

**Daniel Albuquerque Pereira**

Influência de fatores bióticos e abióticos na composição  
de metabólitos secundários em cianobactérias

Belo Horizonte

2010

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo  
da Vida Silvestre

Influência de fatores bióticos e abióticos na composição  
de metabólitos secundários em cianobactérias

Tese apresentada ao Departamento de  
Biologia Geral do Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ecologia, Conservação e Manejo da  
Vida Silvestre.

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Giani  
Departamento de Botânica, ICB, UFMG

Belo Horizonte

2010

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Eveline e Roberto, minha irmã Camila e minha avó Marília, por todo o apoio que me deram durante a minha vida e pelo suporte dado às escolhas que fiz.

A minha orientadora, professora Alessandra Giani, pela contribuição a minha formação científica, pelos diversos ensinamentos e pela oportunidade e confiança em me deixar desenvolver parte de meu mestrado no Canadá.

Ao professor David Bird por me receber em seu laboratório em montréal, pela contribuição dada ao à minha dissertação de mestrado e pela ajuda em diversas situações.

Ao pessoal do laboratório de Ficologia, Juliana, Gabriela, Camila, Ana Helena, Cléber, Fernanda, Bruna, Lenora, Adriana, Elenice, Ana Maria, Carolina e Samuel pelo apoio durante a minha graduação e mestrado.

As técnicas de laboratório da UQÀM, Isabelle Rheault, Alice Parkes, Irina Moukhina e Isabelle Roby, pela ajuda no laboratório e com as diversas análises que fiz no Canadá.

Aos amigos da pós graduação em ecologia, Nelsão e João por me ajudarem a aguentar todo o período de aulas.

Aos amigos da biologia, Laila, Gustavo, Doido, Léo, Beto, Ericson, Arthur, Leopoldo, Flávio, Ana Crstina, Duda e Rafão, pela amizade e apoio durante todos os anos de minha graduação e mestrado.

A Capes pela bolsa de mestrado.

Ao BCEI (Bureau Canadien de l'éducation internationale) pela bolsa de estudos referente ao período em que estive no Canadá.

## Resumo

Cianobactérias são conhecidas por produzirem uma grande quantidade de peptídeos bioativos, sendo os mais comuns as microcistinas, anabaenopeptinas, cianopeptolinas e microviridinas. As hipóteses sobre as funções destes peptídeos incluem proteção contra predação, alelopatia, *quorum sensing* bacteriano e metabolismo interno, porém, algumas destas funções podem ser apenas secundárias. A compreensão dos fatores que afetam a produção destes compostos pode ajudar a compreender suas funções ecológicas e fisiológicas. Neste trabalho, a influência de diferentes fatores (intensidade luminosa, concentração de ferro e extratos zooplânctônicos) no perfil peptídico de cianobactérias foi testada. Os testes foram feitos com duas cepas de *Radiocystis fernandoii* (experimentos de luz e zooplâncton), uma de *Planktothrix agardhii* (experimento de ferro) e uma de *Microcystis panniformis* (experimento de zooplankton). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas, em condições de crescimento controladas e com a variação de um único fator. Ao final dos experimentos as culturas foram liofilizadas, os peptídeos extraídos com metanol 75% e purificados em colunas SPE C18. A quantificação dos compostos foi feita a partir de HPLC e a identificação através de um espectrômetro de massa. Os resultados mostraram que o padrão peptídico é influenciado por diferentes intensidades luminosas e concentrações de ferro, enquanto que os extratos de zooplâncton praticamente não tiveram efeito. Isto pode ser uma evidência de que a toxicidade destes compostos para outros organismos pode ser apenas uma função secundária. Foi possível perceber que a concentração de peptídeos não é necessariamente maior nas melhores condições de crescimento. É importante ressaltar a necessidade de considerar todo o espectro de peptídeos produzidos por uma cepa ou espécie ao estudar a relação destes compostos, os fatores ambientais, suas funções ecológicas e fisiológicas.

## Abstract

Cyanobacteria are known to produce different bioactive peptides. The most common are microcystins, cyanopeptolins, anabaenopeptins and microviridins. The hypotheses about the functions of these metabolites include protection against grazing, allelopathic effects, *quorum sensing* and internal metabolism, but some of these functions might be only of secondary importance. The comprehension of the factors affecting the production of these compounds may give some clues about its ecological and physiological functions. In this study, the influence of different factors (light, iron concentration and zooplankton extracts) on the pattern of peptides in cyanobacteria was tested. The experiments were done with two strains of *Radiocystis fernandoii* (light and zooplankton experiments) one strain of *Planktothrix agardhii* (iron experiments) and one strain of *Microcystis panniformis* (zooplankton experiments). All the experiments were done in triplicates under controlled growth conditions with the variation of a single factor. At the end of the experimental time, cultures were freeze dried and the peptides extracted with methanol 75% and purified with C18 SPE cartridges. The peptides were quantified by HPLC and the main peaks were analyzed in a mass spectrometer. The results showed that the peptide pattern is influenced by different light intensities and iron concentration, while the zooplankton extracts had almost no influence. These results may indicate that the toxic function of these compounds might be secondary. It was possible to see that the peptide concentration is not necessarily higher when the growth conditions are better. It is also important to note that it is necessary to consider the whole array of peptides produced by a strain or species in order to study the relationship between these compounds, its ecological and physiological functions and the environmental factors.

# Sumário

<b>1. Introdução Geral</b> .....	06
<b>2. Objetivos</b> .....	11
<b>3. Capítulo 1</b> .....	16
<b>Introdução</b> .....	17
<b>Metodologia</b> .....	19
<b>Resultados</b> .....	20
<b>Discussão</b> .....	23
<b>4. Capítulo 2</b> .....	35
<b>Introdução</b> .....	36
<b>Metodologia</b> .....	38
<b>Resultados</b> .....	40
<b>Discussão</b> .....	41
<b>5. Capítulo 3</b> .....	53
<b>Introdução</b> .....	54
<b>Metodologia</b> .....	56
<b>Resultados</b> .....	58
<b>Discussão</b> .....	61
<b>6. Conclusões finais</b> .....	71

## 1. Introdução Geral

Cianobactérias são organismos fotoautotróficos, que podem ser encontrados em uma grande variedade de habitats aquáticos, e até terrestres, e são um dos principais produtores primários em grande parte destes ambientes (Whitton & Potts, 2000). Recentemente o fenômeno da eutrofização cultural, isto é, o aumento do aporte de nutrientes, levou a formação de grandes biomassas de algas nos ambientes aquáticos (florações), onde frequentemente as cianobactérias predominam. As florações geralmente ocorrem em águas férteis e com condições favoráveis ao crescimento destes microrganismos (Paerl, 1996). O sucesso destes organismos não pode ser explicado apenas por uma característica, mas por vários fatores intrínsecos e ambientais em conjunto, como por exemplo, o fato de serem os únicos organismos do fitoplâncton capazes de fixar nitrogênio (Paerl, 1996). Durante as floracoes é possível observar uma queda da diversidade de toda a comunidade aquática, pela dominância de uma ou poucas espécies (Romo & Miracle, 1995; Zohary et al., 1996; Figueredo & Giani, 2001; Giani et al., 2005).

Diversas espécies de cianobactérias podem produzir diferentes tipos de peptídeos bioativos e tóxicos, dentre os quais podem-se destacar as: anabaenopeptinas (Harada et al., 1995), cianopeptolinas (Martin et al., 1993), microviridinas (Ishitsuka et al., 1990), microcistinas (Carmichael, 1992). A maioria destes compostos é sintetizada por vias não ribossomais, o que pode explicar a sua alta variabilidade (Börner & Dittmann, 2005; Welker & von Döhren, 2006). A formação das moléculas ocorre através de complexos enzimáticos formados por vários módulos, conhecidos como: NRPSs (non-ribosomal

peptide synthetases) e PKS (polyketide synthase) (Weber & Marahiel, 2001; Finking & Marahiel 2004). Cada modulo é composto de domínios catalíticos, sendo que um modulo mínimo é composto de um domínio de adenilação, responsável pela ativação dos aminoácido, um modulo de tiolação, responsável por transferir os intermediários ativados e um modulo de condensação (von Döhren et al., 1997; Stachelhaus et al., 1998).

As anabaenopeptinas (figura 1) são hexapeptídeos cíclicos formados por um anel de cinco aminoácidos e uma cadeia lateral formada por um aminoácido ligado ao grupo carboxi de uma lisina. Todos os aminoácidos são variáveis e estão na configuração L, com exceção da lisina na posição 2, que não é variável e está na configuração D (Harada et al., 1995). Até hoje anabaenopeptinas foram encontradas em cianobactérias isoladas de ambientes aquáticos (Harada et al., 1995), terrestres (Reshef & Carmeli, 2002) e até em esponjas marinhas (Kobayashi et al., 1991). Devido ao fato de que estas esponjas possuem uma grande variedade de simbiontes procaríotos, estes compostos devem ser produzidos por cianobactérias e não pelas esponjas (Harrigan & Goetz, 2002).

As cianopeptolinas (figura 2) são peptídeos cíclicos que se caracterizam pela presença do aminoácido Ahp (3-amino-6-hidroxy-2-piperidone), uma cadeia lateral de tamanho variável e todos os aminoácidos na configuração L (Martin et al., 1993). A grande variabilidade estrutural também reflete em uma grande variabilidade de tamanhos moleculares, partindo de 770 daltons (Willians et al., 2003) até 1181 daltons (Itou et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que algumas cianopeptolinas podem ser inibidoras de proteases de *Daphnia* (Czarnecki et al., 2006).



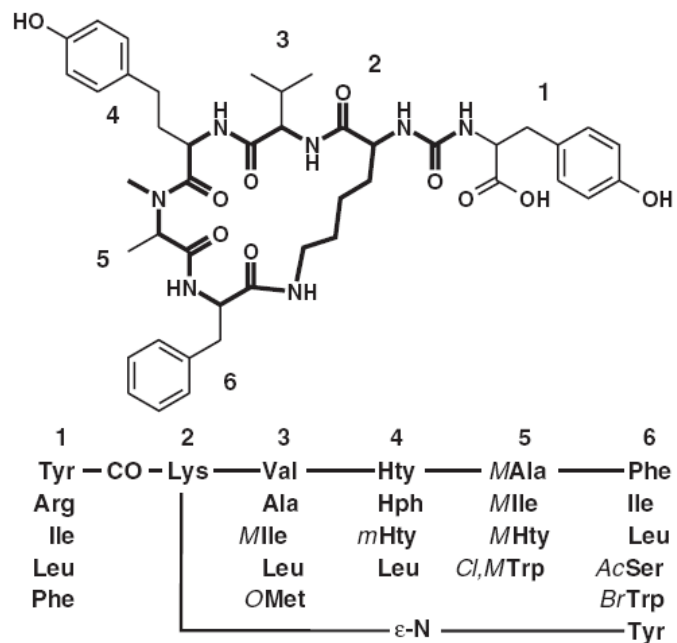


Figura 1 – Estrutura da anabaenopeptina A e esquema geral da estrutura das anabaenopeptinas. Fonte: Welker & von Döhren (2006).

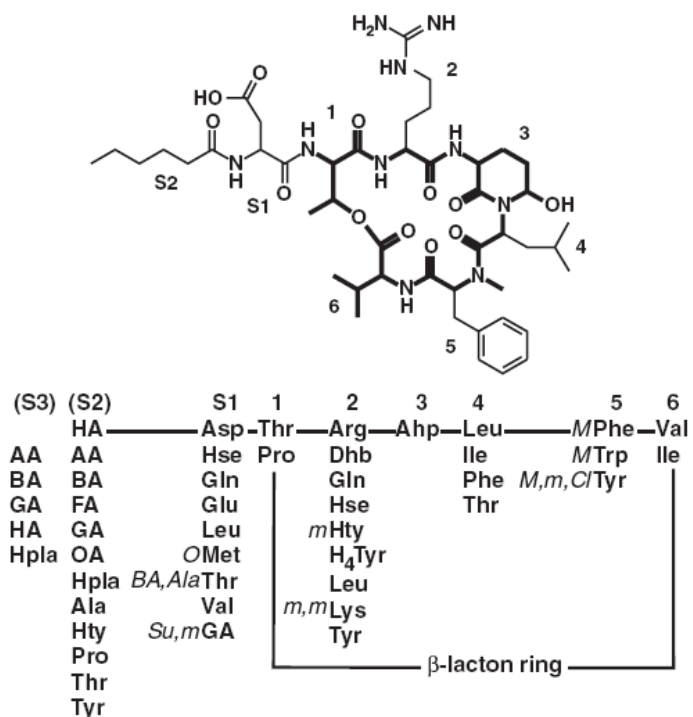


Figura 2 – Estrutura da cianopeptolina A e esquema geral da estrutura das cianopeptolinas. GA, ácido glicérico; FA, ácido fórmico; AA, ácido acético; BA, ácido butanóico; HA, ácido hexanóico; OA, ácido octanóico. Fonte: Welker & von Döhren (2006).

