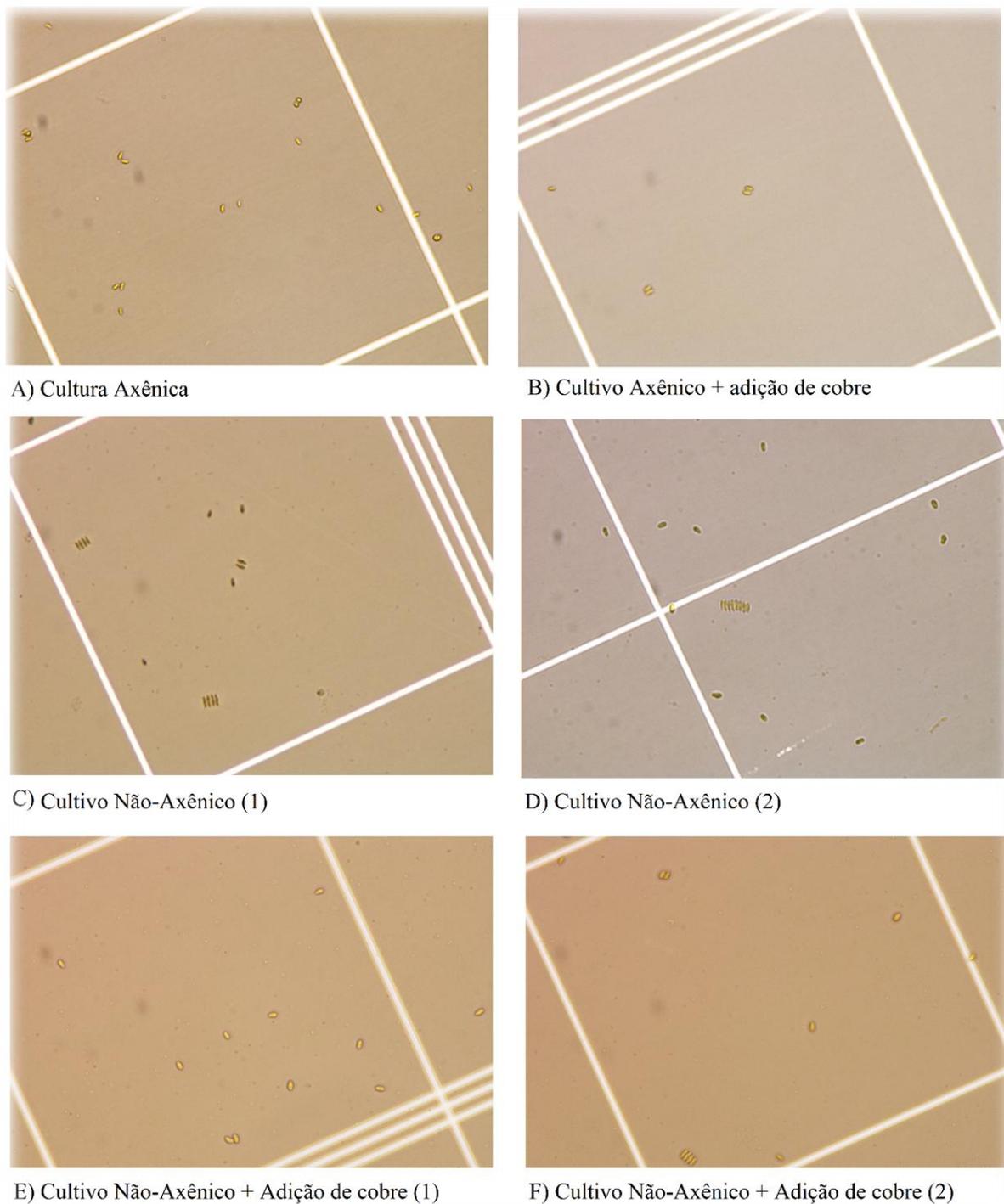


**Figura 10.** Curva do crescimento bacteriano em função do tempo experimental de 96 horas. Barras de erros indicam o desvio-padrão (n=3).

A contagem de células livres e de cenóbios no último dia experimental, mostrou certa plasticidade fenotípica da microalga na presença e ausência de bactérias e com adição extra de cobre. Nos cultivos axênicos (Ax+Cu) houve um predomínio de células livres e formações de cenóbios com duas células, ao passo que os demais tratamentos foram iguais entre si, exceto em Bact, único tratamento que apresentou formações de cenóbios com até 8 células (Figura 11). As imagens dos cenóbios formados podem ser visualizadas na figura 12.



