

Propriedades da reflectância de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) manipulada em altas concentrações de pigmentos

Felipe de Lucia Lobo¹
João Sarkis Yunes²
Cláudio Clemente Barbosa¹
Luciana de Resende Londe¹
Waterloo Pereira Filho³
Cristina Iepsen Theil²
Evlyn Márcia Leão de Moraes Novo¹

¹ Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE
Caixa Postal 515 - 12245-970 - São José dos Campos - SP, Brasil
lobo@dsr.inpe.br

² Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Caixa Postal 474 - 96201-900 - Rio Grande - RS, Brasil
jsyunes@furg.br

³ Universidade Federal de Santa Maria - UFSM
Caixa Postal 221 - 97015-372 - Santa Maria, RS, Brasil
waterloopf@gmail.com

Abstract: Remote sensing techniques using hyperspectral data can retrieve some pigment optical properties of cyanobacteria bloom and enhance the spatial monitoring models. In this way, the laboratory experiment reported here was performed using both radiometric and pigments sampling to investigate the cyanobacteria hyperspectral features of successive pigment dilutions. The objective is to characterize the reflectance properties of a simulated cyanobacteria bloom varying chlorophyll-a concentration from 1200 to 60 ug/L. Chlorophyll-a (440 and 680 nm) and phycocyanin (620 nm) absorption bands were identified. In addition, fluorescence emission in 660 nm, due to high phycocyanin concentration as a result of a low light photoadaptation, was well characterized. Another important feature identified is the infrared peak reflectance due to cell wall scattering. This feature is also highly correlated with CHL-a concentration, the first derivative analysis in 717 nm shows a 0.91 correlation coefficient with CHL-a concentration.

Palavras-chave: Cyanobacteria bloom, phycocyanin fluorescence, laboratory experiment, cianobactéria, fluorescência, ficocianina, experimento laboratorial.

1. Introdução

As cianobactérias são frequentemente responsáveis por florações de fitoplâncton (Johnsen et al., 1994, Funari e Testai, 2008) em reservatórios, regiões estuarinas e costeiras (Carvalho et al., 2007; Funari e Testai, 2008) porque apresentam controle bioquímico versátil e capacidade de rápida multiplicação. Algumas espécies de cianobactérias produzem toxinas de ação hepatotóxicas que são liberadas quando ocorre lise da célula e podem, em altas concentrações, prejudicar a cadeia trófica e contaminar a água usada para abastecimento público (Lee et al., 1995).

As técnicas de sensoriamento remoto podem recuperar informações sobre as propriedades ópticas das populações de cianobactérias (Brando e Dekker, 2003; Kutser et al., 2001, Han e Rundquist, 1997) contribuindo para ampliar sua representatividade espacial e temporal, tendo em vista as limitações apresentadas pelos métodos tradicionais de amostragem de água para o acompanhamento de florações de cianobactérias. Os três principais grupos de pigmentos que determinam as propriedades bio-ópticas de cianobactérias são: clorofila-a, com bandas de absorção em 440 e 675nm; carotenóides, absorção na região

do UV (Ultra-Violeta) e azul; e ficobiliproteínas, com absorção aproximada em 620 nm (Rowan 1989 apud Johnsen et al., 1994). Além disso, a identificação de fitoplâncton baseada em dados hiperespectrais de refletância in vivo depende da resposta de foto-adaptação celular, da resolução espectral utilizada nas medições (Bidigare et al., apud Johnsen et al., 1994), bem como, da absorção pela água, da presença de outros componentes opticamente ativos e da geometria das células (Kirk, 1994).

A caracterização hiperespectral de cianobactérias isoladas em laboratório pode fornecer informações importantes sobre feições espectrais específicas desse grupo, permitindo que se estabeleçam relações entre as informações coletadas em diferentes níveis de aquisição dos dados espectrais, desde radiômetros manuais a imagens orbitais,

Nos corpos d'água, entretanto, a resposta espectral de um dado gênero fitoplanctônico pode se misturar à de outros grupos e a outros componentes opticamente ativos, tais como o COD (Carbono Orgânico Dissolvido) e SIS (Sólidos Inorgânicos em Suspensão, tornando-se difícil sua exata discriminação e mapeamento.