As microviridinas (figura 3) são os maiores peptídeos cianobacterianos conhecidos, com peso molecular na casa dos 1700 daltons (Ishitsuka et al., 1990). O grupo é caracterizado por uma estrutura multicíclica e uma cadeia lateral de tamanho variável, onde a maior parte da variação ocorre devido a substituições na posição 5 do anel e na cadeia lateral (Welker & Von Döhren, 2006). As microviridinas possuem apenas aminoácidos na configuração L e diferem dos outros grupos de peptídeos no que diz respeito a sua síntese, que ocorre através de ribossomos, com modificações pós-traducionais (Philmus et al., 2008). Recentemente, estudos mostraram que a variante microviridina J é tóxica para organismos zooplanctônicos do gênero *Daphnia*, enquanto outras variantes não apresentaram toxicidade (Rohrlack et al., 2004).

As microcistinas (figura 4) são peptídeos hepatotóxicos cuja estrutura geral é: ciclo-(-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-), onde X e Z são L aminoácidos variáveis e são caracterizadas pela presença do aminoácido Adda, uma molécula de 135 daltons (Carmichael, 1992). Devido à variabilidade na estrutura da microcistina, já foram encontradas mais de 70 variantes da molécula (Rinehart et al 1994). Sua toxicidade é causada pela inibição das enzimas fosfatases 1 e 2A (Mackintosh et al 1990).

As funções fisiológicas e ecológicas destes compostos ainda não foram esclarecidas, mas é conhecido que diferentes cepas de uma espécie podem ser ou não produtoras no que diz respeito a cada tipo de peptídeo e classe (Fastner et al., 2001; Rohrlack et al., 2001; Welker et al., 2004). O entendimento dos fatores que afetam a produção destes metabólitos secundários pode ajudar no entendimento de suas funções fisiológicas, de

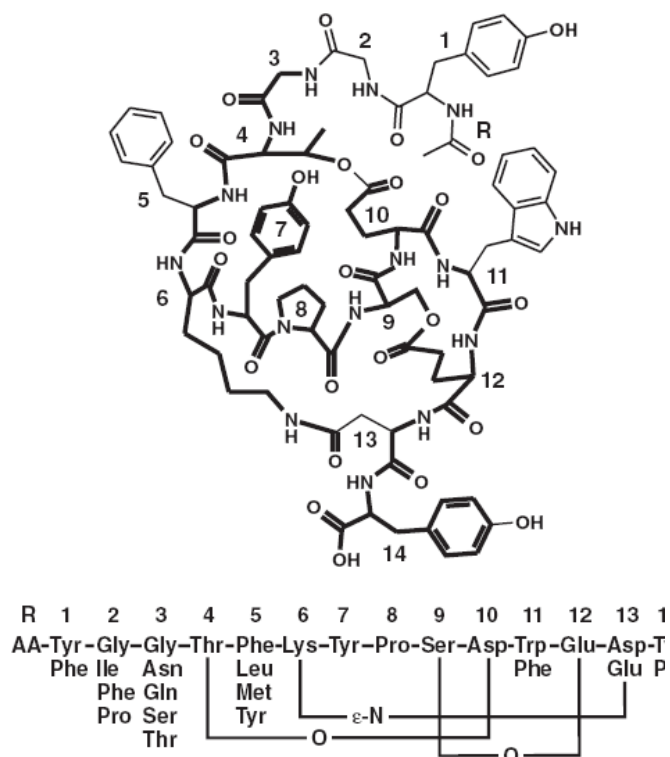


Figura 3 – Estrutura da microviridina A e esquema geral da estrutura das microviridinas. Fonte: Welker & von Döhren (2006).

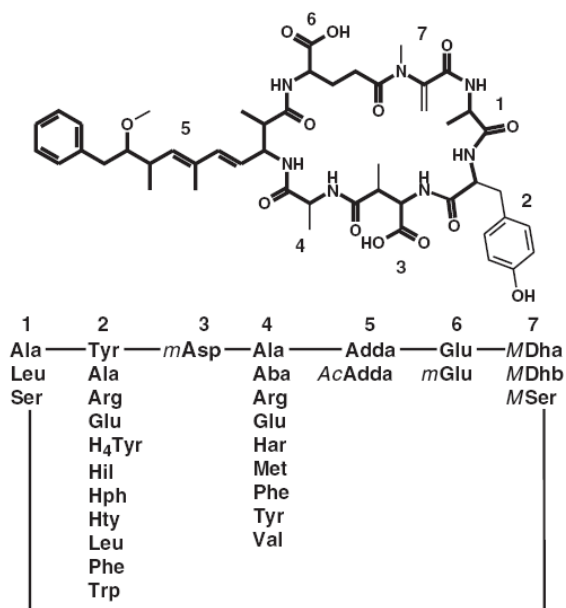


Figura 4 – Estrutura da microcistina-LA e esquema geral da estrutura das microcistinas. Fonte: Welker & von Döhren (2006).

suas relações com o meio ambiente e pode ser também uma importante ferramenta a ser usada no tratamento de água e na prevenção de produção de cianotoxinas.

Para observar se haveria alguma alteração na composição de peptídeos das cianobactérias, quando submetidas a variações de alguns fatores abióticos e bióticos, foram realizados experimentos de laboratório com três cepas previamente isoladas, *Microcystis panniformis*, *Planktothrix agardhii* e *Radiocystis fernandoii*. Os resultados obtidos e sua respectiva discussão estão apresentados em três capítulos, que foram assim organizados tendo em vista a publicação de artigos. Os detalhes da metodologia utilizada estão também organizados e apresentados em cada capítulo.

## **2. Objetivos**

### Objetivo geral

Avaliar a influência de fatores externos na concentração de peptídeos produzidos por diferentes cepas de cianobactérias.

### Objetivos específicos

1 – Testar a influência de três intensidades luminosas na concentração de microcistinas, cianopeptolinas e microviridinas em duas cepas da cianobactéria *Radiocystis fernandoii*.

2 – Avaliar a influência da concentração de ferro no perfil de peptídeos de uma cepa da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.

3 – Avaliar o efeito de dois diferentes extratos zooplanctônicos na concentração de microcistinas, cianopeptolinas e microviridinas em uma cepa de *Radiocystis fernandoii* e uma cepa de *Microcystis panniformis*.

### **Referências Bibliográficas**

Börner, T., Dittmann, E. 2005. Molecular Biology of cyanobacterial toxins: genetic basis of microcystin production. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (eds.), Harmful Cyanobacteria. Springer, Berlin, pp. 25-40.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. 72, 445-459.

Czarnecki, O., Lippert, I., Henning, M., Welker, M. 2006. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). Environ. Microbiol. 8, 77-87.

Fastner, J., Erhard, M., von Döhren, H. 2001. Determination of oligopeptides diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5069-5076.

Figueredo, C.C., Giani, A. 2001. Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton on a tropical reservoir. Hydrobiologia. 445, 165-174.

Finking, R., Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. Annu. Rev. Microbio. 58, 453-488.

Giani, A., Bird, D., Praire, Y., Lawrence J. 2005. Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Can. J. of Fish. and Aquat. Sci.* 62, 1-10.

Harada, K.I., Fujii, K., Shimada, T., Suzuki, M. 1995. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aqua* NRC, 525-17. *Tetrahedron Lett.* 36, 1511-1514.

Harrigan, G.G., Goetz, G. 2002. Symbiotic and dietary marine microalgae as a source of bioactive molecules – experience from natural products research. *J. Appl. Phycol.* 14, 103-108.

Ishitsuka, M.O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., Watanabe, M.M. 1990. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8180-8182.

Itou, Y., Ishida, K., Shin, S.J., Murakami, M. 1999. Oscillapeptins A to F, serine protease inhibitors from the three strains of *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron.* 55, 6871-6882.

Kobayashi, J., Sato, M., Ishibashi, M., Shigemori, H., Nakamura, T., Ohizumi, Y. 1991. Keramide A, a novel peptide from the Okinawan marine sponge *Theonella sp.* *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1,* 2601-2611.

Mackintosh, C, Beattie, K.A., Klump, S., Cohen, P., Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS. Letts.* 264, 187-192.

- Martin, C., Oberer, L., Ino, T., Konig, W.A., Busch, M., Weckesser, J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis sp.* PCC 7806. *J. Antibiot.* 46, 1550-1556.
- Pearl, H.W. 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia.* 35, 25-35.
- Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W.Y. Hemscheidt, T.K. 2008. Post-translational modifications in microviridin biosynthesis. *Chem. Biochem.* 9, 3066-3073.
- Reshef, V., Carmeli, S. 2002. Schizopeptin 791, a new anabaenopeptin-like cyclic peptide from the cyanobacterium *Schizothrix sp.* *J. Nat. Prod.* 65, 1187-1189.
- Rinehart, K.L., Namikoshi, M, Choi, B.W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6, 159-176.
- Rohrlack, T., Henning, M., Kohl, J.G. 2001. Isolation and characterization of colony-forming *Microcystis aeruginosa* strains. In: Chorus, I. (ed.), *Cyanotoxins – Occurrence, causes and consequences.* Springer, Berlin, pp. 152-158.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2004. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes lethal molting disruption in *Daphnia pulex*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5047-5050.
- Romo, S., Miracle, M.R. 1995. Diversity of phytoplankton assemblages of a polymictic hypertrophic lake. *Arch. hydrobiol.* 132, 363-384.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V., Marahiel, M.A. 1998. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of condensation domain. *J. Biol. Chem.* 273, 22773-22781.

von Döhren, H., Keller, U., Vater, J., Zocher, R. 1997. Multifunctional peptide synthetases. *Chem. Rev.* 97, 2675-2705.

Weber, T., Marahiel, M.A. 2001. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetase. *Structure.* 9, R3-R9.

Welker, M., Brunke, M., Preussel, K., Lippert, I., von Döhren, H. 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (cyanobacteria) oligopeptides chemotypes from natural communities studied by single mass spectrometry. *Microbiology.* 150, 1785-1796.

Welker, M., von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 530-563.

Williams, P.G., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., Paul, V.J. 2003. Tasipeptins A and B: new cytotoxic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Symploca sp.* *J. Nat. Prod.* 66, 620-624.

Whitton, B.A., Potts, M. 2000. Introduction to the cyanobacteria. In: Whitton, B.A., Potts, M. (eds), *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space.* Kluwer academic publishers, The Netherlands, pp. 1-10.

Zohary, T., Pais-Madeira, A.M., Robarts, R., Hambright, K.D. 1996. Interannual phytoplankton dynamics of a hypertrophic African lake. *Arch. Hydrobiol.* 136, 105-126.



### 3. Capítulo 1

## **Mudanças no padrão de peptídeos da cianobactéria *Radiocystis fernandoii* exposta a três diferentes intensidades luminosas**

Daniel A. Pereira<sup>1</sup> & Alessandra Giani<sup>1</sup>

1- Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, PO Box 486, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil

OBS: Artigo submetido para publicação no periodico “Harmful Algae”

### **Introdução**

Espécies de cianobactérias podem produzir diferentes tipos de peptídeos bioativos, como, aeruginosinas (Murakami et al., 1994), cianopeptolinas (Martin et al., 1993), microgininas (Okino et al., 1993), microviridinas (Ishitsuka et al., 1990), anabaenopeptinas (Harada et al., 1995) e microcistinas (Carmichael, 1992). Segundo o trabalho de Welker & von Döhren (2006), pelo menos 600 diferentes peptídeos já foram descritos. A alta variabilidade destes compostos pode ser explicada pelo seu processo de biosíntese, o qual consiste de complexos enzimáticos multifuncionais não ribossomais, NRPSs (non-ribossomal peptide synthetases) e PKS (polyketide synthase) (Börner & Dittmann, 2005; Welker & von Döhren, 2006).

As funções fisiológicas e ecológicas destes peptídeos ainda não são bem conhecidas. Alguns compostos podem inibir enzimas proteases de daphnias (Agrawal et al., 2001, 2005; Rohrlack et al., 2003; von Elert et al., 2004; Czarnecki et al., 2006), o que sugere proteção contra predação. Existem estudos que demonstram efeitos alelopáticos (Smith &

Doan, 1999; Pflugmacher, 2002; Schatz et al., 2005), quorum sensing bacteriano (Kaebernick et al., 2000) e uma possível relação com metabolismo interno (Lyck, 2004). Também é sabido que populações naturais de cianobactérias são compostas de linhagens produtoras e não produtoras, no que diz respeito a cada tipo de peptídeo e classe (Fastner et al., 2001; Rohrlack et al., 2001; Welker et al., 2004), e que, aparentemente, linhagens não produtoras não possuem desvantagens quando comparadas com linhagens produtoras (Hesse et al., 2001; Kaebernick et al., 2001).

Até hoje, vários estudos foram feitos considerando o efeito de luz, temperatura, fósforo e nitrogênio na produção de peptídeos cianobacterianos (Sivonen, 1990; Utkilen & Gjølme, 1995; Oh et al., 2000; Wiedner et al., 2003; Repka et al., 2004; Tonk et al., 2005; Rohrlack & Utkilen, 2006; Tonk et al., 2009). No entanto, a maioria destes estudos trabalharam apenas com microcistinas e nenhum trabalho foi realizado com espécies e linhagens tropicais.

Neste estudo, a influência da intensidade luminosa na produção de microcistinas, microviridinas e cianopeptolinas foi testada. Duas linhagens da espécie *Radiocystis fernandoii* (Komárek & Komárková-Legenerová, 1993), isoladas de dois reservatórios localizados na região sudeste do Brasil foram usadas nos experimentos. Esta espécie é bastante semelhante ao gênero *Microcystis* e geralmente forma florações em ambientes eutróficos (Vieira et al., 2003; Sant'Anna et al., 2004).