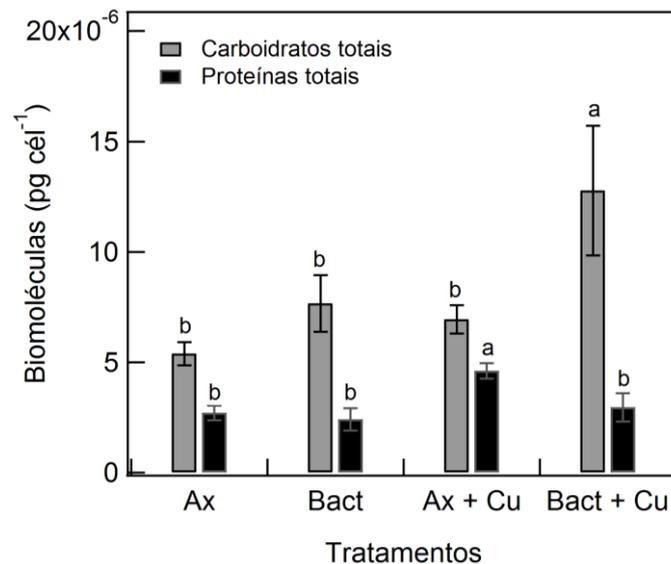
**Figura 11.** Porcentagem do número de células por cenóbios em função dos diferentes tratamentos em 96 horas de exposição ao cobre. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) e barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ).



**Figura 12.** Imagens ampliadas 40x dos cultivos em 96 horas de exposição ao cobre mostrando os cenóbios formados.

Em relação à composição bioquímica de *D. spinosus* (Figura 13), a proteína por célula foi mais alta somente no tratamento em que apenas o cobre foi adicionado, Ax+Cu (Anova,  $p < 0,05$ ). Já o conteúdo de carboidratos é maior apenas

quando na presença de bactérias com o metal, sendo a concentração de carboidratos em Bact+Cu aproximadamente 3x e 2x maior do que em Ax+Cu e Ax, respectivamente.

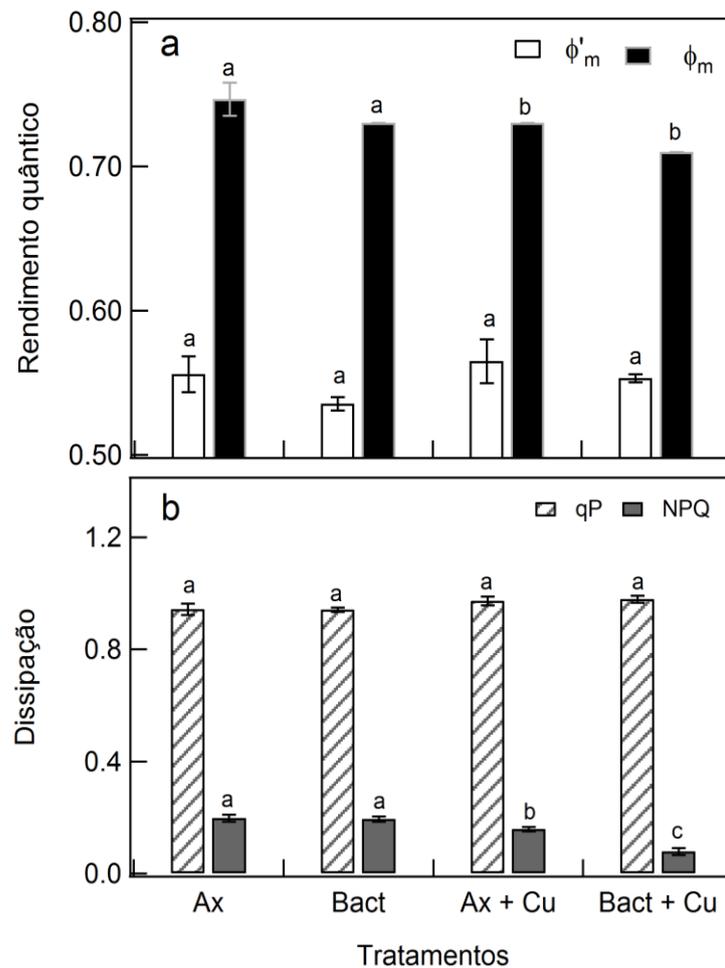


**Figura 13.** Carboidratos totais e Proteínas totais em função dos tratamentos para o tempo experimental de 48 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) e barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ).

O rendimento quântico máximo ( $\Phi_m$ ) e o rendimento quântico operacional ( $\Phi'_m$ ) obtidos em 48 h de exposição ao cobre e as bactérias são reportados na Figura 14a. Houve diminuição do  $\Phi_m$  (Anova,  $p < 0,05$ ) nos tratamentos com cobre, independente da presença das bactérias. O  $\Phi'_m$  não apresentou diferenças entre os tratamentos.

