

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo
e Conservação dos Recursos Naturais

Efeitos da limitação de fósforo na eficiência
fotossintética, na morfologia e no crescimento de
Cylindrospermopsis raciborskii

Raphaela Moreira Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ecologia como
requisito para obtenção do grau de Mestre
em Ecologia Aplicada ao Manejo e
Conservação dos Recursos Naturais

Juiz de Fora – MG - Brasil

2007

**Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética, na morfologia
e no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii***

Raphaela Moreira Ferreira

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais.

Prof. Carlos Bicudo, Dr.

Prof. Marcelo Manzi Marinho, Dr.

Prof. Fábio Roland, Dr.

JUIZ DE FORA – BRASIL

OUTUBRO DE 2007

Orientador:

Fábio Roland

FICHA CATALOGRÁFICA

FERREIRA, RAPHAELA MOREIRA

Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética, na morfologia e no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* [Minas Gerais]2007
53p. 7 figuras.

Dissertação de Mestrado. (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007).

Palavras-chave: *Cylindrospermopsis raciborskii*, morfologia, parâmetros fotossintéticos, curva $P \times I$, limitação por fósforo.

*Ao meu avô Raphael, a primeira pessoa
a incentivar meus anseios
pela vida de cientista!
Obrigada por todos os recortes de jornal!*

Agradecimentos

A minha família que esteve sempre presente na minha vida mesmo quando eu estava ausente na deles. Pai, Mãe, Giovanna, Nathália, Samuel: amo vocês!

Ao Fábio, que me apresentou a Ecologia e a Limnologia e me mostrou os caminhos existentes na carreira científica, fazendo-me ver as conseqüências de seguir cada um deles. A ele também agradeço as oportunidades oferecidas durante minha graduação e mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado que me foi concedida.

À Dra. Vera Huszar, à Dra. Lúcia Helena Silva e ao Dr. Marcelo Marinho pelas cópias de artigos enviadas, subsídio essencial para a elaboração desse trabalho.

À Camila, pela revisão do relatório e do manuscrito “com a visão de quem não é da área” e pela companhia e incentivo durante a finalização desse trabalho.

Ao meu primo Raphael pela ajuda na “limpeza” das imagens.

À Simone pelo apoio no planejamento e execução dos experimentos e na discussão dos resultados – sem sua dedicação e incontáveis horas no microscópio teria sido mais difícil continuar. À Marcela, por cuidar das nossas “alguinhas”, tratá-las como filhas e fazê-las crescerem e ficarem verdinhas! Ao Emílio e ao Gladson, pelo apoio na preparação e durante a execução dos experimentos e das coletas. À Marina e à Mariana, por me ajudarem a entrar no mundo das “alguinhas”. Ao Felipe e a Natália, pelas análises de fósforo. À Lúcia, pelas contagens de bactérias. Ao Alessandro, pelas conversas pessoais e profissionais. Ao Caique pelas risadas e momentos de descontração durante essa jornada. À Raquel, por discordar de mim e me fazer ver a importância de discordar das coisas. À Priscila, Eliese e Luciana, pela companhia durante todo esse período. A todos vocês, meus colegas de laboratório, obrigada pela amizade, foi bom estar com vocês!

Sumário

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Índice de figuras.....	x
1. Introdução	1
2. Objetivo	7
3. Capítulo 1: Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	
3.1. Introdução.....	8
3.2. Métodos.....	11
3.3. Resultados.....	14
3.4. Discussão.....	18
4. Capítulo 2: Morfologia e crescimento de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> em cultivo sob limitação de fósforo	
4.1. Introdução.....	19
4.2. Métodos.....	22
4.3. Resultados.....	25
4.4. Discussão.....	31
5. Discussão geral.....	35
6. Referências Bibliográficas.....	37