## Metodologia

### Linhagens

A linhagem 86 foi isolada do reservatório de Furnas, localizado na região sudeste do Brasil. Furnas é um grande reservatório que recebe um grande aporte de nutrientes através de atividades de agricultura e de esgoto doméstico. A linhagem 28 foi isolada da lagoa da pampulha, que é um reservatório urbano localizado na cidade de Belo Horizonte e sofre grande impacto através de esgotos domésticos e industriais. O reservatório da pampulha apresenta também uma floração permanente de cianobactérias.

### Experimentos

Os experimentos foram feitos em culturas do tipo batch, em 500ml de meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas. Os experimentos duraram dez dias e as intensidades luminosas usadas foram:  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $95 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As condições de crescimento foram:  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. No final de cada experimento o material foi liofilizado e utilizado nas análises bioquímicas.

### Análises de peptídeos

O material seco foi extraído três vezes com metanol 75% e purificado em colunas C18 SPE, seguindo a metodologia descrita por Lawton & Edwards (2001). Os extratos secos foram diluídos em metanol 75% e analisados em um HPLC (Waters Alliance 2695), com um detector de UV PDA (Waters 2996) em 225nm e uma coluna Waters Symmetry C18 (4,6 X 250mm I.D., 5 $\mu\text{m}$  ODS). A fase móvel A foi composta de acetonitrila com 0,1%

de ácido trifluorácetico (TFA) e B foi composta de água com 0,1% de ácido trifluorácetico (TFA). A análise foi feita utilizando um gradiente linear de 30% de A até 34% em 33,5 minutos e depois até 40% em 6,5 minutos. Devido a falta de padrões para a maioria dos compostos estudados, a quantificação foi feita dividindo a área de cada pico pela massa seca da cultura, o que permitiu mesurar mudanças relativas na concentração de cada composto. Para a identificar os peptídeos, os picos foram analisados e fragmentados em um espectômetro de massa MALDI-TOF (Bruker Autoflex III), e o padrão de fragmentação analisado de acordo com Welker et al. (2006).

#### Análises estatísticas

Testes de ANOVA foram usados para comparar as médias dos três tratamentos (alta média e baixa intensidade luminosa) e os pares foram comparados usando o teste de Tukey-Kramer. As análises foram feitas através do software JMP7.

### **Resultados**

Um total de 12 peptídeos foram identificados nas duas cepas estudadas (Tabela 1). Na linhagem 28 foram identificadas 5 microcistinas (Mc-RR, Mc-YR, dMc-YR, Mc-FR e Mc-WR), uma microviridina (Mv-1709) e uma cianopeptolina (Cy-1071). Na linhagem 86 foram encontradas uma microcistina (Mc-RR), duas microviridinas (Mv-1707 e 1739), duas cianopeptolinas (Cy-980 e Cy-1014) e um peptídeo não identificado (pep-7). A microcistina RR foi o único peptídeo produzido pelas duas cepas.

Considerando cada peptídeo separadamente, foi visto que na linhagem 28 a produção de Mc-YR, MC-FR e MC-WR foi maior em 25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , menor em 65  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e intermediária em 95  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A produção de Mc-RR foi intermediária em 25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , alta no tratamento de 65  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e menor em 95  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Tabela 1 – Peptídeos identificados nas duas cepas estudadas

(M+H)*	NOME	CEPA
1038.5	Microcistina-RR	28, 86
1045.5	Microcistina-YR	28
1031.5	[Asp <sup>3</sup> ]Microcistina-YR	28
1029.5	Microcistina-FR	28
1068.5	Microcistina-WR	28
1072.5	Cianopeptolina-1071	28
1015.5	Cianopeptolina-1014	86
981.5	Cianopeptolina-980	86
1707.7	Microviridina-1707	86
1709.6	Microviridina-1709	28
1739.7	Microviridina-1739	86
Desconhecida	Peptídeo-7	86

\*Massas (M+H) em daltons

A produção da Mv-1709 foi maior em 65  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e menor nos outros dois tratamentos. A produção da Cy-1071 e da dMc-YR não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados relacionados a linhagem 28 podem ser vistos na figura 1. Na linhagem 86, a produção da Mc-RR foi maior em 25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e menor nos outros dois tratamentos. A Mv-1739 e o peptídeo não identificado foram produzidos em maior quantidade no tratamento de 65  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e não foram identificados nos outros dois tratamentos. Os outros peptídeos produzidos pela linhagem

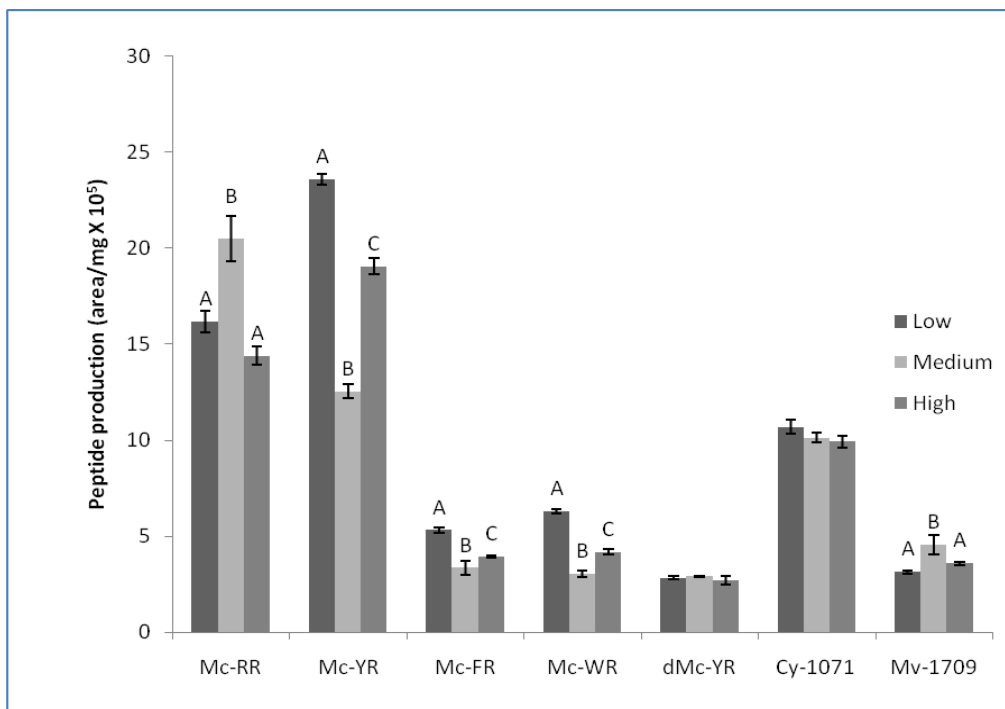


Figura 1 – Concentração de peptídeos encontrada na cepa 28 em três intensidades luminosas (baixa, média e alta). Letras A, B e C mostram diferenças significativas.  $P < 0,001$ , exceto para dMC-YR e Cy-1071. Legenda: Mc – microcistina; Cy – cianopeptolina; Mv – microviridina.

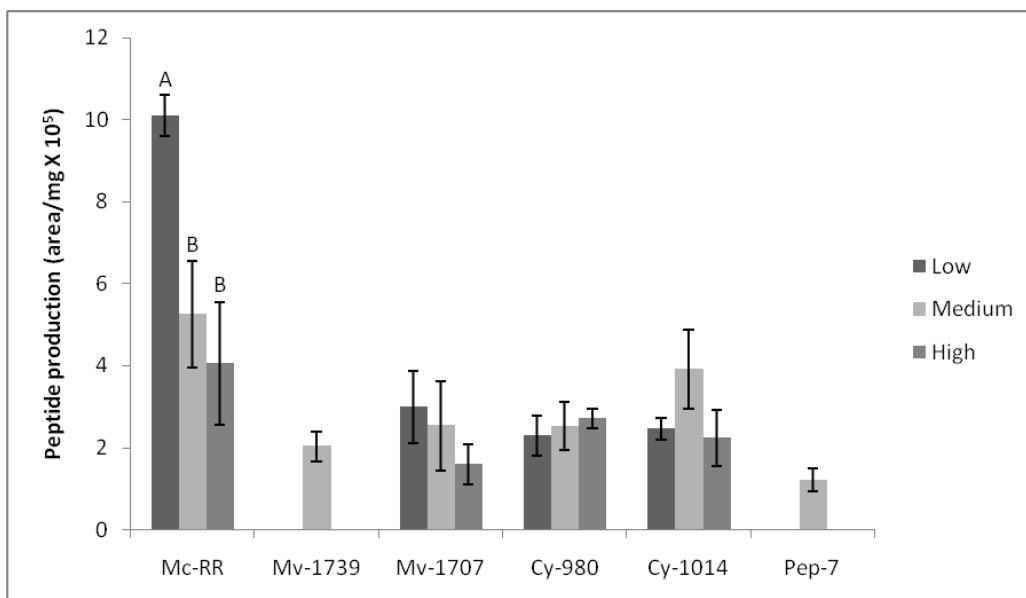


Figura 2 – Concentração de peptídeos encontrada na cepa 86 em três intensidades luminosas (baixa, média e alta). Letras A, B e C mostram diferenças significativas.  $P < 0,001$ , exceto para dMC-YR e Cy-1071. Legenda: Mc – microcistina; Cy – cianopeptolina; Mv – microviridina.

86 não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados relacionados a linhagem 28 podem ser vistos na figura 2.

Ao agrupar os peptídeos de acordo com suas classes, foi observado que na linhagem 28 a produção de total de microcistina foi maior em  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e menor nos outros dois tratamentos. Como a cepa 28 produz apenas uma cianopeptolina e uma microviridina, os resultados para estes peptídeos são idênticos aos resultados individuais. A cepa 86 não apresentou diferenças significativas na produção de cianopeptolinas e microviridinas, enquanto a única microcistina produzida por esta cepa foi encontrada em maior quantidade em baixas intensidades luminosas e em menor quantidade nos outros dois tratamentos. Os resultados relacionados as cepas 28 e 86 podem ser vistos nas figuras 3 e 4.

## **Discussão**

Todos os peptídeos foram detectados nos três diferentes cenários, com exceção da microviridina 1739 e do peptídeo não identificado, que foram identificados apenas na intensidade luminosa média ( $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Este resultado suporta hipótese de que as microcistinas são produzidas constitutivamente (revisado por Kardinaal & Viser 2005), pode ser um indicativo de que as cianopeptolinas também são produzidas constitutivamente e que as microviridinas não são. Considerando que as microviridinas são os maiores peptídeos cianobacterianos, todos os seus aminoácidos estão na configuração L e que a única unidade não proteinogênica é um ácido acético N-terminal, é possível que sua síntese seja ribossomal e que a estrutura seja finalizada por



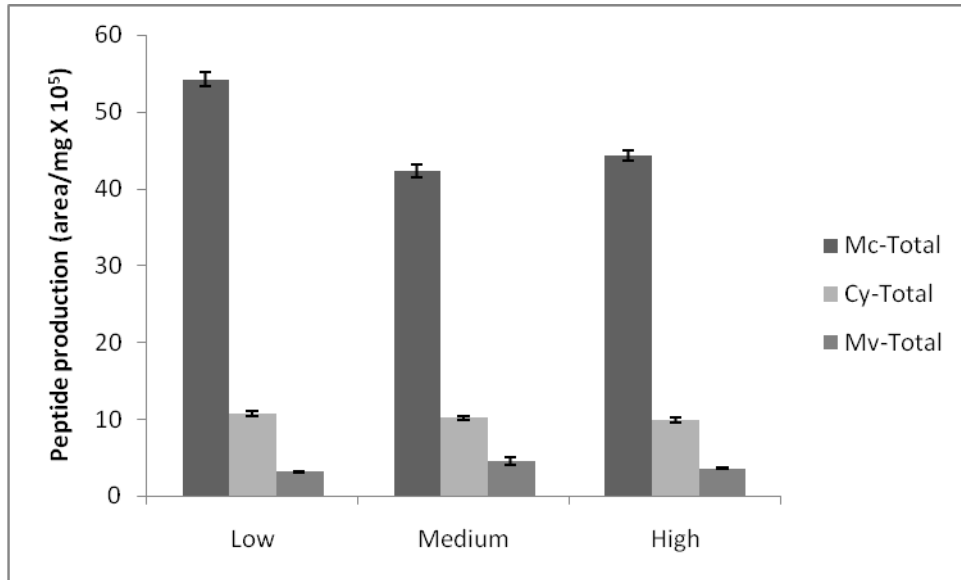


Figura 3 – Concentração de peptídeos encontrada na cepa 28 agrupados por classe em três intensidades luminosas (baixa, média e alta).  $P < 0,001$ , exceto para Cy-total. Legenda: Mc – microcistina; Cy – cianopeptolina; Mv – microviridina.