A aplicação do modelo matemático na técnica do Phyto-PAM nos permite analisar o quanto de energia dos centros de reação dos fotossistemas (PSs) foram utilizadas no transporte de elétrons ( $qP$ ) e o quanto foi dissipado na forma de calor (NPQ). A energia direcionada para o transporte de elétrons ( $qP$ ) permaneceu igual para todos os tratamentos, enquanto os tratamentos com cobre demonstraram

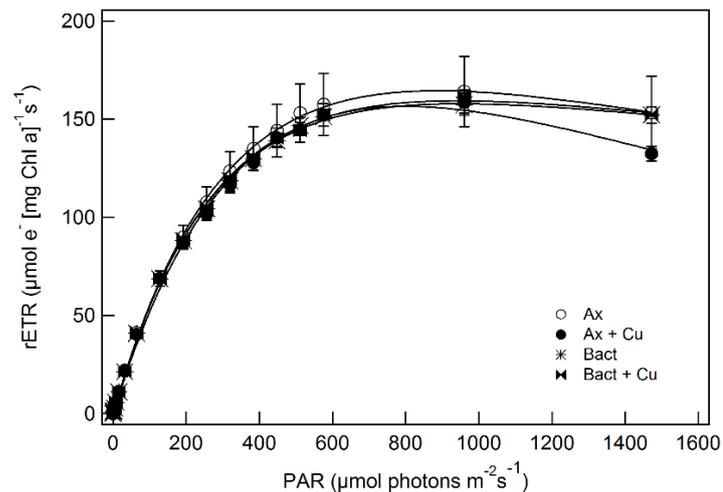
redução da energia dissipada em forma de calor (NPQ) em comparação aos tratamentos sem cobre extra (Anova,  $p < 0,05$ ), sendo o menor valor encontrado para o tratamento Bact+Cu (Figura 14b).



**Figura 14.** (a) Rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e efetivo ( $\Phi'_M$ ) e (b) dissipações fotoquímica – qP e não-fotoquímica - NPQ nos cultivos de *D. spinosus* em 48 horas de exposição ao cobre. Valores de fluorescência reportados em unidades arbitrárias (U.A.). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) e barras de erros indicam o desvio-padrão ( $n=3$ ).

As curvas de saturação de luz e os parâmetros obtidos após o tratamento matemático dos dados são apresentados na figura 15 e tabela 3, respectivamente. Os tratamentos foram iguais entre si (Anova,  $p > 0,05$ ), no entanto é possível observar uma fotoinibição maior no tratamento axênico com cobre.

Os parâmetros da curva de luz, ( $\alpha$ ) inclinação da reta, ( $E_k$ ) irradiância de saturação e (rETR) taxa de transporte de elétrons também não sofreram nenhuma alteração diante aos interferentes, cobre e bactérias (Tabela 3).



**Figura 15.** Curvas rápidas de saturação luminosa reportada como taxa de transporte de elétrons (ETR relativa) em função da intensidade luminosa ( $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) para os tratamentos em 48 h do tempo experimental. Barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

**Tabela 3:** Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas de saturação de luz em 48 horas de exposição ao cobre. Valores médios de ETR relativa máxima (mETR), inclinação inicial da curva ( $\alpha$ ) e intensidade luminosa de saturação ( $E_k$ ). Desvio padrão entre parênteses ( $n=3$ ). Letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

Tratamentos	mETR	$\alpha$	$E_k$
<b>Ax</b>	164.5 (18.0) <sup>a</sup>	0.65 (0.02) <sup>a</sup>	245 (20.4) <sup>a</sup>
<b>Bact</b>	158.0 (0.3) <sup>a</sup>	0.65 (0.03) <sup>a</sup>	240 (11.7) <sup>a</sup>
<b>Ax + Cu</b>	156.6 (6.3) <sup>a</sup>	0.60 (0.01) <sup>a</sup>	258 (12.7) <sup>a</sup>
<b>Bact + Cu</b>	160.0 (0.3) <sup>a</sup>	0.65 (0.01) <sup>a</sup>	244 (5.6) <sup>a</sup>

#### 4.2.2 DISCUSSÃO

Os resultados da determinação de cobre livre seguiram o mesmo padrão da etapa 1 (Cap.1), uma vez que devido à presença do ligante EDTA, a quantidade de cobre livre no meio de cultivo W.C. foi menor do que a adicionada. A quantidade de cobre livre medida foi de 0,004  $\mu\text{M Cu}^{2+}$  para os tratamentos sem adição extra de cobre e 3,0  $\mu\text{M Cu}^{2+}$  para os demais tratamentos.

As microalgas em geral são muito úteis para avaliar a contaminação por metais em ensaios laboratoriais, pois são sensíveis a eles em concentrações acima das requeridas por elas. Tradicionalmente, os testes de toxicidade em laboratórios são realizados com uma única espécie, monocultivo, e sem a avaliação da presença ou ausência de bactérias, sendo este último, um quesito irrelevante às normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Entretanto, é pouco conhecido como as bactérias podem influenciar nas respostas toxicológicas e metabolismo das microalgas a contaminantes metálicos. Um ponto importante dessa pesquisa foi avaliar a sensibilidade da microalga *D. spinosus* ao cobre perante um cultivo axênico e não-axênico, uma vez que diferenças nestes tratamentos podem induzir a diferentes interpretações dos testes toxicológicos. Algumas bactérias são componente funcional essencial do ambiente algal (SALAÜN et al., 2012) e as respostas apresentadas pela microalga dependem das espécies de bactérias presentes no meio (SHER et al., 2011), nesta pesquisa, optamos por uma comunidade bacteriana natural, composta por diversas espécies com mais chances de interação com a microalga.