Resumo

Cylindrospermopsis raciborskii é uma cianobactéria filamentosa fixadora de nitrogênio que tem se tornado alvo de diversos estudos devido a sua toxicidade potencial e sua elevada adaptabilidade ecofisiológica. Seu sucesso adaptativo é atribuído, dentre outras coisas, a sua tolerância à baixa disponibilidade de luz e sua elevada afinidade por fósforo, além da capacidade de estocar esse nutriente. Devido a recente ocorrência de florações de *C. raciborskii* em todo o mundo, faz-se necessário estudar a ecologia e fisiologia dessa espécie visando o controle das florações. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos da limitação de fósforo nas taxas de produtividade e eficiência fotossintética, na morfologia e no crescimento de populações tóxicas e não tóxicas de *C. raciborskii*. As cepas utilizadas apresentaram baixa eficiência fotossintética, sendo esta ainda menor após período de limitação de fósforo, o que foi atribuído ao baixo conteúdo de clorofila *a*. No entanto, a produtividade específica foi elevada, mesmo após a limitação por fósforo. Tal fato é certamente essencial para o desencadeamento de florações. A limitação de fósforo imposta as cepas provocou diminuição na relação superfície:volume das células, crescimento lento, aparecimento de heterocitos e acinetos e aparecimento de filamentos com células de diferentes tamanhos evidenciando a importância desse nutriente na determinação da morfologia de *C. raciborskii*. As alterações morfológicas relacionadas à diminuição do tamanho celular também estão relacionadas à baixa eficiência fotossintética devida a alterações na arquitetura celular. Os resultados encontrados sugerem cautela na identificação exclusivamente morfológica da espécie bem como demonstram que a interrupção do aporte de fósforo em ecossistemas aquáticos sujeitos a florações de *C. raciborskii*, enquanto medida isolada, não é suficiente para prevenir a ocorrência desses eventos.

Abstract

Cylindrospermopsis raciborskii is a filamentous cyanobacteria able to fix N₂ and has been object of many studies because of its potential toxicity and wide ecophysiological adaptability. Its success is ascribed to, among other things, its shade adaptability, high affinity for phosphorus besides being able to store this nutrient. Since there has been many recent blooms of *C. raciborskii* around the world it become indispensable to know the ecology and physiology of these species. These work intent to evaluate the effects of phosphorus limitation on photosynthetic efficiency, morphology and growth of *C. raciborskii*. The species showed a low photosynthetic efficiency (α) under natural conditions and an even lower α after P limitation, which were attributed to its low chlorophyll *a* content. However, *C. raciborskii* had a high photosynthetic capacity (P_m^b), before and after P limitation period. These ability is essential for the development of blooms. P limitation also reduced the growth and induced extreme morphological changes, such as: low surface:volume ratio, formation of akinetes, trichomes with different cell sizes proving the relevance of these nutrient on morphology of the species. These morphological changes had also influenced the low α found in these work. Our results suggest prudence on the taxonomic identification of *C. raciborskii* based on morphological characteristics and they demonstrate that the discontinuity on P load to aquatic ecosystems subject to *C. raciborskii* blooms does not assure that the blooms will not happen.

Índice de Figuras

Figura 1.1.....	10
Figura 1.2.....	16
Figura 1.3.....	17
Figura 2.1	26
Figura 2.2	28
Figura 2.3	29
Figura 2.4	29
Figura 2.5	30

1. Introdução

Em suas atividades, os homens têm utilizado os recursos hídricos para uma série crescente de finalidades (abastecimento, recreação, irrigação) e, em virtude dessa necessidade, a qualidade da água dos ecossistemas aquáticos vem decaindo de forma drástica. Rios, lagos, estuários e reservatórios têm enfrentado um problema cada vez mais comum denominado eutrofização artificial.