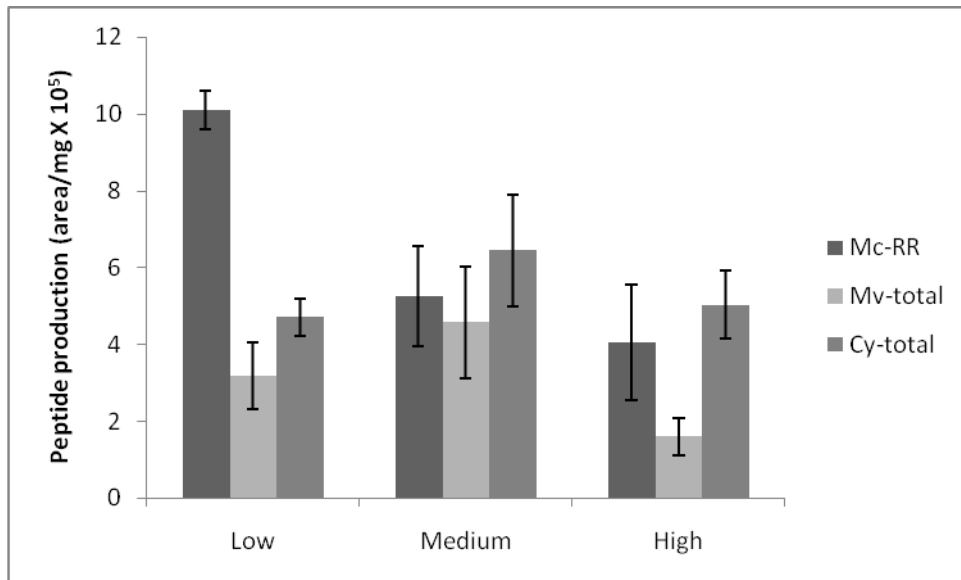


Figura 4 – Concentração de peptídeos encontrada na cepa 86 agrupados por classe em três intensidades luminosas (baixa, média e alta).  $P < 0,001$ , exceto para Cy-total e Mv-total. Legenda: Mc – microcistina; Cy – cianopeptolina; Mv – microviridina.

modificações feitas após a tradução, como já foi hipotetizado por Welker & von Döhren (2006), descrito por Philmus et al. (2008) e visto em outros peptídeos procariotos (Blond et al., 1999). Isto pode ser uma explicação para o diferente mecanismo de regulação visto nas microviridinas. Outra explicação pode estar relacionada ao limite de detecção do equipamento: a quantidade de microviridina 1739 pode ter ficado muito baixa para ser detectada pelo equipamento. Foi possível ver também que diferentes microviridinas são influenciadas de forma diferente por mudanças na intensidade luminosa, o que também pode estar relacionado a um mecanismo de síntese diferente.

Os resultados obtidos para as microcistinas mostraram que o conteúdo total destes peptídeos foi maior no tratamento com menor intensidade luminosa ( $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e que a quantidade diminui com o aumento da luminosidade. Os resultados foram os mesmos, tanto para a cepa 28, que produz 5 microcistinas, como para a cepa 86, que produz apenas uma microcistina. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram que a luz afeta a transcrição de genes do complexo *mcy* (Kaebernick et al, 2000) e que a quantidade de microcistina diminui com o aumento da intensidade luminosa (Wiedner et al., 2003; Tonk et al., 2009). Analisando apenas a cepa 28, foi possível perceber um mecanismo compensatório relacionado com a produção de microcistinas. O padrão de produção da microcistina RR foi diferente do encontrado para as microcistinas YR, FR e WR. Quando a intensidade luminosa passou de 25 para 60  $\mu\text{mol}$  a quantidade de microcistina RR aumentou significativamente enquanto a quantidade das outras três diminuiu significativamente e quando a intensidade luminosa passou de 60 para 95  $\mu\text{mol}$ , a quantidade de microcistina RR decresceu significativamente

enquanto as outras microcistinas aumentaram significativamente. Um mecanismo similar foi visto no trabalho de Tonk et al. (2005), onde foi observado um mecanismo compensatório em relação a luz e a produção de variantes demetiladas das microcistinas LR e RR. Explicações para este fenômeno podem estar relacionadas ao fato de que a luz pode afetar a estrutura conformacional dos complexos enzimáticos responsáveis pela síntese de microcistinas, o que poderia mudar a especificidade para o substrato e também ao fato de que a luz poderia afetar a disponibilidade de substrato, gerando mudanças na composição de microcistinas.

Não foram encontradas diferenças significativas na produção das três cianopeptolinas encontradas nos experimentos. Estes resultados podem indicar que estes metabólitos não são influenciados por mudanças na intensidade luminosa. De forma contrária, o trabalho de Tonk et al. (2009), mostrou que algumas cianopeptolinas podem ser influenciadas por diferentes intensidades de luz e, considerando os resultados obtidos com as microcistinas e microviridinas, é possível concluir que diferentes peptídeos de uma mesma classe podem ser influenciados de forma diferente por um único fator.

O uso do peso seco para padronizar a medição de peptídeos foi questionado por alguns autores, pois, mudanças em algum fator específico podem levar a mudanças na composição bioquímica da célula (Orr & Jones, 1998; Gjolme et al., 2009). Neste trabalho, foi decidido usar a medida de peso seco, já que, é uma medida que permite verificar as mudanças na produção de peptídeos em relação ao conteúdo total da célula, e como foi demonstrado por Kosol et al. (2009), é um parâmetro altamente correlacionado com biovolume celular.

Os resultados deste trabalho não corroboram a ideia de que melhores condições de crescimento resultam em maior produção de toxinas (Orr & Jones, 1998; Sivonen & Jones, 1999). Foi visto que, variações na intensidade luminosa podem, ao mesmo tempo, aumentar, diminuir ou não alterar a produção de diferentes compostos. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os encontrados por Tonk et al. (2009), que mostrou que a produção de alguns peptídeos pode ser maior em condições de crescimento piores. Os resultados encontrados por Kosol et al. (2009) também mostraram que o aumento ou redução na produção de microcistinas e anabaenopeptinas são independentes das taxas de crescimento. Os resultados deste trabalho também estão em desacordo com a ideia de que todos os peptídeos produzidos por uma determinada cepa são influenciados da mesma forma por um determinado fator (Rohrlack & Utkilen, 2007), como foi visto que, ao alterar a intensidade luminosa, a concentração de um determinado peptídeo pode aumentar enquanto a de outros pode diminuir ou não sofrer alterações. Os peptídeos cianobacterianos não parecem ser influenciados da mesma forma, ter funções similares ou ter a produção ligada a taxas de crescimento. Ao contrário, é possível supor que, disponibilidade de substrato e regulação gênica (Kaebernick et al, 2000) seriam os principais fatores controladores da produção de peptídeos em diferentes condições e que diferentes classes de peptídeos podem desempenhar diferentes funções. Os resultados deste trabalho mostram que, para entender as funções dos peptídeos cianobacterianos, seus mecanismos de regulação e a ecologia química de cianobactérias em geral, é necessário trabalhar com diferentes classes de peptídeos e também com diferentes peptídeos dentro de uma determinada classe.

## Referências Bibliográficas

Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N. 2001. Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in central India. *Hydrobiologia*. 464, 37-44.

Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N. 2005. Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 141, 33-41.

Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M.J., Barthélémy, M., Prigent, Y., Salomon, R.N., Moreno, F., Rebuffat, S. 1999. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem*. 259, 747-755.

Börner, T., Dittmann, E. 2005. Molecular Biology of cyanobacterial toxins: genetic basis of microcystin production. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer, Berlin, pp. 25-40.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol*. 72, 445-459.

Czarnecki, O., Lippert, I., Henning, M., Welker, M. 2006. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environ. Microbiol*. 8, 77-87.

Fastner, J., Erhard, M., von Döhren, H. 2001. Determination of oligopeptides diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5069-5076.

Gjolme, N., Utkilen, H., Rohrlack, T. 2009. Protein: a proposal for a standard parameter to express cyanobacterial biomass in laboratory experiments. Harmful Algae 8, 726-729.

Guillard, R.R., Lorenzen, C.J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. J. Phycol. 8, 10-14.

Harada, K.I., Fujii, K., Shimada, T., Suzuki, M. 1995. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aqua* NRC, 525-17. Tetrahedron lett. 36, 1511-1514.

Hesse, K., Dittmann, E., Börner, T. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. FEMS. Microbiol. Ecol. 37, 39-43.

Ishitsuka, M.O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., Watanabe, M.M. 1990. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. J. Am. Chem. Soc. 112, 8180-8182.

Kaebnick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E. 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3387-3392.

Kaebnick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., Neilan, B.A. 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environ. Microbiol.* 3, 669-679.

Kardinaal, W.E.A., Visser, P.M. 2005. Dynamics of cyanobacterial toxins: sources of variability in microcystin concentrations. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer, Berlin, pp. 41-63.

Komárek, J., Komárková-Legenerová, J. 1993. *Radiocystis fernandoii*, a new planktic cyanoprokariotic from tropical freshwater reservoirs. *Preslia.* 65, 355-357.

Kosol, S., Schmidt, J., Kurmayer, R. 2009. Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix spp.* *Eur. J. of Phycol.* 44, 49-62.

Lawton, L.A., Edwards, C. 2001. Purification of microcystins. *J. Chrom. A.* 912, 191-209.

Lyck, S. 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll A, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *J. Plankton Res.* 26, 727-736.

Martin, C., Oberer, L., Ino, T., Konig, W.A., Busch, M., Weckesser, J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis sp.* PCC 7806. *J. Antibiot.* 46, 1550-1556.

Murakami, M., Okita, Y., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K. 1994. Aeruginosin 298-A, A thrombin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). *Tetrahedron lett.* 35, 3129-3132.

Oh, H.M., Lee, S.J., Jang, M.H., Yoon, B.D. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 176-179.

Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M., Yamaguchi, K. 1993. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron lett.* 34, 501-504.

Orr, P.T., Jones, G.J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1604-1614.

Pflugmacher, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407-413.

Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W.Y. Hemscheidt, T.K. 2008. Post-translational modifications in microviridin biosynthesis. *Chem. Biochem.* 9, 3066-3073.

Repka, S., Koivula, M., Harjunpa, V., Rouhiainen, L., Sivonen, K. 2004. Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4551-4560.



Rohrlack, T., Henning, M., Kohl, J.G. 2001. Isolation and characterization of colony-forming *Microcystis aeruginosa* strains. In: Chorus, I. (ed.), Cyanotoxins – Occurrence, causes and consequences. Springer, Berlin, pp. 152-158.

Rohrlack, T., Christoffersen, K., Hansen, P.E., Zhang, W., Czarnecki, O., Henning, M., Fastner, J., Erhard, M., Neilan, B.A., Kaebernick, M. 2003. Isolation, characterization and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. J. Chem. Ecol. 29, 1757-1770.

Rohrlack, T., Utkilen, H. 2007. Effects of nutrient and light availability on production of bioactive anabaenopeptins and microviridin by the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. Hydrobiologia. 583, 231-240.

Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Senna, P.A.C., Komárek, J., Kormaková, J. 2004. Planktic cyanobacteria from Sao Paulo State, Brazil: Chroococcales. Revista Brasileira de Botanica. 27, 213-227.

Schatz, D., Keren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A., Kaplan, A. 2005. Ecological implications of the emergence of non toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. Environ. Microbiol. 7, 198-805.

Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2658-2666.

Sivonen, K., Jones, G.J. 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (eds.), Toxic cyanobacteria in water. E & FN Spon, London, pp. 41-111.

Smith, G.D., Doan, N.T. 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *J. Appl. Phycol.* 11, 337-344.

Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O.F.M., Wiedner, C., Mur, L.R., Huisman, J. 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes towards a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5177-5181.

Tonk, L., Welker, M., Huisman, J., Visser, P.M. 2009. Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. *Harmful Algae* 8, 219-224.

Utkilen, H., Gjolme, N. 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 797-800.

Vieira, J.M.S., Azevedo, M.T.P., Azevedo, S.M.F.O., Honda, R.Y., Corrêa, B. 2003. Microcystin production by *Radiocystis fernandoii* (Chroococales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. *Toxicon.* 42, 709-713.

Von Elert, E., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U., Zitt, A. 2004. Protease activity in gut of *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137, 287-296.

Welker, M., Brunke, M., Preussel, K., Lippert, I., von Döhren, H. 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (cyanobacteria) oligopeptides chemotypes from natural communities studied by single mass spectrometry. *Microbiology.* 150, 1785-1796.

Welker, M., von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 530-563.

Welker, M., Marsálek, B., Sejhonová, L., von Döhren, H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward and understanding of metabolic diversity. *Peptides.* 27, 2090-2103.

Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Mur, L.R. 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1475-1481.

## 4. Capítulo 2

**Perfis de anabaenopeptinas e microcistinas na cianobactéria *Planktothrix agardhii* crescendo em condições de limitação ou não de ferro**

Daniel A. Pereira<sup>1</sup>, Alessandra Giani<sup>1</sup> & David Bird<sup>2</sup>

1- Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, PO Box 486, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil

2- Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, PO Box 8888, Stn. Centre - Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3P8

OBS: Artigo em preparação

**Introdução**

Cianobactérias podem produzir diversos tipos de metabólitos secundários, como as anabaenopeptinas (Harada et al., 1995), as hepatotóxicas microcistinas (Carmichael, 1992) e outros (para uma revisão completa ver Welker & von Döhren, 2006). A maioria destes compostos são sintetizados por complexos enzimáticos não ribossomais, NRPSs (non-ribosomal peptide synthetases) e PKS (polyketide synthase), o que explica, em parte, a grande variedade de substâncias produzidas (Börner & Dittmann, 2005; Welker & von Döhren, 2006). As funções destes compostos ainda não foram totalmente esclarecidas. Alguns estudos mostraram relações com proteção contra predação (Agrawal et al., 2001, 2005; Rohrlack et al., 2003; von Elert et al., 2004; Czarnecki et al., 2006), alelopatia (Smith & Doan, 1999; Pflugmacher, 2002; Schatz et al., 2005), *quorum sensing* (Kaebernick et al., 2000) e metabolismo interno (Lyck, 2004).