Neste estudo, portanto, é proposta a caracterização da reflectância hiperespectral de cianobactérias manipuladas em tanque em altas concentrações de pigmentos com o objetivo de estabelecer feições espectrais diagnósticas para o seu monitoramento.

2. Metodologia de Trabalho

De modo geral, o experimento consistiu em realizar medidas espectro-radiométricas de cultura isolada de *Microcystis* em alta concentração sucessivamente diluída em tanque de 20 litros, para proporcionar variações de concentração de clorofila-a (CHL-a) entre 1200 e 50 µg/L, de modo a simular situação de floração.

2.1. Cultura celular

A cepa *Microcystis aeruginosa* RST 9501 foi isolada de Torotama, região estuarina da Lagoa dos Patos, no Rio Grande/RS e mantida em cultivo aerado BG11 (Stanier et al., 1971) não salino, enriquecido de nutrientes (NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄ entre outros), pH 8 e sob lâmpada fluorescente com intensidade luminosa de 2000 lux em regime constante de 24 hs no laboratório da Unidade de Pesquisa em Cianobactéria da FURG (www.cianobacterias.furg.br) Trata-se de uma população de indivíduos unicelulares não-coloniais.

2.2. Radiometria

A reflectância bidirecional foi calculada a partir de medições de radiância utilizando o espectralradiômetro Spectron SE-500 no intervalo compreendido entre 368 a 1114 nm divididos em 250 bandas de 3 nm de largura (Steffen, 1996). O cálculo da reflectância bidirecional espectral (aqui denominado R) é a razão entre a radiância espectrais da água e a de uma superfície lambertiana ideal, nas mesmas condições de iluminação e observação (Milton, 1987). Neste caso foi utilizada uma placa de sulfato de bário (BaSO₄) calibrada com uma placa padrão Spectralon[®] em laboratório como referência, equação (1).

$$R(\theta, \phi, \lambda) = L_{a, \lambda} / L_{r, \lambda} \cdot K \lambda \quad (1)$$

Onde: R é o fator de reflectância; L_a, radiância do alvo; L_r, radiância da placa referência; K, fator de calibração; λ, comprimento de onda.

Um tanque internamente pintado de preto fosco, para evitar interferência na reflectância (Gitelson et al., 1999), com diâmetro de 34 cm, 32 cm de profundidade e capacidade de 20 L foi utilizado para realizar as diluições e as medidas radiométricas da cultura. O radiômetro, com FOV (*Field of View*) do de 6°, foi posicionado a nadir a 40 cm da superfície do tanque como mostra a figura 1. As medidas foram obtidas com iluminação solar e realizadas nas

dependências da FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande) em Rio Grande/RS (32°01'14.89" S; 52°06'42.29" O) nos dias 27, 29 e 30/05/2008 entre 11 e 13 hs com angulação zenital média de 60°. O fluxo de energia solar foi medido por um luxímetro.

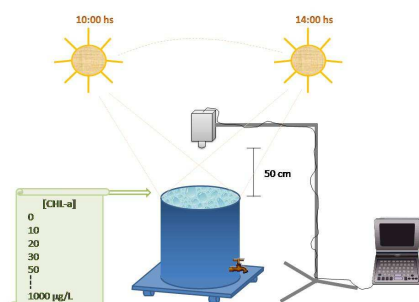


Figura1: Geometria de aquisição radiométrica do experimento.

A cada diluição realizada, isto é, substituição de água da cultura no tanque por água, foi calculada a média de 5 medições da radiância da água alternadas com leituras da placa de referência. As diluições, bem como, as condições atmosféricas em cada dia do experimento estão representadas na tabela 1. Nos dois primeiros dias, o céu estava nublado, enquanto, no terceiro dia havia sol entre nuvens.