A eutrofização é, a princípio, um processo que ocorre naturalmente em corpos de água doce, sendo considerado como o envelhecimento natural desses ecossistemas. Esse processo consiste no enriquecimento dos ecossistemas aquáticos em nutrientes como fósforo, nitrogênio, carbono, sílica, etc. Milhares de anos podem se passar até que um lago apresente as condições ideais para sustentar formas aquáticas de vida, passando de um estado de baixa concentração de nutrientes na coluna d'água chamado de oligotrófico para uma condição mesotrófica, ou seja, de concentração de nutrientes intermediária e, posteriormente, para a condição eutrófica, que é caracterizada pela elevada concentração de nutrientes neste ambiente.

No entanto, a ação antrópica vem acelerando a eutrofização que passa a ser chamada, neste caso, de eutrofização artificial ou cultural. Este processo é caracterizado pelo aumento rápido nas concentrações de nutrientes (fósforo e nitrogênio, principalmente) para os organismos aquáticos fotossintetizantes (fitoplâncton, cianobactérias e macrófitas), possibilitando seu rápido e excessivo crescimento. Em condições naturais, os nutrientes envolvidos são carreados até os lagos, rios ou represas através das chuvas e águas superficiais, que erodem e lavam a superfície terrestre. De outra forma, a má utilização e ocupação do solo, o elevado uso de fertilizantes agrícolas, a redução da mata nativa, a destruição da mata ciliar e a pecuária são responsáveis por aumentar a descarga de nutrientes nos corpos d'água contribuindo para a aceleração da eutrofização, bem como para o assoreamento do leito de rios e exposição das áreas de nascentes a crescentes processos de erosão

nas margens. Além disso, o despejo direto de efluentes domésticos e industriais não tratados nos corpos d'água também promove a entrada excessiva de nutrientes em rios, lagos e represas.

No Brasil, um panorama da qualidade dos recursos hídricos foi traçado pelo projeto "Brasil das Águas", executado nos anos 2003 e 2004 (Moss & Moss 2005). Cerca de 500 corpos d'água, incluindo rios, igarapés, lagoas e represas, foram amostrados para análise da qualidade da água. Os resultados deste projeto indicam que 40% dos corpos d'água brasileiros amostrados são oligotróficos enquanto que 25,3% se encontra no estado eutrófico. A maior parte das águas oligotróficas encontra-se nas regiões norte e oeste do país, onde a densidade populacional e, por conseqüência, a demanda por água é mais baixa. Já os corpos d'água eutrofizados encontram-se ao longo do litoral brasileiro concentrados nas regiões sul e sudeste, onde a demanda por água é muito maior.

A eutrofização artificial traz prejuízos ambientais e econômicos. A biodiversidade aquática é afetada, sofrendo perdas significativas e os corpos d'água tornam-se impróprios para uso humano. Dentre os vários prejuízos causados pela eutrofização, podemos destacar o crescimento excessivo de algas e/ou cianobactérias. Quando apenas um desses organismos ou poucas espécies crescem excessivamente têm-se o que chamamos de florações - "blooms" no termo em inglês.

Cianobactérias ou algas azuis esverdeadas (Cyanophyceae) são um grupo de microrganismos uni ou multicelulares, procariotos, que possuem clorofila *a* e realizam fotossíntese através dos fotossistemas I e II (Castenholz & Waterbury 1989). Esses organismos estiveram entre os pioneiros na evolução da Terra, cerca de 2,5 bilhões de anos atrás e eram, naquele tempo, provavelmente, os principais produtores primários de matéria orgânica e os primeiros organismos a liberar oxigênio na atmosfera primitiva (Chorus & Bartram 1999). As cianobactérias podem colonizar nichos ecológicos diferentes, uma vez que são capazes de crescer continuamente na presença de oxigênio; de produzir pigmentos acessórios usados para aumentar a

eficiência da absorção de luz; e de utilizarem a água como o doador de elétrons para a redução do dióxido de carbono no processo fotossintético (Whitton 1992). Além disso, esses organismos possuem habilidade de armazenar nutrientes e metabólitos secundários em seu citoplasma.