O papel de fatores externos na regulação da produção destes peptídeos ainda não está claro, mas é necessário para o entendimento de suas funções ecológicas e fisiológicas. Alguns experimentos já foram feitos testando os efeitos de luz, temperatura, nitrogênio e fósforo (Sivonen, 1990; Utkilen & Gjolme, 1995; Oh et al., 2000; Wiedner et al., 2003; Repka et al., 2004; Tonk et al., 2005; Rohrlack & Utkilen, 2006; Tonk et al., 2009). No entanto, muitos resultados são contraditórios, o que pode ter ocorrido devido a diferentes metodologias utilizadas e também ao fato de que grande parte dos trabalhos feitos até hoje estudou apenas um grupo de peptídeos (geralmente microcistinas) e não todo o espectro de peptídeos produzidos pelas cepas analisadas. Com relação as pesquisas que avaliaram o efeito da concentração de ferro, algumas consideraram apenas as microcistinas (Lukac & Aegerter, 1993; Utkilen & Gjolme, 1995; Lick et al., 1996; Sevilla et al., 2008), mostrando frequentemente resultados contraditórios.

O ferro é um dos elementos mais abundantes da Terra, porém, em vários casos não está disponível em sua forma solúvel, se tornando uma fonte de stress em diversos ambientes (Lewin, 1984). Em ambientes marinhos a limitação de ferro é responsável pela baixa produtividade e abundância do fitoplâncton em regiões de alta concentração de nutrientes e baixa clorofila (Frost, 1996; Boyd et al, 2000; 2004). Em ambientes de água doce o ferro pode também ser um fator limitante em situações específicas (Twiss et al., 2000). As espécies de cianobactérias possuem sofisticados mecanismos para regular a captação e incorporação de ferro (Strauss, 1994). Devido ao fato de que o ferro pode catalisar a formação de compostos reativos de oxigênio através da reação de fenton (Halliwell & Gutteridge, 1984), a presença de ferro na célula deve ser muito bem regulada. Um dos fatores que regula o metabolismo do ferro através de ligação a regiões do DNA é a

proteína FUR (Ferric uptake regulator) (Bagg & Neilands, 1987). Crosa & Walsh (2002) mostraram que a FUR regula algumas sintetases de peptídeos relacionadas com a síntese de sideroforos peptídicos, os quais são quelantes de ferro, isolados pela primeira vez em uma cianobactéria por Armstrong & van Baalen (1979). Estas sintetases são semelhantes aos complexos enzimáticos responsáveis pela síntese de metabólitos secundários em cianobactérias. Wilhelm & Trick (1994), mostraram que a produção de sideroforos é estimulada pela deficiência em ferro e o trabalho de Martin-Luna (2006), demonstrou que a proteína FUR pode se ligar a região promotora do operon da microcistina em uma cepa de *Microcystis aeruginosa*. Considerando estes resultados, é possível que a concentração de ferro tenha alguma influência no perfil de metabólitos secundários em cianobactérias.

Neste trabalho, a influência da limitação por ferro na concentração de anabaenoptinas e microcistinas foi testada. Para a realização dos experimentos foi utilizada uma cepa da cianobactéria *Planktothrix agardhii*, isolada do lago Vert, localizado na província de Quebec, Canadá. Esta espécie geralmente forma blooms em lagos temperados eutróficos e está associada à produção de toxinas.

## **Metodologia**

### Experimentos

Os experimentos foram feitos em culturas do tipo batch, em 500ml de meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas. Os experimentos duraram oito dias e foram feitos em duas condições: controle, com meio WC completo e uma condição limitante, onde foi utilizado meio WC sem ferro. Para

garantir que a cepa estivesse limitada por ferro, a cianobactéria cresceu na ausência de ferro por cinco dias antes do início dos experimentos. As condições de crescimento foram: 20°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e 60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa. No primeiro e último dias de experimento, 10ml de cada cultura foram retirados para análise da concentração de ferro e 2ml retirados para contagem de células.

#### Análise de ferro

A concentração de ferro total dissolvido foi medida utilizando um equipamento de absorção atômica, equipado com um forno de grafite (modelos 906AA e GF3000 com um PAL auto-sampler, todos da GBC Scientific Equipment USA). As medidas foram feitas à 248,3 nm.

#### Análise de peptídeos

O material seco foi extraído com metanol 75% três vezes e posteriormente, purificado com cartuchos C18 SPE, de acordo com Lawton e Edwards (2001). Os extratos foram diluídos em metanol 100% e analisados em um HPLC (Agilent technologies 1200 series) acoplado com um espectrômetro de massa (Agilent technologies 6210 triple quad ms). A coluna usada foi uma Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 X 50mm I.D., 1,8 $\mu\text{m}$  ODS), a fase móvel usada foi: A, água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e B, metanol com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. A análise cromatográfica foi feita em um gradiente linear, começando com 50% de B e chegando a 100% em 12 minutos com um fluxo de 0,4ml por minuto. A quantificação foi feita utilizando a área do pico dividida pelo peso seco da cultura, o que possibilitou uma medição relativa das mudanças na concentração de peptídeos. O



peptídeos foram identificados através de seu padrão de fragmentação (Erhard et al., 1999; Welker et al., 2006), a voltagem utilizada na fragmentação variou de 45 a 70 volts dependendo do peptídeo (Tabela 1).

#### Analises estatísticas

Testes T foram usados para comparar as médias dos dois tratamentos (limitante e não limitante). As análises foram feitas através do software JMP versao 7.

### Resultados

Quatro peptídeos foram identificados na cepa estudada (Tabela 1), uma anabaenopeptina B (Anab B) e três microcistinas, microcistina-LR (Mc-LR), [ASP<sup>3</sup>]microcistina-LR (dMc-LR) e microcistina-YR (Mc-YR). Foi possível observar que a cepa estudada produzia outros compostos, mas em quantidades muito baixas para uma correta identificação e quantificação.

Tabela 1 – Peptídeos encontrados na cepa de *Planktothrix agardhii*

M+H	Nome	Voltagem de fragmentação	Ion característico - M+H
1045.6	Microcistina-YR	70	135
995.6	Microcistina-LR	65	135
981.6	[ASP <sup>3</sup> ]Microcistina-LR	70	135
837.5	Anabaenopeptina B	45	70, 84, 201
Massas (M+H) em Daltons			

A concentração de ferro medida no grupo controle foi de 226,29 µg/L (+4,02) no primeiro dia de experimento e de 9,71 µg/L (+8,5) no último dia de experimento. No grupo limitante a concentração foi de 0,947 µg/L (+0,83) no primeiro dia de experimento e de 0 µg/L no último dia. Os resultados podem ser vistos na figura 1.

A quantidade de microcistina medida nas condições limitantes foi significativamente ( $P < 0,001$ ) menor do que no tratamento controle (considerando cada microcistina separadamente e todas juntas). De forma oposta, a quantidade de anabaenopeptina B foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) nas condições limitantes. Os resultados podem ser vistos na figura 2 e os valores exatos com os desvios padrões na tabela 2.

Tabela 2 –Concentração de peptídeos encontrada na cepa de *Planktothrix agardhii* em duas concentrações de ferro

Peptídeo	Limitante	Não-limitante
Microcistina-YR	469,8 (52,0)	2791,8 (129,2)
Microcistina-LR	9,1 (3,9)	40,7 (4,9)
[ASP3]Microcistina-LR	342,2 (20,6)	1291,0 (67,3)
Anabaenopeptina B	4203,6 (77,0)	2749,8 (203,3)

Quantidades dadas em area do pico/mg X 10<sup>3</sup>. Todas as diferenças entre os tratamentos foram significativas, P<0,001.

## Discussão

Os resultados das análises de ferro mostram claramente que as culturas estavam limitadas pela quantidade de ferro. Apesar de haver uma pequena concentração de ferro no começo

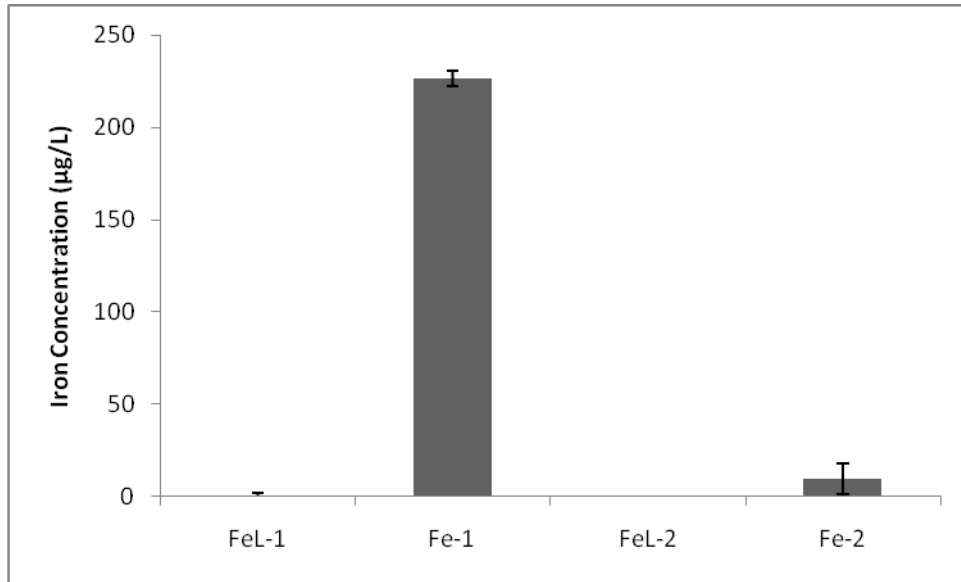


Figura 1 – Concentração de ferro medida no primeiro e último dia do experimento. FeL-1 e FeL-2 são referentes à condição limitante no primeiro e último dia respectivamente. Fe-1 e Fe-2 são referentes à condição não limitante no primeiro e último dia respectivamente.

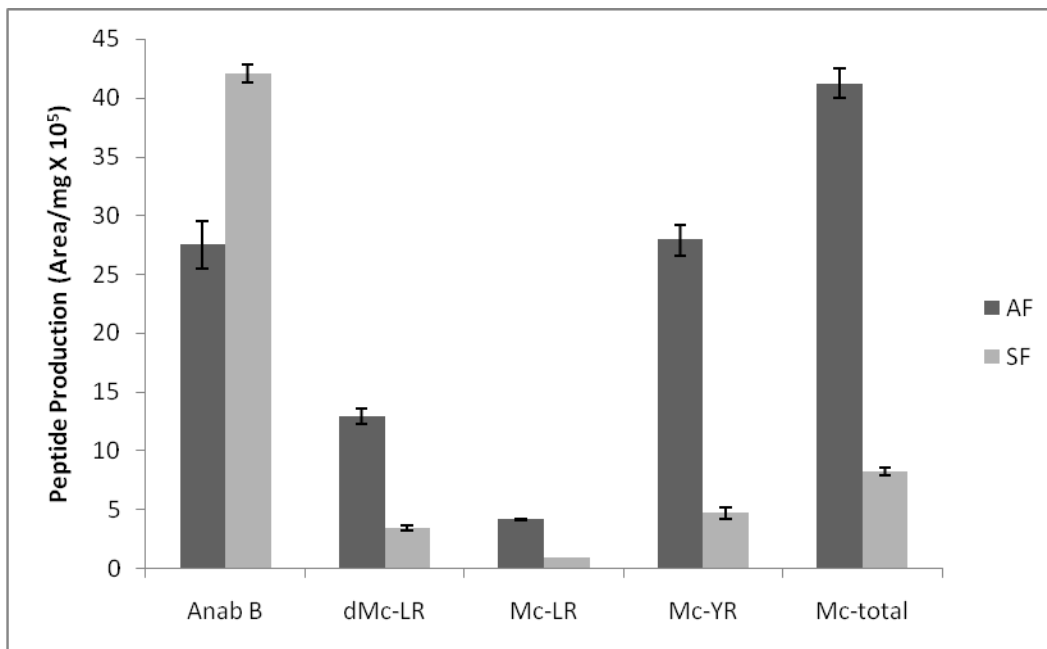


Figura 2 – Concentrações de peptídeos encontrada na cepa de *Planktothrix agardhii* em condições limitantes (SF) e não limitantes (AF).  $P < 0,001$  para todos os peptídeos testados.

do experimento, é possível ver que não havia ferro no último dia. As culturas do grupo controle não estavam limitadas, pois, uma considerável quantidade ferro pode ser medida ainda no último dia do experimento.

Um padrão interessante foi encontrado no experimento, ao ver dois tipos de metabolitos secundários reagirem de forma oposta à limitação por ferro. A concentração das microcistinas diminuiu enquanto a das anabaenoptinas aumentou no tratamento limitante. Uma explicação para este fenômeno pode estar relacionada à proteína FUR (Bagg & Neilands, 1987). Sabe-se que a proteína FUR pode regular positivamente e negativamente a produção de vários compostos relacionados a respostas anti-oxidantes, aquisição, armazenagem e metabolismo de ferro (Niederhoffer et al., 1990; Quail et al., 1996; Dubrac & Touati, 2000). Ela pode também regular a produção de fatores de virulência em bactérias, os quais não estão relacionados diretamente com o metabolismo do ferro, como foi visto em *Vibrio cholera* (Mey et al., 2005). Em cianobactérias foi visto que a FUR regula genes de stress por ferro em *Synechococcus* (Ghassemian & Straus, 1996) e que a proteína FUR pode se ligar *in vitro* à região promotora do operon da microcistina (Martin-Luna et al., 2006). É possível que a FUR iniba e/ou estimule o operon das microcistinas e anabaenopeptinas.