As bactérias podem ter um efeito positivo ou negativo nas algas em ambientes naturais. Por exemplo, uma comunidade bacteriana pode interferir na toxicidade do metal aumentando sua área de superfície de absorção em cultivos de microalgas (LEVY et al., 2009). O crescimento de *D. spinosus*, representado na figura 9, foi maior na presença de bactérias e mesmo com excesso de cobre. Levy et al., (2009) demonstraram que as espécies *Nitzschia closterium* e *Pseudokirchneriella subcapitata* obtiveram maiores taxas de crescimentos em cultivos não-axênicos, onde a presença de uma diversidade de bactérias associada a cultura algal foi benéfica para as espécies mesmo com o aumento da concentração de cobre dissolvido no meio. Estudando as interações entre bactérias e algas, Grossart et al. (2006) mostraram que as espécies *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira rotula* apresentaram densidades celulares mais altas quando na presença de bactérias, a alta densidade celular da microalga após às 48 h no cultivo não-axênico (Bact) de *D. spinosus* pode ter ocorrido devido a remineralização de nutrientes, produção de vitaminas ou outros compostos promotores de crescimento pelas bactérias (CROFT et al., 2005; JIANG et al., 2007). No cultivo Bact+Cu pode ter havido sequestro dos íons de cobre pelas bactérias ou complexação com os produtos excretados por elas (KOUKAL et al., 2007; LEVY et al., 2009), diminuindo sua biodisponibilidade para a microalga, concomitantemente com presença de populações bacterianas que também agiram remineralizando nutrientes e/ou produzindo compostos promotores de crescimento.

Apesar das bactérias, ao serem comparadas às microalgas (I) obterem taxas de crescimento mais altas, (II) terem maior relação entre sua área superficial/volume e (III) possuírem taxas mais rápidas de absorção de fósforo (RIER; STEVENSON, 2002), assim como para as microalgas, vários fatores

abióticos e bióticos influenciam a abundância e atividades da comunidade bacteriana. Podemos observar que a taxa de crescimento das bactérias para o tratamento que continha cobre (Bact+Cu) foi menor que o tratamento sem cobre em excesso (Bact). Um dos mecanismos das bactérias para resistir aos efeitos do cobre sobre o seu crescimento consiste em manter um efluxo ativo de bombeamento de cobre para fora da célula ou desintoxicação enzimática, onde irá reduzir a toxicidade do íon tóxico (MEJÁRE; BÜLOW, 2001) e, provavelmente, esse tenha sido o motivo pelo qual houve o retardo do crescimento bacteriano no tratamento Bact+Cu, e que contribuiu para que a população bacteriana alcançasse o pico de crescimento como em Bact. Segundo Mejáre e Bülow (2001) as células bacterianas também podem contornar o estresse causado pelo cobre aumentando a capacidade de ligação de metalotioneínas com o metal, elas expressam os ligantes de metais na superfície da célula, onde não irão interferir nas atividades intracelulares. Ao final do crescimento exponencial e início da estacionária da microalga houve queda do número de células bacterianas, sendo que após 72h a densidade da alga se sobrepõe às bactérias. Nesta fase do crescimento algal deve-se considerar uma diminuição da incidência luminosa, pois segundo Gurung et. al., (1999), sob condições de pouca luz, devido ao auto sombreamento das microalgas, pode-se esperar que a densidade de bactérias seja menor em relação à densidade de algas, pois a excreção de carbono orgânico por célula de algas deve ser mais baixa.

Vários são os mecanismos nas microalgas que estão relacionados aos efeitos tóxicos dos metais e a formação de cenóbios é uma delas. As células na colônia ou cenóbios ocorrem comumente com duas, quatro ou oito células (LEE, 2008). Segundo Egan e Trainor, (1989) a morfologia da colônia pode variar de acordo com o meio ambiente em que estão crescendo. Na ausência de predadores,

muitas espécies de *Scenedesmus* tendem a crescer como células livres, pois as vantagens para a espécie no estado unicelular incluem menor velocidade de naufrágio das células e maior área de superfície para a relação de volume em termos de absorção de nutrientes e de luz (LÜRLING, 1998). Em nosso caso, as células encontravam-se em condições ótimas de crescimento e sem efeito de predadores, portanto, o investimento na formação de cenóbios foi menor nos cultivos axênicos, como observado na Figura 11. Outro mecanismo está relacionado com a formação de cenóbios com duas ou mais células, nos quais as mudanças no número de células por cenóbio provavelmente é um indicativo de processo fisiológico citocinético afetado por estresse causado pelo cobre (LOMBARDI et al., 2007). Nossos resultados para o tratamento Ax+Cu concordam com os da literatura, pois nessa cultura os números de células individuais foram reduzidos comparados aos tratamentos sem adição extra de cobre. No entanto, o número de cenóbios com 8 células foram significativamente maiores apenas no cultivo contaminado somente com bactérias. Sugerimos que, possivelmente, a formação de cenóbios com 8 células ocorreu para que fosse reduzido a área de superfície de contato com os excretados produzidos pelas bactérias, uma vez que também podem ser desfavoráveis a microalga.