Alguns grupos de cianobactérias produzem metabólitos que são tóxicos e cuja função ecológica ainda não está clara apesar de alguns destes metabólitos apresentarem efeitos na biota (Chorus & Bartram 1999). Nos seres humanos, as cianotoxinas, como são chamados alguns desses metabólitos, podem afetar o fígado (hepatotoxinas), o sistema nervoso (neurotoxinas), a pele (dermatotoxinas) e inibir a síntese protéica (citotoxinas).

Em ecossistemas utilizados pela população, a ocorrência de cianobactérias torna-se particularmente preocupante, pois vários de seus gêneros e espécies formam florações e podem produzir toxinas. No Brasil, grande parte dos reservatórios apresenta florações de cianobactérias na maior parte do ano (Huszar & Silva 1999). A incidência de cianobactérias potencialmente tóxicas é maior na região leste do país (Moss & Moss 2005), área de elevada densidade populacional e, por conseqüência, onde os riscos das toxinas à saúde pública tornam-se maiores.

Intoxicações de populações humanas causadas pelo consumo de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países como Austrália e Estados Unidos (Lippy & Erb 1976), China (Yu 1995) e Zimbábue (Zilberg 1966). O primeiro caso confirmado de mortes humanas causada por cianotoxinas ocorreu no Brasil (Caruaru/PE) em 1996 (Azevedo *et al.* 2002, Carmichael 1998). Estudos já confirmaram a ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público dos estados de São Paulo (Lagos *et al.* 1999), Rio Grande do Sul (Yunes *et al.* 2000), Minas Gerais (Jardim, 1999) e Pernambuco (Nascimento 2000, Bouvy *et al.* 1999).

Algumas das espécies de cianobactérias dominantes nos ecossistemas aquáticos brasileiros coincidem com as encontradas em ambientes de região

temperada, tais como *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena solitaria* e *Anabaena circinalis* (Paerl 1988). Entretanto, de acordo com Huszar & Silva (1999), espécies que não são frequentemente registradas como dominantes nesses ecossistemas são comuns em sistemas tropicais brasileiros, como *Cylindrospermopsis raciborskii* (principalmente em reservatórios) e *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, *Synechococcus elongatus* e *Jaaginema subtilissima* (em lagoas costeiras).

O gênero *Cylindrospermopsis* é típico de regiões tropicais, sendo *C. raciborskii* a única espécie que ocorre em regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas de todos os continentes, exceto a Antártica (Pàdisak 1997). Suas principais características morfológicas são: filamentos isopolares, solitários (não formam colônia), retos ou espiralados, cilíndricos ou ligeiramente estreitos nas extremidades (Komárková, 1998). Os heterocitos formam-se exclusivamente a partir das células terminais, depois de uma divisão assimétrica da menor parte da célula apical (Komárková, 1998; Sant'anna & Azevedo, 2000). Atualmente, com oito espécies descritas, *Cylindrospermopsis* foi separado do gênero *Anabaenopsis* com base na morfologia dos tricomas e na formação apical dos heterocitos (Seenayya & Subba-Raju 1972).

Do ponto de vista ecológico, estes organismos apresentam grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, com ocorrência descrita desde em reservatórios oligotróficos de regiões subtropicais até em lagos tropicais hipereutróficos, onde as concentrações de nutrientes são extremamente elevadas (Padisák 1997). No Brasil, as mais antigas ocorrências de *C. raciborskii* são para o reservatório de Itaipu (Andrade *et al.* 1988) e para o lago Paranoá, em Brasília (Branco e Senna, 1994). De acordo com Marinho *et al.* (2005), inúmeros novos casos de ocorrência foram relatados, sobretudo em reservatórios documentando, em sua maioria, eventos de florações (Huszar *et al.* 2000; Bouvy *et al.* 1999; Tucci & Sant'Anna 2003; Barroso 2000; Marinho & Huszar 2002) e ocorrência em lagoas costeiras (Komárková *et al.* 1999; Konrath 1995; Melo 2001; Pedrosa *et al.* 1999).