Tabela 1: Diluições efetuadas em tanque de 20 litros e condições atmosféricas nos três dias de experimento.

| dia 27/05 nublado (13000 lux) | | dia 29/05 nublado (18000 lux) | | dia 30/05 sol entre nuvens (55000 lux) | |
|---|-------------|---|-------------|--|-------------|
| Diluição (L) | % da matriz | Diluição (L) | % da matriz | Diluição (L) | % da matriz |
| - | 100% | - | 100% | - | 100% |
| 8 | 60% | 5 | 75% | 10 | 50% |
| 5 | 45% | 5 | 56% | 10 | 25% |
| 3 | 38% | 5 | 42% | 10 | 13% |
| 1 | 36% | 5 | 32% | 10 | 6% |
| 2 | 33% | 5 | 24% | 5 | 2% |
| 3 | 25% | 10 | 12% | 5 | 0.4% |
| | | 10 | 6% | | |

Uma vez obtidas curvas de reflectância das 22 diluições realizadas nos três dias foi aplicado um filtro de média de 3 pontos para diminuir o ruído do sinal. Para facilitar a visualização das curvas foi realizada a normalização da reflectância em relação à região de absorção máxima por ficobiliproteínas em 617 nm. Posteriormente, alguns algoritmos preditivos de CHL-a são gerados a partir da correlação com os comprimentos de onda e suas 1° derivadas. A técnica derivativa é aplicada para eliminar o efeito de 1° ordem de absorção e espalhamento da água e realçar as variações produzidas pela absorção dos pigmentos (Han, 2005).

2.3. Pigmentos

Amostras de 50 mL de água foram retiradas do tanque nas 7 amostras do dia 27 para a determinação de clorofila-a (CHL-a) e ficobiliproteínas (FB) em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), incluindo ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), ficoeritrina (FE). Para as demais diluições as concentrações de pigmentos foram estimadas em relação à matriz de cultura celular cuja concentração é conhecida. Além disso, foi lida a transmitância em 710 nm e realizada contagem de células nas 7 amostras.

3. Resultados e Discussão

3.1. Feições das curvas espectrais

Na semana de medições houve a entrada de uma frente fria com a formação de nuvens no primeiro dia, as quais diminuíram no segundo até que no terceiro dia o sol voltou a aparecer entre nuvens (semi-encoberto).

O céu encoberto favorece o predomínio de radiação difusa proveniente do espalhamento atmosférico. Assim, embora menos intensa (16000 lux), a radiação difusa atinge um volume maior da água no tanque quando comparada com a situação de radiação direta como ocorreu no dia 30 (55000 lux). Nesse sentido, quanto maior o volume de água atingido por radiação luminosa maior o espalhamento volumétrico e, portanto, maior a reflectância média. Por outro lado, quando se tem radiação direta proveniente do sol posicionado a 60° azimute, boa parte do volume do tanque é sombreada pela própria parede do recipiente, condicionando menor espalhamento volumétrico, menor zona eufótica e, assim, resultando em menor reflectância média (Figura 2-d).

Apesar das diferenças de intensidade entre os dias algumas feições das curvas espectrais foram comuns a todas as diluições efetuadas e podem ser visualizadas na figura 2-a, onde as curvas espectrais são normalizadas em 617 nm: bandas de absorção de CHL-a em 440 e 675 nm; forte absorção por FC em 620 nm; pico de reflectância na região do verde (550 nm); um pico proeminente de fluorescência em 660 nm e espalhamento na região do IVP variando de 699 a 726. Em três diluições houve um pico extremo de fluorescência da FC em 660 nm, uma no dia 29 na diluição em que foram substituídos 10 litros de água que resultou na concentração de 116 ug/L de CHL-a e duas no dia 30, concentrações de 150 e 75 ug/L.

3.2. Pigmentos e Fotossistemas

Na tabela 2 têm-se os resultados das concentrações de pigmentos nas 7 amostras analisadas. Percebe-se que as concentrações de ficobiliproteínas também são elevadas mas apresentam maior queda da concentração em função das diluições do que a CHL-a.