Em alguns casos, nas associações alga/bactérias, há gasto energético pelo fitoplâncton para manter as populações bacterianas, em contrapartida, as bactérias que interagem com o fitoplâncton podem ser selecionadas pela qualidade do produto excretado pelo fitoplâncton (BAGATINI et al., 2014). O aumento dos carboidratos intracelulares totais em Bact+Cu pode estar diretamente ligada a um dos mecanismos de defesa contra a toxicidade do metal, na qual estas biomoléculas podem se ligar ao cobre diminuindo sua toxicidade (AFKAR; ABABNA; FATHI, 2010)

já que a taxa de crescimento neste tratamento foi alta. Este aumento também poderia estar relacionado à redução da excreção extracelular de carboidratos pela microalga para diminuir a competição com as bactérias e não fomentar o crescimento bacteriano, assim, acumulando carboidratos intracelulares, uma vez que os carboidratos foram medidos em 48 h, momento em que ocorreu a maior densidade de bactérias para Bact+Cu. Estudos indicam a utilização de nutrientes inorgânicos dissolvidos na água pelas bactérias para sua complementação nutricional, um comportamento similar ao da microalga (COVENEY; WETZEL, 1988) e que leva à competição entre os microrganismos. Segundo Geider e La Roche, (2011), os carboidratos de armazenamento são os que as células acumulam, dentro e fora dos cloroplastos, em condições de estresse. Já no tratamento Ax+Cu, houve maior produção de proteínas comparado aos demais tratamentos. Este resultado confirma a influência das bactérias na toxicidade do metal. Na ausência das bactérias em meio com excesso de cobre a microalga investiu no aumento das biomoléculas proteicas ligadoras de metais.

A noção de concentração tóxica é usada para uma concentração de metais pesados que inibe significativamente a atividade metabólica sem induzir a morte das microalgas e plantas em geral. A microalga é exposta a metais e podem permanecer vivas, mas com uma diminuição na taxa de crescimento (CLIJSTERS; VAN ASSCHE, 1985). No presente trabalho, foi constatada pequena diminuição da taxa de crescimento da microalga no tratamento Ax+Cu, e aumento da taxa nos cultivos com bactérias. No entanto, não foi constatada diminuição da fluorescência da clorofila *a* (Figura 9b) na fase exponencial de crescimento e no qual foram realizadas as amostragens para as análises das atividades fotossintéticas. Segundo Talec et al., (2013) a clorofila *a* é o principal regulador da fotossíntese,

principalmente em condições controladas de luz e temperatura. O rendimento quântico efetivo ( $\Phi'_m$ ) é um dos parâmetros mais importantes da fotossíntese e nos indicou que as células estavam em boas condições de cultivo independente do tratamento, este parâmetro mede a proporção de luz absorvida pela clorofila associada ao fotossistema II e que é usada na fotoquímica indicando a performance fotossintética real da microalga aclimatada a luz (CAMPOSTRINI, 1998). Além disso, os valores de  $\Phi'_m$  são suportados pelos valores de qP (Figura 14b) que mantiveram-se próximos de 1,0 em todos os tratamentos, indicando a quantidade de energia direcionada para a realização da fotoquímica (JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002; JUNEAU; HARRISON, 2005). Lombardi e Maldonado, (2011) sugerem que o  $\Phi'_m$  é um parâmetro menos sensível a variações ambientais comparado ao  $\Phi_m$ .

No rendimento quântico máximo houve tendência de redução em ambos os tratamentos com cobre (com e sem bactérias), embora a diferença seja pouca (Anova,  $p < 0,05$ ) com redução cerca de 4,05%. Este resultado está de acordo com os de Koukal et al., (2007) que nos mostra que a atividade fotossintética de *P. subcapitata* diminui com o aumento de metais (Cu, Zn e Cd) e, os autores também relatam que o efeito protetor dos exsudatos produzidos pela microalga podem desaparecer quando se encontram em concentrações altas do metal, principalmente o cobre, o que pode ter ocorrido nos cultivos de *D. spinosus* sob estresse do metal. Estes exsudatos podem ser bacterianos ou originados da alga, e também pode ser considerado mais um dos mecanismos de sobrevivência para esses organismos sob estresse (LEVY et al., 2009). Há também que se considerar que houve o aumento da produção de carboidratos pela *D. spinosus* nos cultivos Bact+Cu, os autores Grassi e Mingazzini, (2001) sugeriram que poderiam existir sítios de ligações estruturalmente diferentes nas moléculas de carboidratos, que poderiam complexar

o metal, sugerindo o motivo pelo qual houve baixa diferença no rendimento quântico em relação aos demais tratamentos. Em Miao et. al, (2005) e Mallick e Mohn, (2003) redução do  $\Phi_m$  é atribuído à diminuição do transporte de elétrons do PSII para o PSI limitam a reoxidação da Qa.