Aliadas às condições ambientais favoráveis, algumas características ecofisiológicas têm sido consideradas como potencializadoras da dominância de *Cylindrospermopsis* nos sistemas eutrofizados. A capacidade de regular sua flutuação permite a exploração de diferentes estratos da coluna e, conseqüentemente, o melhor aproveitamento da disponibilidade de luz e nutrientes. *Cylindrospermopsis raciborskii* é considerada uma espécie de sombra, com baixo requerimento de luz, apresenta alta taxa de assimilação de amônio e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (Padisák, 1997). Possui também elevada afinidade por fósforo, sendo capaz de estocar esse nutriente, além de ser resistente à predação pelo zooplâncton (Padisák 1997). Hawkins (1996) sugeriu também que a estabilidade da coluna d'água favorece a dominância e a formação de florações de *C. raciborskii*. No entanto ainda não se sabe quais fatores são os principais responsáveis pela crescente ocorrência e/ou dominância de *Cylindrospermopsis*.

Assim como cerca de 60% de todas as cianobactérias estudadas até hoje (Chorus & Bartram 1999), *C. raciborskii* é potencial produtora de toxina. Dentre as toxinas possíveis de serem encontradas nessa espécie, estão as neurotoxinas, hepatotoxinas e a cylindrospermopsina, um alcalóide de efeito citotóxico, que bloqueia a síntese de proteínas afetando rins e fígado (Marinho *et al.* 2005; Chorus & Bartram 1999). A produção de cylindrospermopsina e um análogo não tóxico, denominado deoxicilindrospermopsina, só foi verificada até hoje em cepas australianas, tailandesas e em uma cepa japonesa de *C. raciborskii* (Li *et al.*, 2001; Chonudomkul *et al.*, 2004). Sintomas de intoxicação humana por cylindrospermopsina podem levar dias para aparecer, sendo frequentemente difícil identificar a relação de causa e efeito entre os sintomas e a exposição à toxina (Chorus & Bartram 1999). Intoxicação humana por cylindrospermopsina foi relatada na Austrália após aplicação de sulfato de cobre em um reservatório de abastecimento público que apresentava florações de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Em cerca de uma semana 140 crianças e 10 adultos foram internados com hepato-enterite aguda (Byth 1980). Dado o risco de intoxicação

de seres humanos em razão da ocorrência freqüente de florações tóxicas de *C. raciborskii* em reservatórios de abastecimento, existe uma clara necessidade de conhecer a fisiologia e a ecologia dessa espécie, visando ao controle dessas florações. Além disso, as flutuações temporais e espaciais na composição e biomassa da comunidade fitoplanctônica podem, em geral, ser indicadores eficientes das alterações naturais ou antrópicas nos ecossistemas aquáticos. O curto tempo de geração das algas e cianobactérias (horas a dias) permite que sejam melhor compreendidos processos importantes como a sucessão ecológica, tornando essas comunidades úteis como modelo para o melhor entendimento de outras comunidades (Harris 1986, Sommer 1989) e dos ecossistemas em geral (Reynolds 1997).

Um importante descritor da ecologia e fisiologia de comunidades planctônicas são as taxas de produtividade primária definidas por Flynn (1988) como a formação de matéria orgânica particulada nos primeiros elos da teia trófica. Os cálculos de eficiência estimados a partir da ponderação entre produtividade e gastos respiratórios, biomassa e recursos disponíveis proporcionam um consistente entendimento dos fluxos de energia. Tal entendimento possibilita o desenvolvimento de modelos funcionais descritivos e preditivos (Roland e Esteves, 1998).