Tabela 2: Concentrações de pigmentos, transmitância em 710 nm e contagem de células nas 7 amostras do 1° dia de experimento.

| Concentração (%) | Clorofila a (ug/L) | Ficobiliproteínas Totais (ug/L) | Ficocianina (ug/L) | Aloficocianina (ug/L) | Ficoeritrina (ug/L) | Transmitância em 710 nm (%) | Contagem de células (cels/mL) |
|------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 100 | 1256 | 1344 | 923 | 324 | 97 | 42 | 12,231,000 |
| 60 | 802 | 624 | 389 | 98 | 136 | 59 | 6,278,000 |
| 45 | 563 | 479 | 233 | 132 | 114 | 67 | 3,556,000 |
| 38.25 | 501 | 378 | 168 | 141 | 70 | 71 | 2,718,000 |
| 36.33 | 445 | 280 | 45 | 150 | 85 | 72 | 2,666,000 |
| 32.7 | 411 | 183 | 74 | 49 | 60 | 75 | 2,324,000 |
| 24.52 | 305 | 117 | 67 | 9 | 41 | 80 | 1,315,000 |

Em cianobactérias, o principal complexo de pigmentos absorvedores de energia são os ficobilissomas, que por serem hidrofílicos, se localizam periféricamente as membranas de tilacóide. As ficobilissomas estão associadas aos centros de reação do fotossistema II (PSII) e concentram as ficobiliproteínas, são elas: ficocianinas (FC), com absorção máxima em 615nm; aloficocianina (AFC), absorção em 650nm e ficoeritrinas (FE), absorção máxima em 575 nm. A CHL-a, que por sua vez, apresenta bandas de absorção em 440 e 675nm, está localizada principalmente (80 - 90%) na membrana do tilacóide e associada ao fotossistema I (PSI) (Seppälä et al., 2007). Os PS I e II funcionam conjuntamente e estão interligados por uma complexa cadeia de elétrons excitados responsável pela geração do gradiente de prótons no lúmem do tilacóide para síntese de ATP (Adenosina Trifosfato), bem como, redução química de moléculas essenciais ao metabolismo celular.