Experimentos anteriores foram feitos considerando o efeito da limitação por ferro apenas na concentração de microcistinas (Lukac & Agerter, 1993; Utkilen & Gjølme, 1995; Lyck et al., 1996; Sevilla et al 2008) e apresentaram resultados controversos. Um dos motivos para tais resultados pode estar relacionado às diferentes maneiras utilizadas para expressar a concentração de microcistina: por número de células, peso seco, conteúdo de

proteína e outras formas. Neste trabalho foi decidido pela utilização de peso seco devido ao fato de que é uma forma de medição altamente correlacionada ao biovolume (Kosol et al., 2009). Adicionalmente, estes estudos consideram apenas as microcistinas, e não, todo o espectro de peptídeos não ribossomais, dos quais as microcistinas são apenas uma parte. Devido a limitações técnicas é difícil trabalhar com todo o espectro de peptídeos produzido por uma cepa de cianobactéria, no entanto, para se entender as relações entre fatores ambientais e sua influência na produção de microcistinas e outros metabólitos, é preciso considerar os principais peptídeos produzidos pelas espécies e cepas estudadas.

Os resultados encontrados neste trabalho não estão de acordo com a ideia de que todos os peptídeos são influenciados da mesma forma (Rohrlack & Utkilen, 2007) e de que suas concentrações são maiores quando as condições de crescimento são melhores (Sivonen & Jones, 1999), pois foi visto que em condições de limitação por ferro a concentração das microcistinas diminuiu ao mesmo tempo em que a concentração de anabaenopaptina aumentou significativamente. Este tipo de resposta também foi visto no trabalho de Tonk et al. (2009), que mostrou a influência de temperatura, luz e fósforo na produção de microcistinas, anabaenopeptinas e cianopeptolinas e no trabalho de Kosol et al. (2009), o qual não encontrou relações entre taxas de crescimento e produção de microcistinas e anabaenopeptinas em diferentes cepas de *Planktothrix* spp. Este trabalho mostra a importância de estudar diferentes grupos de peptídeos ao tentar entender as relações entre fatores ambientais e a produção de metabólitos secundários em cianobactérias, como foi visto que estes compostos podem ser influenciados de maneira diferente e que, como descrito por alguns autores (Fastner et al., 2001; Welker et al., 2004; 2006), uma cepa de cianobactérias geralmente produz diversos tipos de peptídeos.

## Referências Bibliográficas

Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N. 2001. Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in central India. *Hydrobiologia*. 464, 37-44.

Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N. 2005. Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 141, 33-41.

Armstrong, J., van Baalen, E. 1979. Iron transport in microalgae: the isolation and biological activity of a hydroxamate siderophore from the blue-green alga *Agmenellum quadruplicatum*. *J. Gen. Microbiol.* 111, 253-262.

Bagg, A., Neilands, J.B. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 26, 5471-5477.

Börner, T., Dittmann, E. 2005. Molecular Biology of cyanobacterial toxins: genetic basis of microcystin production. In J. Huismam, H.C.P. Matthijs and, P.M. Visser, (ed.), *Harmful Cyanobacteria*, Springer, Berlin. Pp. 25-40.

Boyd, B.W., Watson, A.J., Law, C.S., Abraham, E.R., Trull, T., Murdoch, R., Bakker, D.C., Bowie, A.R., Buesseler, K.O., Chang, H., Charette, M., Croot, P., Downing, K., Frew, R., Gall, R., Hadfield, M., Hall, J., Harvey, M., Jameson, G., LaRoche, J.,

Liddicoat, M., Ling, R., Maldonado, M.T., McKay, R.M., Nodder, S., Pickmere, S., Pridmore, R., Rintoul, S., Safi, K., Sutton, P., Strzpek, R., Tannebeger, K., Turner, S., Waite, A., Zeldis, J. 2000. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar southern ocean stimulated by iron fertilization. *Nature*. 407, 695-702.

Boyd, B.W., Law, C.S., Wong, C.S., Nojiri, Y., Tsuda, A., Levasseur, M., Takeda, S., Rivkin, R., Harrison, P.J., Strzpek, R., Gower, J., McKay, M., Abraham, E., Arychuk, M., Barwell-Clarke, J., Crawford, W., Crawford, D., Hale, M., Harada, K., Johnson, K., Kiyosawa, H., Kudo, I., Marchetti, A., Miller, W., Needoba, J., Nishioka, J., Ogawa, H., Page, J., Robert, M., Saito, H., Sastri, A., Sherri, N., Soutar, T., Sutherland, N., Taira, Y., Whitney, F., Wong S.K., Yoshimura, T. 2004. The decline and fate of an iron-induced subarctic phytoplankton bloom. *Nature*. 428, 549-553.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445-459.

Crosa, J.H. Walsh, C.T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Rev.* 66, 223-249.

Czarnecki, O., Lippert, I., Henning, M., Welker, M. 2006. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environ. Microbiol.* 8, 77-87.

Dubrac, S., Touati, T. 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J. Bacteriol.* 182, 3802-3808.

Erhard, M., von Döhren, H., Jungblut, P.R. 1999. Rapid identification of the new anabaenoprtin G from *Plantothrix agardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 337-343.

Fastner, J., Erhard, M., von Döhren, H. 2001. Determination of oligopeptides diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5069-5076.

Frost, B.W. 1996. Phytoplankton bloom on iron rations. Nature. 383, 475-476.

Ghassemian, M., Straus, N.A. 1996. Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *synechococcus* sp. strain PCC7942. Microbiology 142, 1469-1476.

Guillard, R.R., Lorenzen, C.J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. J. Phycol. 8, 10-14.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219, 1-14.

Harada, K.I., Fujii, K., Shimada, T., Suzuki, M. 1995. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aqua* NRC, 525-17. Tetrahedron lett. 36, 1511-1514.



- Ishitsuka, M.O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., Watanabe, M.M. 1990. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. J. Am. Chem. Soc. 112, 8180-8182.
- Kaebnick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., Neilan, B.A. 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. Environ. Microbiol. 3, 669-679.
- Kosol, S., Schmidt, J., Kurmayer, R. 2009. Variation on peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix spp.* Eur. J. of Phycol. 44, 49-62.
- Lawton, L.A., Edwards, C. 2001. Purification of microcystins. J. Chrom. A. 912, 191-209.
- Lewin, R. 1984. How microorganisms transport iron. Science. 225, 401-402.
- Lukac, M., Aegerter, R. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. 31, 293-305.
- Lyck, S., Gjolme, N., Utkilen, H. 1996. Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). Phycologia. 35, 120-124.
- Lyck, S. 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll A, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. J. Plankton Res. 26, 727-736.

- Martin, C., Oberer, L., Ino, T., Konig, W.A., Busch, M., Weckesser, J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. *J. Antibiot.* 46, 1550-1556.
- Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J.A., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. 2006. Fur from *Microcystis aeruginosa* binds *in vitro* promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry.* 67, 876-881.
- Mey, A.R., Wyckoff, E.E., Kanukurthy, V., Fisher, C.R., Payne, S.M. 2005. Iron and fur regulation in *Vibrio cholera* and the role of fur in virulence. *Infect. Immun.* 73, 8167-8178.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., Fee, J.A. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* 172, 1930-1938.
- Oh, H.M., Lee, S.J., Jang, M.H., Yoon, B.D. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 176-179.
- Pflugmacher, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407-413.
- Quail, M.A., Jordan, P., Grogan, P.M., Butt, J.N., Lutz, M., Thomson, A.J., Andrews, S.C., Guest, J.R. 1996. Spectroscopic and voltammetric characterization of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 635-642.

Repka, S., Koivula, M., Harjunpa, V., Rouhiainen, L., Sivonen, K. 2004. Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4551-4560.

Rohrlack, T., Christoffersen, K., Hansen, P.E., Zhang, W., Czarnecki, O., Henning, M., Fastner, J., Erhard, M., Neilan, B.A., Kaebernick, M. 2003. Isolation, characterization and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1757-1770.

Rohrlack, T., Utkilen, H. 2007. Effects of nutrient and light availability on production of bioactive anabaenopeptins and microviridin by the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Hidrobiologia.* 583, 231-240.

Schatz, D., Keren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A., Kaplan, A. 2005. Ecological implications of the emergence of non toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environ. Microbiol.* 7, 198-805.

Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. 2008. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ. Microbiol.* 10, 2476-2483.

Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2658-2666.

Sivonen, K., Jones, G.J. 1999. Cyanobacterial toxins. In I. Chorus, and J. Bartram (ed.), Toxic cyanobacteria in water, E & FN Spoon, London.

Smith, G.D., Doan, N.T., 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. J. Appl. Phycol. 11, 337-344.

Strauss, N. 1994. Iron deprivation: Physiology and gene regulation. Dordrecht, Netherlands: Kluwer academic publishers group.

Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O.F.M., Wiedner, C., Mur, L.R., Huisman, J. 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes towards a more toxic variant with increasing light intensity. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5177-5181.

Tonk, L., Welker, M., Huisman, J., Visser, P.M. 2009. Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. Harmful Algae. 8, 219-224.

Twiss, M.R., Auclair, J.C., Charlton, M.N. 2000. An investigation into iron stimulated phytoplankton productivity in epipelagic lake Eric during thermal stratification using trace metal clean techniques. Fish. Aquat. Sci. 57, 86-95.

Utkilen, H., Gjolme, N. 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 797-800.

Von Elert, E., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U., Zitt, A. 2004. Protease activity in gut of *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137, 287-296.

Welker, M., Brunke, M., Preussel, K., Lippert, I., von Döhren, H. 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (cyanobacteria) oligopeptides chemotypes from natural communities studied by single mass spectrometry. *Microbiology.* 150, 1785-1796.

Welker, M., von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 530-563.

Welker, M., Marsálek, B., Sejhonová, L., von Döhren, H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward and understanding of metabolic diversity. *Peptides.* 27, 2090-2103.

Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Mur, L.R. 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1475-1481.

Wilhelm, S.W., Trick, C.G. 1994. Iron limited growth of cyanobacteria: Multiple siderophore production is a common response. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1974-1984.

## 5. Capítulo 3

## **Influência de extratos zooplânctônicos no perfil de peptídeos de duas espécies de cianobactérias**

Daniel A. Pereira<sup>1</sup> & Alessandra Giani<sup>1</sup>

1- Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, PO Box 486, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil

OBS: Artigo em preparação

### **Introdução**

Estudos feitos na década de 1980 demonstraram que cianobactérias podem produzir compostos tóxicos ou inibitórios para organismos zooplânctônicos (Lampert, 1981; Fulton & Pearl, 1987; Benndorf & Henning, 1989), no entanto, pouco se sabia sobre a natureza destes compostos. Após os primeiros trabalhos, estudos foram feitos, considerando organismos chave em ambientes aquáticos, como *Daphnia*, e estudando aspectos específicos como o efeito em história de vida (Reinikainen et al., 1994), comportamento (Haney et al., 1995), resistência a toxina (Hairston et al., 2001) e bioquímica (DeMott & Dhawale, 1995). Outros estudos mostraram que a composição bioquímica do alimento é um fator chave para a nutrição de organismos zooplânctônicos (Giani, 1991, Sterner, 1993, Boersma et al. 2001), e questões relacionadas ao fato de algumas espécies de cianobactérias serem capazes de persistir em ambientes com alta densidade de zooplâncton herbívoro foram levantadas (DeMott & Moxter, 2001; Hairston et al., 2001). O sucesso das cianobactérias no ambiente foi atribuído à: sua baixa qualidade nutricional e estequiometria desfavorável para os predadores (Schmit & Jonasdottir, 1997; DeMott et al., 1998; von Elert et al., 2002), bem como, produção de

compostos tóxicos e inibidores de proteases (Rohrlack et al., 1999, 2004; Agrawal et al., 2001; Blom et al., 2003; Czarnecki et al., 2006)

Atualmente, sabe-se que as cianobactérias podem produzir diversos metabólitos secundários de natureza peptídica, como aeruginosinas (Murakami et al., 1994), cianopeptolinas (Martin et al., 1993), microgininas (Okino et al., 1993), microviridinas (Ishitsuka et al., 1990), anabaenopeptinas (Harada et al., 1995) e microcistinas (Carmichael, 1992). Recentemente, uma revisão feita por Welker & von Döhren (2006), mostrou que mais de 600 peptídeos já foram descritos. Pouco se sabe sobre as funções primárias destes compostos, existem hipóteses relacionadas à alelopatia (Smith & Doan, 1999; Pflugmacher, 2002; Schatz et al., 2005), *quorum sensing* (Kaebernick et al., 2000), metabolismo interno (Lyck, 2004) e também proteção contra predação (Agrawal et al., 2001, 2005; Rohrlack et al., 2003; von Elert et al., 2004; Czarnecki et al., 2006), porém, algumas destas funções podem ser apenas secundárias.

Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de dois tipos de extratos feitos a partir de material zooplânctônico no perfil peptídico de duas espécies de cianobactérias, sendo uma *Radiocystis fernandoii* e uma *Microcystis panniformis*, duas espécies comumente encontradas em ambientes tropicais (Sant'Anna et al., 2004). Ambas foram isoladas de Furnas, um grande reservatório localizado na região sudeste do Brasil que recebe aporte de nutrientes provenientes de esgoto doméstico e atividades de agricultura.