No entanto, estudos sobre a produtividade e a eficiência fotossintética de *C. raciborskii* são escassos, sendo encontrados apenas para sistemas naturais, onde essa espécie não é a única produtora primária presente na comunidade planctônica como, por exemplo, em Dokulil & Mayer (1996). Além disso, o efeito da limitação de nutrientes, principalmente o fósforo, na produção de energia por *C. raciborskii* é pouco conhecido. Espera-se que a limitação por fósforo provoque não só uma diminuição na eficiência fotossintética, uma vez que esse nutriente é essencial para os processos de produção de energia, como também estimule o aparecimento de formas de resistência, os acinetos, em resposta à situação ambiental considerada adversa. Como esses organismos se alimentam por difusão dos nutrientes através da membrana celular e o transporte citoplasmático de substâncias também é feito por

difusão, espera-se que ocorram alterações morfológicas a fim de melhor absorver os nutrientes.

É importante destacar que estudos sobre ecofisiologia do fitoplâncton com culturas de laboratório são importantes por permitirem a obtenção do conhecimento sobre as estratégias e fatores que estimulam a resposta adaptativa das espécies, tornando as extrapolações para a natureza mais realistas (Zevenboom, 1987).

2. Objetivo

O presente estudo visa a avaliar os efeitos da limitação de fósforo nas taxas de produtividade e eficiência fotossintética, na morfologia e no crescimento de populações tóxicas e não tóxicas de *C. raciborskii*.

3. Capítulo 1

Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética de *Cylindrospermopsis raciborskii*

3.1. Introdução

As cianobactérias são microrganismos que ocorrem com frequência em corpos d'água eutrofizados sendo particularmente importantes devido ao potencial de produzir toxinas, podendo causar prejuízos a saúde humana e animal através do contato direto ou indireto com essas substâncias. As toxinas são metabólitos cuja função ainda não está clara, apesar de algumas delas apresentarem efeitos na biota (Chorus e Bartram, 1999). Nos seres humanos, as cianotoxinas, como são chamadas, podem afetar o fígado (hepatotoxinas), o sistema nervoso (neurotoxinas), a pele (dermatotoxinas) e inibir a síntese protéica.

As florações de cianobactérias são vêm aumentando em intensidade e frequência, tornando-se possível identificar um cenário de dominância desses organismos em diversos reservatórios brasileiros (Huszar & Silva 1999). Uma espécie de cianobactéria tipicamente tropical tem recebido especial atenção dos pesquisadores em todo mundo devido a sua potencial toxicidade e seu comportamento invasivo nas grandes latitudes (Briand *et al.* 2004). Trata-se da *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju. Esta espécie apresenta elevada adaptabilidade fisiológica e diversas características relevantes ao seu sucesso adaptativo, como: capacidade de regular a flutuação; tolerância à baixa disponibilidade de luz; elevada afinidade por amônio e por fósforo; capacidade de fixar nitrogênio e de armazenar fósforo; e resistência a predação (Padisák 1997).

O conhecimento da dinâmica da comunidade fitoplanctônica pode ser indicador eficiente das alterações naturais ou antrópicas nos ecossistemas aquáticos. Devido a

recente ocorrência de florações de *C. raciborskii* (Borics *et al.* 2000; Dokulil & Mayer 1996; Couté *et al.* 1997. Briand *et al.* 2002; Fastner *et al.* 2003; Ryan & Hamilton 2003) tem surgido uma clara necessidade de conhecer a fisiologia e a ecologia dessa espécie, visando ao controle dessas florações. Nesse contexto, a produção primária, definida como a formação de matéria orgânica particulada nos primeiros elos da cadeia trófica (Flynn 1988), destaca-se como um importante descritor da dinâmica funcional de comunidades planctônicas.

A produtividade primária é um conceito ilusoriamente simples que mascara uma complexa inter-relação entre processos bioquímicos, fisiológicos e ecológicos (Geider & McIntyre 2002). A curva fotossíntese-irradiância (P_{xI}) (figura 1.1), ao relacionar a produtividade específica (produtividade por unidade de biomassa; P_b) à irradiância (I), retrata alguns desses processos e exerce papel central em todos os estudos teóricos de produtividade fitoplanctônica. Admite-se que a curva P_{xI} seja melhor descrita por uma hipérbole retangular (Jassby & Platt 1976), da seguinte forma:

$$P^b = P_m^b \tanh(\alpha I / P_m^b)$$

onde P_m^b corresponde a produtividade específica máxima sob saturação luminosa, α corresponde a inclinação da porção linear inicial da curva. O eixo das abscissas corresponde a intensidade luminosa “ I ”, o eixo das ordenadas a P^b e a assíntota (reta tangente à hipérbole) representa a taxa de produtividade máxima (P_m^b).