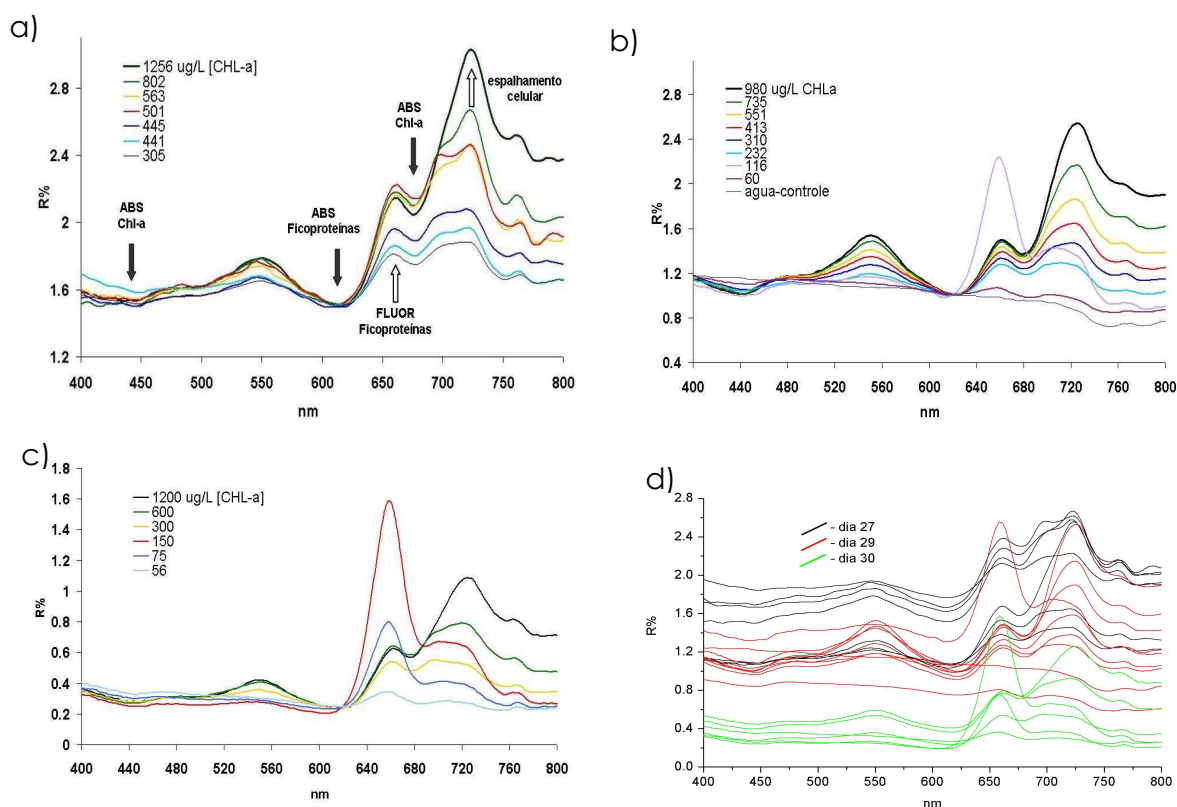


Figura 2: Curvas espectrais de *Microcystis aeruginosa* RST 9501 determinadas em tanque laboratorial com energia solar e niveladas em 617 nm. a) Espectros do dia 27/05/08 com respectivas concentrações de CHL-a e indicação das principais feições de absorção (ABS), fluorescência (FLUOR) e espalhamento celular; b) dia 29/05/2008 com água controle; c) dia 30/05/2008; d) curvas espectrais originais, ou seja, sem nivelamento em 617 nm.

Em geral, o PSII além de servir como complexo antena para auxiliar a CHL-a no processo de absorção, é também responsável pela regulação da excitação luminosa, visto que a irradiância flutua entre intensidades limitantes e potencialmente inibidoras (Kroon, 1994) e, por isso, é o principal dissipador e emissor de fluorescência. Em cianobactérias onde o PSII está associado com as ficobilissomas, a fluorescência das ficobiliproteínas é maior do que a de CHL-a que está associado ao PSI pouco fluorescente (Vermaas et al., 2008). Vermaas et al. (2008) identificaram as emissões por fluorescência máximas de ficocianina (650 nm), APC (665 nm), APC-b (675nm) e de

CHL-a (690 nm) isolados da cianobactéria *Synechocystis*. O rendimento de fótons aproveitados para a fotossíntese ou dissipados depende da disponibilidade de nutrientes, concentração de pigmentos, disponibilidade de luz e, principalmente, da condição luminosa a qual a população de fitoplâncton está fotoadaptada (Kroon, 1994).

3.3. Fotoadaptação e fluorescência

A adaptação fotossintética à variações de irradiância em escala de horas a dias é condicionada a mudanças estruturais na célula como alteração na concentração de pigmentos e nos componentes da cadeia fotossintética de elétrons (Kirk, 1994). No entanto, em mudanças repentinas do regime de iluminação em curto período de tempo, a célula recorre à resposta rápida de dissipação pelo PSII através, principalmente, da fluorescência (Kroon, 1994).

Nesse experimento, a cultura de *Microcystis* estava fotoadaptada a um baixo regime de 2000 lux. Com isso, teve aumentado o número e a concentração de ficobilissomas, além de diminuir o número de componentes chaves na transferência de elétrons, como citocromos, plastoquinonas e ferredoxinas (Kirk, 1994). Assim quando exposta ao sol em regime de 13000 a 50000 lux apresentou alta emissão de fluorescência pelo PSII (Gitelson et al., 1999 e Schales et al. 1998), de modo a evitar a fotoinibição celular. Isso condicionou em todas as curvas obtidas o pico de reflectância em 660 nm, resultado da emissão por ficobiliproteínas, em sua maioria, ficocianina. O mesmo raciocínio é feito para as três diluições que tiveram picos extremos de fluorescência em 660 nm, ou seja, quando se substituiu metade do volume do tanque por água pura (10 L). A disponibilidade de luz para cada célula que restou no tanque aumentou. Assim, a resposta rápida das células foi de emitir o excesso de energia que os ficobilissomas absorveram. Já a emissão por CHL-a do PSII foi baixa e pouco perceptível, a não ser pelas curvas (802 ug/L) e (501 ug/L) do dia 27, que apresentaram ligeira elevação da reflectância em 690 nm.