A energia luminosa que não é utilizada na fotoquímica, teoricamente é dissipada na forma fluorescência ou calor (CAMARGO; LOMBARDI, 2017) e seus valores tendem a aumentar sob estresse por metais (ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI, 2017; MISRA; MISRA; SINGH, 2012). No entanto, neste estudo, houve redução de NPQ nos tratamentos com cobre e, redução ainda maior no tratamento com a presença de bactérias. Isto pode ser indicativo de que *D. spinosus* estaria utilizando de outros meios para se defender do estresse sofrido pelo cobre, bem como o aumento de proteínas no tratamento Ax+Cu e o aumento de carboidratos em Bact+Cu, e que as bactérias poderiam ser um agente que diminui os efeitos do metal.

A fluorimetria modulada por amplitude de pulso (PAM) é conhecida por ser um método não invasivo, que não agride as células analisadas e possui vantagens nos testes ecotoxicológicos com informações rápidas e seguras (MIAO; WANG; JUNEAU, 2005). É um método estabelecido para caracterizar o estado do aparelho fotossintético, como por exemplo, o desempenho da utilização da energia fotoquímica (KROMKAMP; FORSTER, 2003). Os resultados obtidos da curva de luz para *D. spinosus* nos mostram que somente no tratamento Ax+Cu a fotoinibição foi evidente ao final da curva, indicando maior sensibilidade da microalga aos íons de cobre quando em tratamento axênico. Já os parâmetros obtidos após modelar as curvas de saturação de luz e reportados como ETR<sub>max</sub>,  $\alpha$  e  $E_k$  são evidências de

que *D. spinosus* não fora afetada pelo cobre nem pelas bactérias presentes no meio de cultivo nas atividades fotossintéticas.

Apesar das atividades fotossintéticas terem sido pouco afetadas, nossos resultados mostram que às interações bactérias-fitoplâncton são variáveis para os demais parâmetros analisados neste pesquisa, podendo, ainda, haver maior complexidade quando em sistemas naturais.

#### 4.2.3 CONCLUSÃO

As interações microalga/bactérias são sistemas complexos e podem influenciar nas interpretações do que ocorre no ambiente e em ensaios laboratoriais. Nesta pesquisa concluímos que a presença de bactérias pode alterar a toxicidade do cobre para a microalga. Isso pode ser devido ao efeito das bactérias na complexação do cobre, alterando sua biodisponibilidade.

A presença de bactérias e cobre afetaram o parâmetro de crescimento de *D. spinosus*. O crescimento celular aumentou em 5,5% nos cultivos contaminados com bactérias (Bact+Cu) comparado ao axênico (Ax+Cu), enquanto a fluorescência da clorofila *a* manteve-se similar.

A concentração de carboidratos totais por célula aumentou apenas quando a microalga foi exposta concomitantemente ao cobre e às bactérias, enquanto que o teor de proteínas totais aumentou sob influência do cobre isoladamente.

Na concentração de cobre testada ( $3,0 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ), não houve alteração dos processos fotossintéticos no ensaio a curto prazo.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estado fisiológico e sensibilidade da microalga *Desmodesmus spinosus* é afetado a longo prazo devido a concentrações ambientalmente relevantes ou altas de cobre. Os rendimentos quânticos máximo e operacional, bem como, as curvas de saturação de luz não foram os parâmetros mais sensíveis para as análises da toxicidade do cobre, tanto em cultivos axênicos como em não-axênicos.

Em cultivos axênicos houve aumento na produção de proteínas somente na maior concentração testada (acima de  $3,0 \mu\text{M Cu}^{2+}$  livre). A presença de bactérias aumentou apenas a produção de carboidratos (em cerca de 3x) em cultivos contaminados com cobre.

A determinação do cobre livre permitiu verificar que há redução do cobre adicionado, sugerindo a importância em ressaltar os resultados em função das concentrações que de fato estão disponíveis no meio de cultivo, e.g., cobre livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

O bioensaio com culturas axênicas e não-axênicas com cobre sugere que diferentes interpretações dos testes podem ser realizados e, portanto, enfatizamos que as respostas das microalgas em ensaios ecotoxicológicos devem ser relatados em função das condições dos cultivo, sendo na presença ou ausência de bactérias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, R. M. M. Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 58–64, 2010.
- ABED, R. M. M.; KÖSTER, J. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 1, p. 29–37, 2005.
- AFKAR, E.; ABABNA, H.; FATHI, A. Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris*, to Some Heavy Metals. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 6, n. 3, p. 230–237, 2010.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. [s.l: s.n.]. v. XXXIII
- ANDREAZZA, R. et al. Bioremediation of copper contaminated areas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127–136, 2013.
- AVDEEF, A.; ZABRONSKY, J.; STUTING, H. H. Calibration of Copper Ion Selective Electrode Response to pCu 19. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 298–304, 1983.
- BAGATINI, I. L. et al. Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- BEER, L. L. et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 264–271, 2009.
- BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 173–185, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRUCKNER, C. G. et al. Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: Phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7740–7749, 2008.

CAMARGO, E. C.; LOMBARDI, A. T. Correction to: Effect of cement industry flue gas simulation on the physiology and photosynthetic performance of *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 235, p. 1, 2017.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a, considerações teóricas e aplicações práticas. **UENF**, 198f, p. 1–34, 1998.