## Metodologia

### Coleta e preparação do material zooplânctonico

O material zooplânctonico foi coletado na lagoa da Pampulha, um reservatório localizado no ambiente urbano do município de Belo Horizonte, que sofre um grande impacto proveniente de esgotos domésticos e industriais e apresenta uma floração quase constante de cianobactérias. Os organismos foram coletados com o auxílio de uma rede de plâncton de 60µm. Após a coleta o material foi concentrado diversas vezes e posteriormente liofilizado, sendo que no final foi obtida uma massa seca de organismos zooplanctonicos. O extratos de zooplâncton foram feitos utilizando água ou metanol 75% como solvente extrator. Para cada 10mg de material seco foram adicionadas 1,5ml de solvente, seguido de sonicação por 1 minuto e centrifugação por 10 minutos a 12000 RPM, após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e o procedimento repetido 3 vezes para maximizar a extração. O sobrenadante foi seco em centrifuga speed-vac e posteriormente ressuspendido em um volume conhecido de água para ser usado nos experimentos.

### Experimentos

Os experimentos foram feitos com as cepas de cianobacterias *Radiocystis fernandoii* (R28) e *Microcystis panniformis* (M6), do Laboratorio de Ficologia da UFMG. As cepas cresceram em culturas do tipo batch, em 500ml de meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972) e consistiam de três grupos: controle (Z0), extrato de água (Z1) e extrato de metanol (Z2), todos feitos em triplicatas. No início dos experimentos foi adicionado 1ml de extrato em cada frasco, volume correspondente a cerca de 3,3mg de material zooplanctonico seco. Os experimentos duraram dez dias e as condições de crescimento

foram: 20°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e 65  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa. No final de cada experimento as culturas das duas cepas de cianobacterias foram liofilizadas e utilizadas nas análises bioquímicas.

#### Análises de peptídeos

O material liofilizado, proveniente das culturas de cianobacterias, foi extraído três vezes com metanol 75% e purificado em colunas C18 SPE, seguindo a metodologia descrita por Lawton & Edwards (2001). Os extratos secos foram diluídos em metanol 75% e analisados em um HPLC (Waters Alliance 2695), com um detector de UV PDA (Waters 2996) em 225nm e uma coluna Waters Symmetry C18 (4,6 X 250mm I.D., 5 $\mu\text{m}$  ODS). A fase móvel A foi composta de acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e B foi composta de água com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). A análise foi feita utilizando um gradiente linear de 30% de A até 34% em 33,5 minutos e depois até 40% em 6,5 minutos. Devido a falta de padrões para a maioria dos compostos estudados, a quantificação foi feita dividindo a área de cada pico pela massa seca da cultura, o que permitiu mesurar mudanças relativas na concentração de cada composto. Para a identificar os peptídeos, os picos foram analisados e fragmentados em um espectrômetro de massa MALDI-TOF (Bruker Autoflex III), e o padrão de fragmentação analisado de acordo com Welker et al. (2006).

#### Análises estatísticas

Testes de ANOVA foram usados para comparar as médias dos três tratamentos (controle, extrato de água e extrato de metanol) e os pares foram comparados usando o teste de Tukey-Kramer. As análises foram feitas através do software JMP versão 7.

## Resultados

Um total de 8 peptídeos foram identificados nas duas espécies estudadas (Tabela 1). Na cepa de *Radiocystis fernandoii* (R28) foram identificadas 5 microcistinas (Mc-RR, Mc-YR, dMc-YR, Mc-FR e Mc-WR), uma microviridina (Mv-1709) e uma cianopeptolina (Cy-1071). Na cepa de *Microcystis panniformis* (M6) foram identificadas 6 microcistinas (dMc-RR, Mc-RR, Mc-YR, dMc-YR, Mc-FR e Mc-WR), uma microviridina (Mv-1709) e uma cianopeptolina (Cy-1071). As duas cepas possuem um perfil peptídico bastante semelhante, com a diferença apenas de um peptídeo, a dMc-RR produzida apenas pela cepa M6.

Tabela 1 – Peptídeos identificados nas duas cepas estudadas

(M+H)*	NOME	CEPA
1038.5	Microcistina-RR	28, 6
1045.5	Microcistina-YR	28, 6
1031.5	[Asp <sup>3</sup> ]Microcistina-YR	28, 6
1029.5	Microcistina-FR	28, 6
1068.5	Microcistina-WR	28, 6
1072.5	Cianopeptolina-1071	28, 6
1709.6	Microviridina-1709	28, 6
981.5	[Asp <sup>3</sup> ]Microcistina-LR	6

\*Massas (M+H) em daltons

Considerando a cepa R28 foi visto que apenas a Mc-RR e a dMc-YR tiveram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, sendo que houve um aumento na concentração dos compostos no grupo tratado com o extrato zooplânctônico feito com metanol 75% (figura 1). Na cepa M6 não houve diferenças significativas entre os tratamentos (figura 2). Ao considerar a soma de todas as microcistinas não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos nas duas cepas analisadas (figuras 3 e 4).

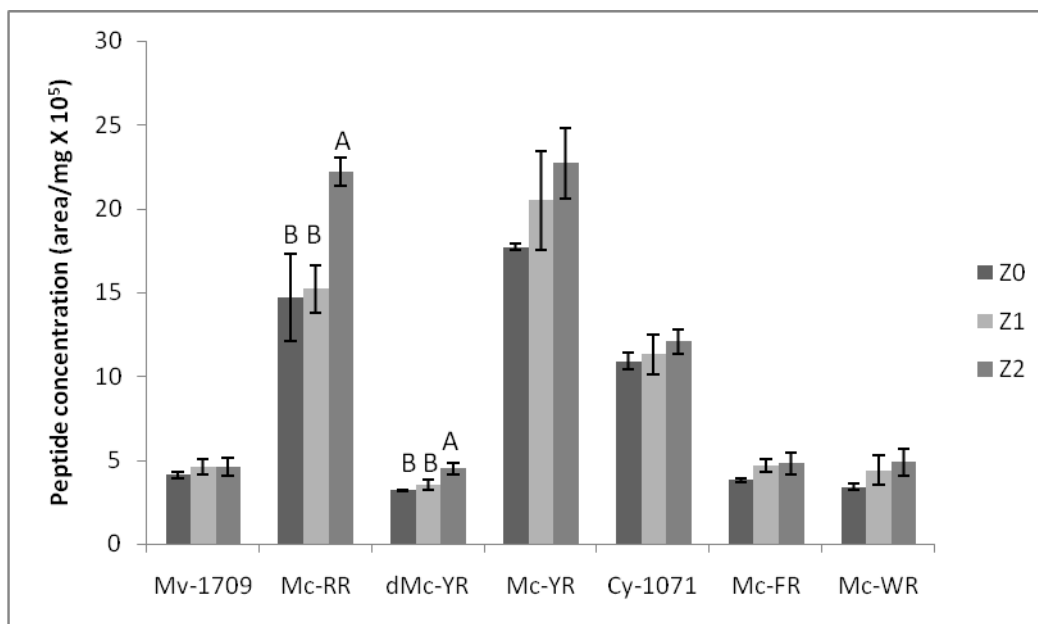


Figura 1 – Concentração de peptídeos encontrada na cepa R28. Letras A, B e C mostram diferenças significativas em Mc-RR e dMcYR,  $P < 0,05$ . Legenda: Mc – microcistina; Cy – cianopeptolina; Mv – microviridina; Z0 – controle; Z1 – extrato com água; Z2 – extrato com metanol 75%.

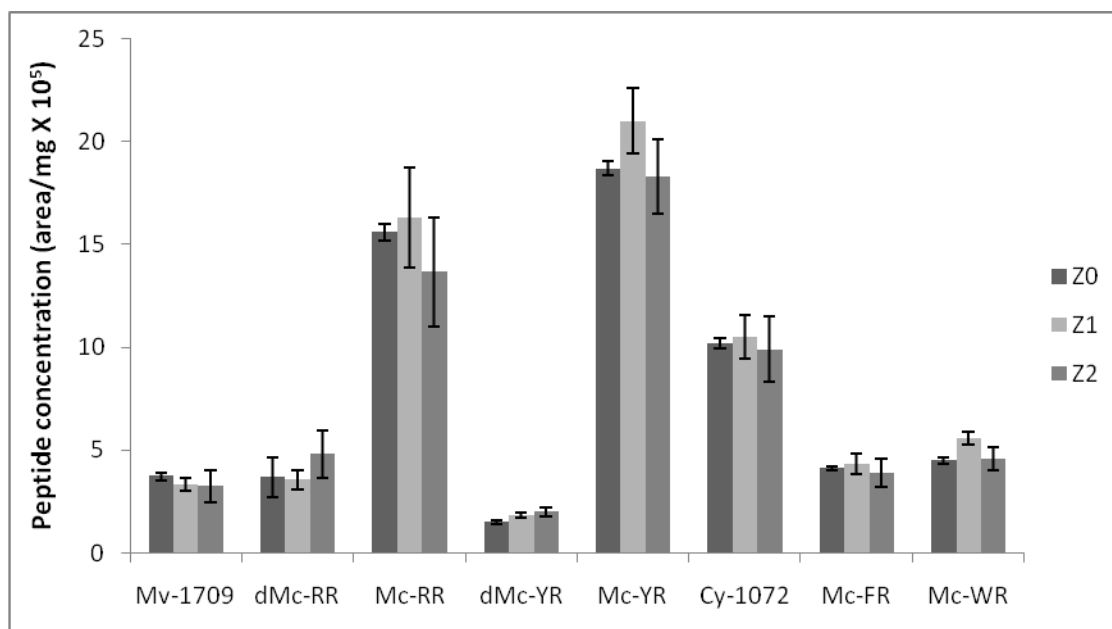


Figura 2 – Concentração de peptídeos encontrada na cepa M6. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Legenda: Mc – microcistina; Cy – cianopeptolina; Mv – microviridina; Z0 – controle; Z1 – extrato com água; Z2 – extrato com metanol 75%.

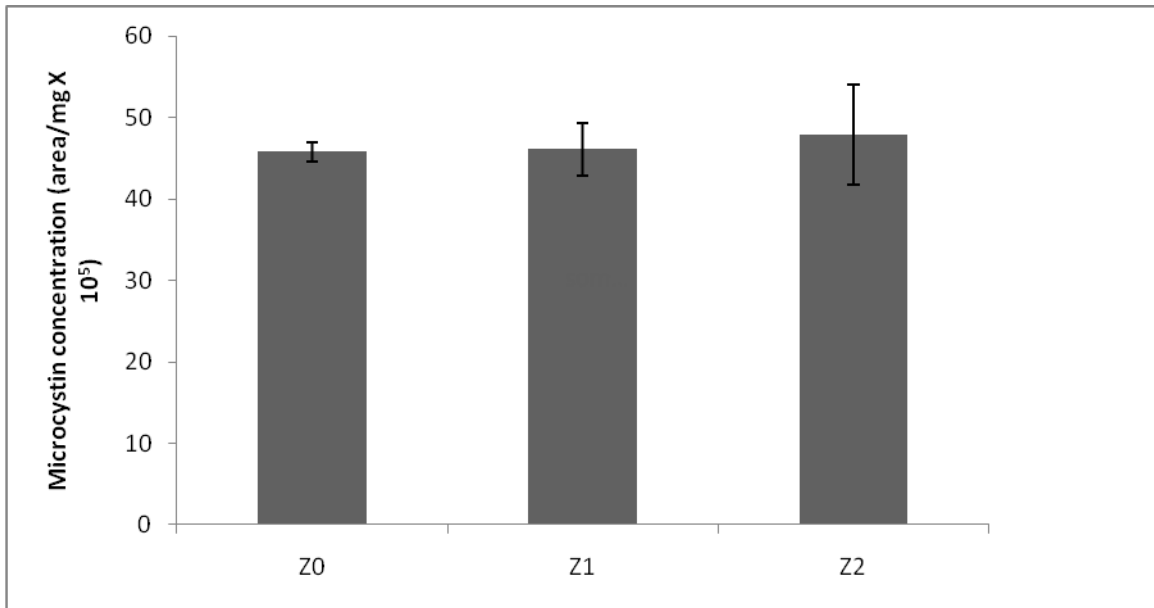


Figura 3 – Concentração de microcistina total encontrada na cepa R28. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Legenda: Z0 – controle; Z1 – extrato com água; Z2 – extrato com metanol 75%.