3.4. Espalhamento Celular

Outra feição importante diagnosticada é um pico de reflectância proeminente na região do IVP (700 a 726 nm). Localizado entre duas bandas de absorção (por CHL-a e água) é o resultado do espalhamento da radiação por partículas em suspensão, nesse caso, o espalhamento ocorre pela superfície das células.

Para concentrações de CHL-a até 300 ug/L, com diversos grupos de fitoplâncton, Gitelson et al. (1999) encontrou um limite de espalhamento em 715 nm. No entanto, observa-se na figura 4-a que o espalhamento máximo pela superfície das células migra até 726 nm em concentrações em torno de 1000 ug/L.

Por outro lado, o pico de fluorescência máxima não migra para comprimentos maiores como o pico de espalhamento celular e fica praticamente constante em torno de 660 nm. Isso ocorre pelo fato da fluorescência ser resultante de um processo de emissão fotoquímica definida pelos pigmentos que emitem sempre no mesmo comprimento de onda que depende da composição dos pigmentos no PSII.

3.5. Algoritmos de estimativa de pigmentos

A região do espectro que melhor se correlaciona com a concentração de CHL-a é a do pico de espalhamento celular no IVP, sendo os algoritmos provenientes da 1ª derivada dos espectros que se mostraram com maior capacidade de previsão com coeficiente de correlação (R²) alcançando 0.91 em 717 nm, também com valores máximos na região de espalhamento celular (figura 4-b). Os algoritmos para as ficobiliproteínas foram semelhantes aos da CHL-a e por isso não foram apresentados.

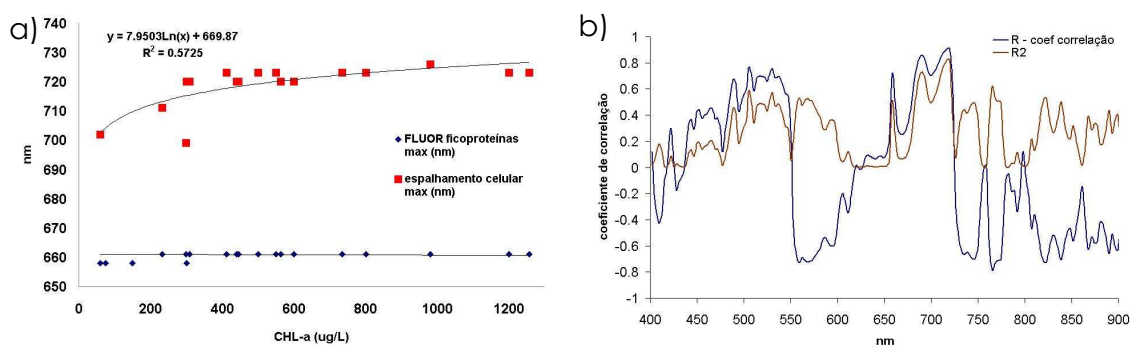


Figura 4: a) Picos máximos de fluorescência e espalhamento celular em cada curva espectral dos três dias de experimentos; b) Coeficiente de correlação (R) e determinação (R2) da CHL-a em função da 1° derivada da reflectância de 400 a 900 nm;

Em estudo na Baía Pensacola (Flórida/EUA) Han (2005) encontrou uma correlação de 0.86 entre a concentração de CHL-a e a 1° derivada em 686 nm na Baía Pensacola (Florida, EUA). No entanto, a concentração de CHL-a variou de 1 a 36 ug/L, bem abaixo das concentrações estabelecidas no presente estudo. Presume-se, portanto, que com o aumento a concentração celular e da CHL-a, o pico de espalhamento máximo migra para comprimentos maiores e, conseqüentemente, o comprimento, no qual há correlação máxima, também migra. Isto ocorre porque a concentração de CHL-a está relacionada com o número de células, que, por sua vez, determina a feição de espalhamento no infravermelho próximo.