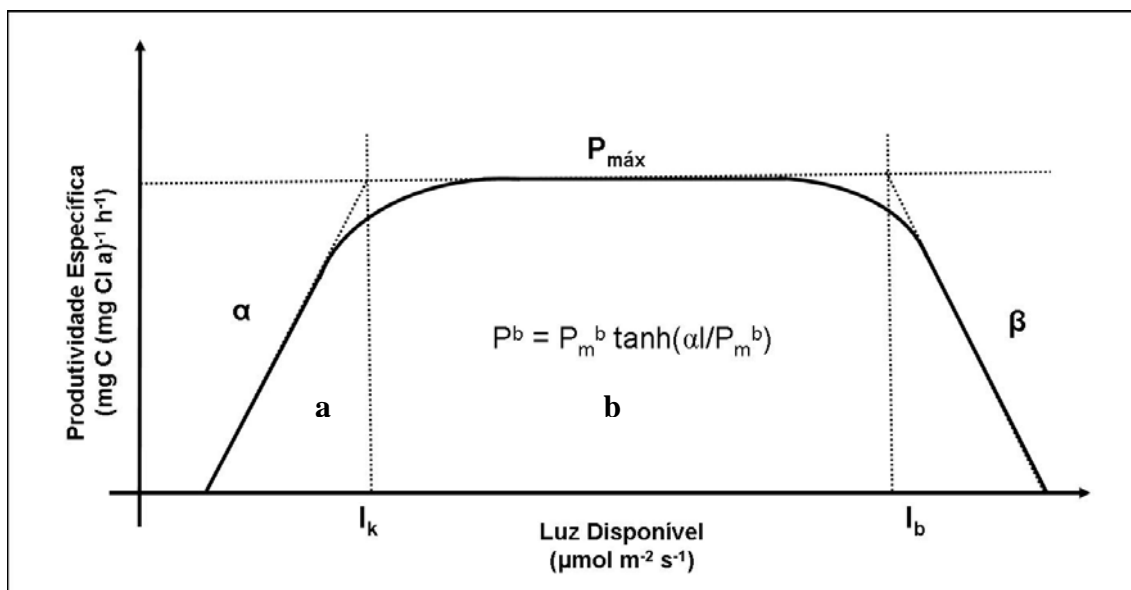


Figura 1.1: Curva fotossíntese-irradiância geral e equação que descreve a curva, segundo Platt e Jassby (1976). Os parâmetros que descrevem a curva são: P^b , produtividade específica, ou seja, produtividade por unidade de biomassa; P_m^b , correspondente à produtividade específica máxima sob saturação luminosa; α , correspondente à inclinação da porção linear inicial da curva; β , correspondente à inclinação da porção linear final da curva; I_k , correspondente à intensidade em que se inicia a saturação luminosa da produtividade; e I_b , correspondente à intensidade em que se inicia a inibição da produtividade por luz. A região “a” da curva corresponde a fase de limitação por luz e a região “b” àquela de saturação luminosa.