CARDOSO, A.; ELIZA, G.; MARQUES<sup>3</sup>, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542–549, 2011.

CHIA, M. A. et al. Phosphorus levels determine changes in growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* during cadmium stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 1883–1891, 2017.

CLIJSTERS, H.; VAN ASSCHE, F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photosynthesis Research**, v. 7, n. 1, p. 31–40, 1985.

COUTINHO, C. F. B.; COUTINHO, L. F. M.; MAZO, L. H. Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 228–233, 2009.

COVENEY, M. F.; WETZEL, R. G. Experimental evaluation of conversion factors for the [3H]thymidine incorporation assay of bacterial secondary productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2018–2026, 1988.

CROFT, M. T. et al. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. **Nature**, v. 438, n. 7064, p. 90–93, 2005.

DAL MAGRO, C. et al. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. **Quimica Nova**, v. 36, n. 8, p. 1139–1145, 2013.

- DANGER, M. et al. Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. **Functional Ecology**, v. 21, n. 2, p. 202–210, 2007.
- ECHEVESTE, P.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, n. May, p. 228–235, 2017.
- EGAN, P. F.; TRAINOR, F. R. **The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae)** *Journal of Phycology*, 1989.
- FAWAZ, E. G.; SALAM, D. A.; KAMAREDDINE, L. Evaluation of copper toxicity using site specific algae and water chemistry: Field validation of laboratory bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 155, n. February, p. 59–65, 2018.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.
- FILIPPIS, L. F. D. E. The Effect of Heavy Metals on the Absorption Spectra of Chlorella Cells and Chlorophyll Solutions. **Zeitschrift for Pflanzenphysiologie**, v. 93, n. 2, p. 129–137, 1978.
- FRANCO, M. C. et al. Performance of Chlorella sorokiniana under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 693–699, 2012.
- FUKAMI, K.; NISHIJIMA, T.; ISHIDA, Y. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. **Hydrobiologia**, v. 358, n. 1987, p. 185–191, 1997.
- GEIDER, R.; LA ROCHE, J. Redfield revisited : variability of C : N : P in marine microalgae and its biochemical basis Redfield revisited : variability of C : N : P in marine microalgae and its biochemical basis. n. May 2013, p. 37–41, 2011.
- GOECKE, F. et al. Review chemical interactions between Marine macroalgae and bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 409, p. 267–300, 2010.
- GRASSI, M.; MINGAZZINI, M. <sup>113</sup>Cd-NMR and Fluorescence Studies of the Interactions between Cd(II) and Extracellular Organic Matter Released by *Selenastrum capricornutum*. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 21, p. 4271–4276, 2001.
- GROSS, R. E.; PUGNO, P.; DUGGER, W. M. Observations on the mechanism of

copper damage in chlorella. **Plant physiology**, v. 46, n. 2, p. 183–185, 1970.

GROSSART, H.-P.; SIMON, M. Interactions of planctonic algae and bacteria: Effects on algal growth and organic matter dynamics. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 47, n. 3, p. 163–176, 2007.

GROSSART, H. P.; CZUB, G.; SIMON, M. Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1074–1084, 2006.

GUILLARD, R. R. L; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with Chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10–14, 1972.

GURUNG, T. B.; URABE, J.; NAKANISHI, M. Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 17, n. 1, p. 27–35, 1999.

HAMED, S. M. et al. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. May, p. 19–25, 2017.

JIANG, L. et al. Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.). **Hydrobiologia**, v. 581, n. 1, p. 161–165, 2007.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002.

JUNEAU, P.; HARRISON, P. J. Comparison of Photosynthetic Activity of Nine Different Marine Phytoplankton Grown Under Identical Conditions Using PAM Fluorometry. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 3, p. 649–653, 2005.

KNAUER, K.; BEHRA, R.; SIGG, L. Effects of Free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  Ions on Growth and Metal Accumulation in Freshwater Algae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 220, 1997.

KOUKAL, B. et al. Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae)

exudates on metal toxicity and colloid aggregation. **Water Research**, v. 41, n. 1, p. 63–70, 2007.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 313–349, 1991.

KROMKAMP, J. C. et al. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 327–344, 2008.

KROMKAMP, J. C.; FORSTER, R. M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: Differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 103–112, 2003.

KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 2, p. 259–266, 1996.

LE CHEVANTON, M. et al. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 212–222, 2013.

LEE, R. E. **Phycology**. [s.l.: s.n.].

LEVY, J. L. et al. The effect of bacteria on the sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1266–1274, 2009.

LOMBARDI, A. T. et al. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, n. 1, p. 74–78, 2007.

LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011.

LÜRLING, M. Effect of grazing-associated infochemicals on growth and morphological development in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 34, n. 4, p. 578–586, 1998.

- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: A case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 1, p. 64–69, 2003.
- MARTIM, H. C.; SANTOS, V. M. L. DOS. Avaliação de impactos ambientais em empresa de mineração de cobre utilizando redes de interação. **Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas**, p. 3246–3257, 2013.
- MEJÁRE, M.; BÜLOW, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 67–73, 2001.
- MENEZES, R. S. et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2013.
- MEZZOMO, N. et al. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173–178, 2010.
- MIAO, A.-J.; WANG, W.-X.; JUNEAU, P. Comparison of Cd, Cu, and Zn Toxic Effects on Four Marine Phytoplankton by Pulse-Amplitude-Modulated Fluorometry. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2603–2611, 2005.
- MIAZEK, K. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23929–23969, 2015.
- MISRA, A. N.; MISRA, M.; SINGH, R. Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. **Biophysics**, p. 220, 2012.
- MONTANHIM, GRAZIELA CRISTINA; HANEDA, RENATA NATSUMI; LOMBARDI, ANA TERESA; LIMA, M. I. S. Uso de biomassa de algas para a peletização de... 867  
USO DE BIOMASSA DE ALGAS PARA A PELETIZAÇÃO DE SEMENTES DE. **Revista Árvore**, v. 38, p. 867–877, 2014.
- OGA, S. **Fundamentos de toxicologia** **Ciência & Saúde Coletiva**, 2008. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7660051>><http://www.who.int/iris/handle/1>

0665/42893%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:M ANUAL+OF+THE+INTERNATIONAL+STATISTICAL+CLASSIFICATION+OF+DISEA SES,+INJURIES,+AND+CAUSES+OF+DEATH#1%252>

OXBOROUGH, K.; BAKER, N. R. Resolving chlorophyll a fluorescence of photosynthetic efficiency into photochemical components—calculation of  $qP$  and  $F_v'/F_m'$  without measuring  $F_o'$ . **Photosynthesis Research**, v. 54, n. 1989, p. 135–142, 1997.

PAERL, H. W. Role of heterotrophic bacteria in promoting  $N_2$  fixation by *Anabaena* in aquatic habitats. **Microbial Ecology**, v. 4, n. 3, p. 215–231, 1977.

PAERL, R. W. et al. Vitamin B1 ecophysiology of marine picoeukaryotic algae: Strain-specific differences and a new role for bacteria in vitamin cycling. **Limnology and Oceanography**, v. 60, n. 1, p. 215–228, 2015.

PISTOCCHI, R. et al. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 2, p. 125–132, 1997.

RIER, S. T.; STEVENSON, R. J. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. **Hydrobiologia**, v. 489, p. 179–184, 2002.

ROSINI, E. F. Scenedesmaceae ( Chlorococcales , Chlorophyceae ) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo , SP , Brasil : v. 40, n. 4, p. 661–678, 2013a.

ROSINI, E. F. Scenedesmaceae ( Chlorococcales , Chlorophyceae ) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo , SP , Brasil : **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 661–678, 2013b.

RUGNINI, L. et al. Testing of two different strains of green microalgae for Cu and Ni removal from aqueous media. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 959–967, 2017.

RUGNINI, L. et al. Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green microalga *Desmodesmus* sp.: An integrated approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 125, n. November 2017, p. 45–51, 2018.

- SALAÜN, S. et al. Influence of Exudates of the Kelp *Laminaria Digitata* on Biofilm Formation of Associated and Exogenous Bacterial Epiphytes. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 2, p. 359–369, 2012.
- SARMENTO, H. et al. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. **Freshwater Biology**, v. 53, n. 4, p. 756–771, 2008.
- SCHMITZ, R.; MAGRO, C.; COLLA, L. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 10, n. 1–2, p. 51–62, 1986.
- SHER, D. et al. Response of *Prochlorococcus* ecotypes to co-culture with diverse marine bacteria. **ISME Journal**, v. 5, n. 7, p. 1125–1132, 2011.
- SHI, L. et al. Molecular identification of the colony-associated cultivable bacteria of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their effects on algal growth. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 24, n. 2, p. 211–218, 2009.
- SHOAF, W. T.; LIUM, B. W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 6, p. 926–928, 1976.
- SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, n. May, p. 57–63, 2018a.
- SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, n. May, p. 57–63, 2018b.
- STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. [s.l.: s.n.]. v. 2
- TAKAMURA, N.; KASAI, F.; WATANABE, M. M. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, n.

1, p. 39–52, 1989.

TALEC, A. et al. Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 353–359, 2013.

TONIETTO, A. E. et al. Copper and cadmium complexation by *Cylindrospermopsis raciborskii* exudates. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 10, p. 2544–2551, 2016.

WANG, H. et al. Novel bacterial isolate from permian groundwater, capable of aggregating potential biofuel-producing microalga *Nannochloropsis oceanica* IMET1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1445–1453, 2012.

WANG, H. et al. Effects of bacterial communities on biofuel-producing microalgae: Stimulation, inhibition and harvesting. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 341–352, 2014.

WATANABE, T; MACHIDA, K; SUZUKI, H; KOBAYASHI, M; HONDA, K. Photoelectrochemistry of metallochlorophylls. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 64, p. 207–224, 1985.

YANG, J. S. et al. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 537–544, 2015.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 145–156, 2005.