4. Conclusões

Embora a cobertura total da atmosfera por nuvens reduza em média intensidade luminosa quando comparado com radiação direta do sol, a radiação difusa decorrente do espalhamento atmosférico pelas nuvens garante que boa parte do tanque experimental receba radiação. Dessa forma, o espalhamento volumétrico e a reflectância média nessa situação são maiores do que em caso de radiação direta onde se tem sombreamento pelo próprio tanque experimental reduzindo o espalhamento volumétrico e a reflectância média.

A fotoadaptação da cultura de *Microcystis aeruginosa* RST 9501 à baixa intensidade luminosa (2000 lux), ou seja, aumento na concentração de pigmentos acessórios (ficobiliproteínas) e redução de componentes de transferência de elétrons, resultaram em emissão da radiação em 660 nm pela fluorescência de ficobiliproteínas localizadas no PSII. Fenômeno confirmado em 3 das 22 diluições realizadas, onde se obteve, após grandes diluições de água e aumento da intensidade luminosa, picos extremos de fluorescência em 660 nm.

Outra feição importante identificada foi a do espalhamento celular no IVP que, ao contrário da fluorescência em 660 nm, o pico máximo da reflectância migra para comprimentos de onda maiores com o aumento da concentração de células. Além disso, essa feição foi que melhor prediz a concentração de CHL-a, a correlação máxima de $R=0,91$ ($p<0,05$) foi obtida com a 1° derivada em 717 nm.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro do CNPq e a toda equipe da Unidade de Pesquisa em Cianobactéria (UPC) da FURG por nos receber e garantir totais condições para realizar o experimento.

Bibliografia

- Brando, V.E., E A.G. Dekker. Satellite hyperspectral remote sensing for estimating estuarine and coastal water quality. **IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing** V.41, N.6: 1378-1387. 2003
- Carvalho, L. et al. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, V.30, n.1, p.141-148, jan.-mar. 2007
- Funari, E. E Testai, E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure Environment and Primary Prevention Department. **Critical Reviews in Toxicology**, 38:97-125, 2008
- Gitelson, A.A., J.F Schalles, D.C. Rundquist, F.R Schiebe, e Y.Z. Yacobi. Comparative reflectance properties of algal cultures with manipulated densities. **Journal of Applied Phycology** 11. pp. 345-354. 1999.
- Han, L. Estimating chlorophyll-a concentration using first-derivative spectra in coastal water. **International Journal of Remote Sensing** V.26, N.23. pp. 5235-5244. 2005.
- Han, L., e D.C. Rundquist. Comparison of NIR/RED ratio and first derivative os reflectance in estimating algal-chlorophyll concentration: A case study in a turbid reservoir. **Remote Sensing of Environment** V.62. pp. 253-261. 1997.
- Johnsen, G. et al. ,In vivo absorption characteristics in 10 classes of bloom-forming phytoplankton: taxonomic characteristics and responses to photoadaptation by means of discriminant and HPLC analysis. **Marine Ecology Progress Series**. Vol 105. pp. 149 a 157. 1994.
- Kirk, J.T.O. **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- Kroon, B, M. Variability of photosystem II quantum yield and related processes in *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyta) acclimated to an oscillating light regime simulating a mixed photic zone. **Journal of Phycology**. 30, 841 – 852, 1994.
- Lee, T. et al. Quantitative determination of cyanobacteria in mixed phytoplankton assemblages by an in vivo fluorimetric method, **Analytica Chimica Acta** (302) 81-87, 1995.
- Milton, E.J. "Principles of field spectroscopy." **International Journal of Remote Sensing** V. 8, N° 12, pp. 1807-1827. 1987.
- Seppälä, J. et al. Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 73, 489 - 500, 2007.
- Stanier, R. Y.; Kunisawa, R.; Mandel, M. e Cohen-Bazire, G. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, p. 171-205, June 1971.
- Steffen, C. Técnicas Radiométricas com o Spectron SE-590. **Anais VIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Salvador, Brasil, 14-19 abril, INPE, p. 969-975. 1996
- Vermaas, W. et al. In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells. **PNAS**, vol. 105, no. 10 March 11, 2008