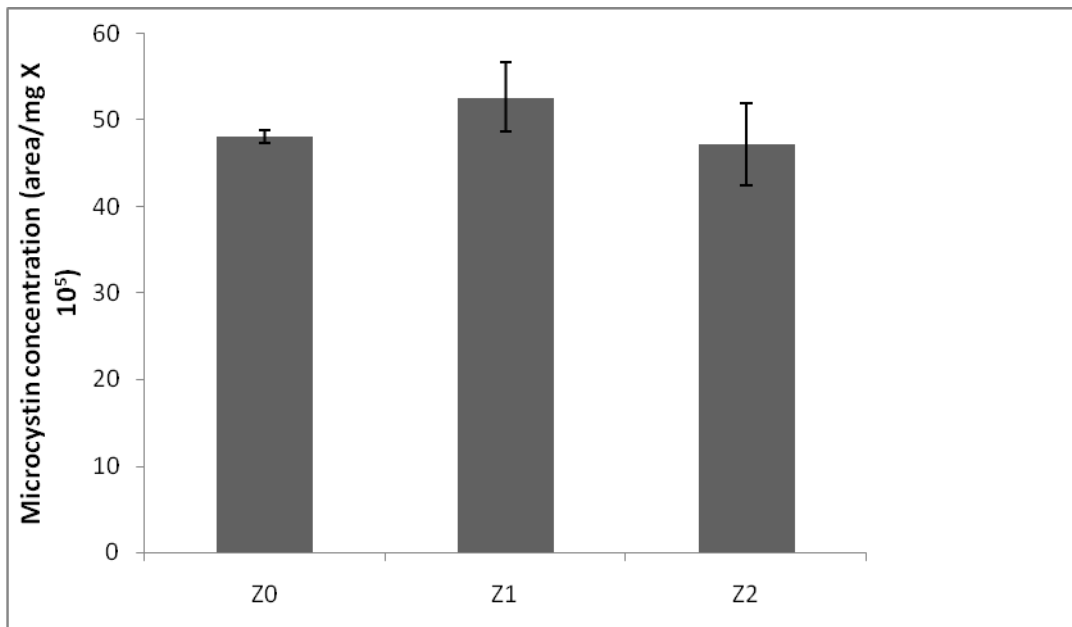


Figura 4 – Concentração de microcistina total encontrada na cepa M6. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Legenda: Z0 – controle; Z1 – extrato com água; Z2 – extrato com metanol 75%.

## Discussão

Diversos experimentos já demonstraram os efeitos de metabólitos secundários sobre organismos zooplanctônicos, e também sobre enzimas específicas. As microcistinas são fortes inibidores das enzimas fosfatases 1 e 2A, tanto de mamíferos (Honkanen et al., 1994) quanto de zooplâncton (DeMott & Dhawale, 1995). Estudos demonstraram que diversas microviridinas apresentam atividades inibitórias sobre proteases (Okino et al., 1995; Murakami et al., 1997). O trabalho de Rohrlack et al. (2004) mostrou a atividade inibitória de uma variante específica de microviridina sobre tripsina de *Daphnia*. Czarnecki et al. (2006), correlacionou a intensidade da atividade inibitória de extratos feitos com diferentes cepas de *Microcystis* sp sobre tripsina de *Daphnia* com o perfil peptídico destas cepas, encontrando uma forte correlação entre a atividade inibitória e a presença de cianopeptolinas e uma média correlação com as microviridinas.

No entanto, o presente estudo tentou criar uma abordagem inversa à demonstrada na maioria dos outros trabalhos, tentando detectar uma possível influência da presença do zooplâncton no padrão dos peptídeos nas cianobactérias e não a influência dos peptídeos no zooplâncton. Tal abordagem foi utilizada ao se pensar sobre as funções dos metabólitos das cianobactérias. Se supõe que estes metabólitos poderiam estar relacionadas a efeitos alelopáticos (Smith & Doan, 1999; Pflugmacher, 2002; Schatz et al., 2005), *quorum sensing* bacteriano (Kaebernick et al., 2000) e uma possível relação com metabolismo interno (Lyck, 2004), além da proteção contra predação citada acima. Neste sentido, o desenho experimental foi feito com a ideia de testar a hipótese de que as funções de proteção contra predação seriam apenas secundárias, e que a função primária dos peptídeos cianobacterianos seria outra.

De certa forma, os resultados obtidos neste trabalho suportam a ideia de que a proteção contra predação é apenas secundária, já que apenas duas microcistinas em uma das espécies estudadas tiveram um aumento significativo de concentração ao serem expostas ao extrato feito com metanol 75%. Todos os outros compostos estudados não apresentaram mudanças de concentração, sendo que na cepa M6 nenhum composto sofreu alguma alteração significativa. Mesmo com a utilização de dois extratos diferentes, feitos com água e metanol 75%, que teve por finalidade extrair a maior quantidade possível de compostos, os resultados foram os mesmos. A ideia de que a proteção contra predação é apenas secundária também é mostrada no trabalho de Rohrlack et al. (2004), onde foi visto que apenas a microviridina J possui atividade inibitória da enzima tripsina, fato atribuído a presença de uma arginina em uma posição onde normalmente é encontrada uma tirosina ou uma leucina. Diversos estudos já demonstraram que a estrutura dos peptídeos de cianobactérias é extremamente variável e que a toxicidade de cada grupo de compostos depende muito da porção variável das moléculas (para uma revisão completa ver Welker & von Döhren, 2006). Também já foi visto que populações no ambiente são compostas de linhagens produtoras e não produtoras (Fastner et al., 2001; Rohrlack et al., 2001; Welker et al., 2004), sem aparente vantagem competitiva entre as diversas cepas (Hesse et al., 2001; Kaebernick et al., 2001). Estes fatos corroboram com a ideia defendida neste trabalho, pois a existência e persistência de espécies produtoras de peptídeos com baixa ou nenhuma toxicidade em populações naturais pode ser considerada como uma evidência de que estes compostos desempenham algum papel diferente do que proteção contra predação.

Porém, os desvios padrões obtidos nos experimentos apresentaram uma grande variação, nos tratamentos mais do que no controle. Isto pode ser atribuído ao fato de que os extratos produzidos não possuíam apenas um composto, e sim, uma mistura de substâncias de origem zooplânctonica. Logo, cada extrato produzido poderia ter uma mistura de compostos com efeito inibitório e estimulante e até substâncias que eventualmente nunca entrariam em contato com as cianobactérias no ambiente natural, o que dificulta a obtenção de conclusões mais robustas a partir deste trabalho, sugerindo a necessidade de mais experimentos antes que possamos generalizar os resultados.

Apesar dos problemas apresentados acima, este estudo demonstra a importância de se utilizar novas abordagens ao analisar as interações entre organismos do zooplâncton e as cianobactérias, assim como o espectro de metabólitos existente.



## Referências Bibliográficas

Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N. 2001. Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in central India. *Hydrobiologia*. 464, 37-44.

Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N. 2005. Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 141, 33-41.

Benndorf, J., Henning, M. 1989. *Daphnia* and toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in Bautzen reservoir (GDR). *Int. Rev. Hydrobiol.* 74, 233-248.

Blom, J.F., Bister, B., Bischoff, D., Nicholoso, G., Jung G., Sussmuth, R.D., Juttner, F. 2003. Oscillapeptin J, a new grazer toxin of the freshwater cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *J. Nat. Prod.* 66, 431-434.

Boersma, M, Schöps, C. & McCauley, E. 2001. Nutritional quality of seston for the freshwater herbivore *Daphnia galeata* × *hyalina*: biochemical versus mineral limitations. *Oecologia* 129:342–348

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445-459.

Czarnecki, O., Lippert, I., Henning, M., Welker, M. 2006. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environ. Microbiol.* 8, 77-87.

DeMott, W.R., Dhawale, S. 1995. Inhibition of *in vitro* protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. Arch. Hydrobiol. 134, 417-424.

DeMott, W.R., Gulati, R.D., Siewertsen, K. 1998. Effects of phosphorus-deficient diets on the carbon and phosphorus balance of *Daphnia magna*. Limnol. Oceanogr. 43, 1147-1161.

DeMott, W.R. and Moxter, F. 1991. Foraging on Cyanobacteria by copepods: responses to chemical defenses and resource abundance. Ecology. 75, 1820-1834.

Fastner, J., Erhard, M., von Döhren, H. 2001. Determination of oligopeptides diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5069-5076.

Fulton, R.S.III, Pearl, H.W. 1987. Toxic and inhibitory of blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. J. Plankton Res. 9, 837-855.

Giani, A. 1991. Implications of phytoplankton chemical composition for zooplankton production: experimental evidence. Oecologia, 87, 409-416.

Guillard, R.R., Lorenzen, C.J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. J. Phycol. 8, 10-14.

Hairston, N.G., Holtmeier, C.L., Lampert, W., Weider, L.J., Post, D.M., Fischer, J.M. 2001. Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: evolution of phenotypic plasticity? Evolution. 55, 2203-2214.

- Haney, J.F., Sasner, J.J., Ikawa, M. 1995. Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnol. Oceanogr.* 40, 263-272.
- Harada, K.I., Fujii, K., Shimada, T., Suzuki, M. 1995. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aqua* NRC, 525-17. *Tetrahedron lett.* 36, 1511-1514.
- Hesse, K., Dittmann, E., Börner, T. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 37, 39-43.
- Honkanen, R.E., Codispoti, B., Tse, K., Boynton, A.L. 1994. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatase. *Toxicon.* 32, 339-350.
- Ishitsuka, M.O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., Watanabe, M.M. 1990. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8180-8182.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E. 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3387-3392.
- Kaebnick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., Neilan, B.A. 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environ. Microbiol.* 3, 669-679.

- Lampert, W. 1981. Inhibitory and toxic effects of blue-green algae in *Daphnia*. Int. Revue. Ges. Hydrobiol. 66, 285-298.
- Lawton, L.A., Edwards, C. 2001. Purification of microcystins. J. Chrom. A. 912, 191-209.
- Lyck, S. 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll A, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. J. Plankton Res. 26, 727-736.
- Martin, C., Oberer, L., Ino, T., Konig, W.A., Busch, M., Weckesser, J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis sp.* PCC 7806. J. Antibiot. 46, 1550-1556.
- Murakami, M., Okita, Y., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K. 1994. Aeruginosin 298-A, A thrombin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). Tetrahedron lett. 35, 3129-3132.
- Murakami, M., Sun, Q., Ishida, K., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K. 1997. Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26). Phytochemistry. 45, 1197-1202.
- Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M., Yamaguchi, K. 1993. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron lett. 34, 501-504.

Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M., Yamaguchi, K. 1995. New microviridins, elastase inhibitors of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*. 51, 10679-10686.

Pflugmacher, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407-413.

Reinikainen, M., Ketol, M., Walls, M. 1994. Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnol. Oceanogr.* 39, 424-432.

Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Borner, T., Kohl, J. 1999. Role of microcystins poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 737-739.

Rohrlack, T., Henning, M., Kohl, J.G. 2001. Isolation and characterization of colony-forming *Microcystis aeruginosa* strains. In: Chorus, I. (ed.), *Cyanotoxins – Occurrence, causes and consequences*. Springer, Berlin, pp. 152-158.

Rohrlack, T., Christoffersen, K., Hansen, P.E., Zhang, W., Czarnecki, O., Henning, M., Fastner, J., Erhard, M., Neilan, B.A., Kaebernick, M. 2003. Isolation, characterization and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1757-1770.

Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2004. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes lethal molting disruption in *Daphnia pulicaria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5047-5050.

- Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Senna, P.A.C., Komárek, J., Kormaková, J. 2004. Planktic cyanobacteria from Sao Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botanica*. 27, 213-227.
- Schatz, D., Keren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A., Kaplan, A. 2005. Ecological implications of the emergence of non toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environ. Microbiol.* 7, 198-805.
- Schmidt, K., Jonasdottir, S.H. 1997. Nutricional quality of two cyanobacteria: How rich is 'poor' food? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151, 1-10.
- Smith, G.D., Doan, N.T. 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *J. Appl. Phycol.* 11, 337-344.
- Sterner, R.W. 1993. *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: mineral limitation of zooplankton. *Ecology*. 74, 2351–2360
- Von Elert, E. 2002. Determination of limiting polyunsaturated fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. *Limnol Oceanogr.* 47, 1764-1773.
- Von Elert, E., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U., Zitt, A. 2004. Protease activity in gut of *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137, 287-296.
- Welker, M., Brunke, M., Preussel, K., Lippert, I., von Döhren, H. 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (cyanobacteria) oligopeptides chemotypes from natural communities studied by single mass spectrometry. *Microbiology*. 150, 1785-1796.

Welker, M., von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 530-563.

Welker, M., Marsálek, B., Sejhonová, L., von Döhren, H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward and understanding of metabolic diversity. *Peptides.* 27, 2090-2103.

## 6. Conclusões finais

O presente estudo demonstrou que o perfil peptídico de diferentes cepas de cianobactérias pode sofrer influência de diferentes fatores, como intensidade luminosa, concentração de ferro e presença de compostos de origem zooplânctônica. Foi visto que as classes de peptídeos podem se comportar de forma diferente ao serem expostas a uma mesma variação externa, e em alguns casos, compostos pertencentes a um mesmo grupo podem ser influenciados de forma diferente por um mesmo fator, como foi visto com as microviridinas sob a influência de diferentes intensidades luminosas. Pode se perceber também mecanismos de compensação relacionado aos experimentos com luz, onde a redução na concentração de determinadas microcistinas foi acompanhada de um aumento na concentração de microcistina-RR. Os experimentos também demonstraram que a concentração de metabólitos secundários não é necessariamente maior nas melhores condições de crescimento, uma vez que foi visto um aumento significativo na concentração de anabaenopeptina B em um cenário onde a concentração de ferro era um fator limitante.

É importante ressaltar a necessidade de trabalhar com diferentes classes de peptídeos ao estudar as relações entre os metabólitos secundários de cianobactérias e os fatores presentes no ambiente, bem como, suas funções fisiológicas e ecológicas, uma vez que, cepas de cianobactérias raramente produzem apenas uma classe de compostos e estes podem exibir comportamentos distintos.