O parâmetro α é considerado um índice de eficiência fotossintética, sendo largamente utilizado para comparar o desempenho dos organismos fotossintetizantes independentemente de seus atributos específicos ou das diferenças metodológicas existentes. Em condições luminosas inferiores àquelas que poderiam causar fotoinibição, a curva Pxl pode ser satisfatoriamente descrita matematicamente por uma expressão contendo apenas dois parâmetros livres: α e P_m^b (Platt & Jassby 1976; Jassby & Platt 1976). Este último parâmetro é também chamado de índice de assimilação (Jassby & Platt 1976) ou a medida da capacidade fotossintética das células numa dada condição de temperatura e disponibilidade de nutrientes (Kalf 2006). A parte esquerda da curva Pxl, ou seja, quando a produtividade encontra-se limitada por luz (região “a”), é a parte mais útil para comparar o desempenho dos organismos fotossintéticos. Nesta região, as taxas fotossintéticas são controladas principalmente por reações fotoquímicas independentes de temperatura (Kalf 2006). Já na região de saturação luminosa, (região “b”), a fotossíntese é limitada

principalmente por reações bioquímicas, ao invés de fotoquímicas, e está largamente sujeita aos efeitos da temperatura (Kalf 2006). Os efeitos da temperatura, disponibilidade de nutrientes e ritmos diários e adaptativos podem ser representados matematicamente por sua influência nos parâmetros básicos P_b e α (Platt & Jassby 1976). O presente trabalho buscou, pois, identificar os efeitos da limitação de fósforo nos parâmetros fotossintéticos de populações de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

3.2. Métodos

Foram realizados dois experimentos de produtividade com uma cepa tóxica (T3; produtora de saxitoxina) e uma não tóxica (NPCP) de *C. raciborskii*, ambas isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros (Represa de Guarapiranga-SP e Lago Paranoá Brasília-DF, respectivamente). As cepas foram gentilmente cedidas pela Dra Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A cepa tóxica utilizada foi a primeira cepa sul-americana na qual foi identificada a produção de saxitoxina (Lagos *et al.* 1999).

O primeiro experimento – experimento A – foi realizado em condições normais de cultivo, descritas a seguir, e o segundo experimento – experimento B – ocorreu após submeter às cepas à limitação por fósforo (“dieta”). Em experimentos realizados por Junqueira-Melgaço (2007), foi verificado o colapso da cepa tóxica de *C. raciborskii* após dez dias de limitação por fósforo. Esse período foi considerado, pois, como o período mínimo a ser utilizado no experimento. Por conveniências logísticas e buscando-se deixar as cepas o máximo de tempo possível sob limitação de fósforo, o período de dieta totalizou 21 dias.

No Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora as cepas do experimento A foram mantidas em meio ASM 1 (Gorham *et al.* 1964) e as do experimento B em meio ASM-1 sem fósforo. Durante todo o período as cepas

estiveram aeradas, a 26°C e submetidas foto-período de 12 horas, com fluxo de fótons de densidade média de $170 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A aeração foi realizada com auxílio de compressor de ar para aeração em aquário. Os cultivos foram unialgais, do tipo não axênicos (incluíam a presença de bactérias) e lote (“batch”), no qual os nutrientes vão diminuindo e o número de células aumenta até a capacidade suporte. Neste tipo de cultivo, há indivíduos em todos os estágios de crescimento e o estado fisiológico das células não é necessariamente semelhante. A densidade bacteriana foi analisada no cultivo antes do experimento através de microscopia de epifluorescência após coloração com acridina laranja (Hobbie *et al.* 1977). No cultivo da cepa não tóxica a densidade de bactérias era de $0,98 \times 10^{-6}$ céls ml^{-1} e, na cepa tóxica, de $0,40 \times 10^{-6}$ céls ml^{-1} .

Os experimentos A e B foram realizados em um aparelho com sistema de regulação de intensidade luminosa e temperatura. As intensidades luminosas foram medidas em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com radiômetro LICOR modelo 1000 equipado com sensor esférico para radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Para a determinação das intensidades luminosas utilizadas, foi feito um teste inicial com as duas cepas em cinco intensidades: 10, 30, 80, 140 e 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, atribuídas aleatoriamente. Como não foi observada saturação luminosa em nenhuma das cepas (a produtividade foi crescente), fez-se necessário aumentar as intensidades luminosas utilizadas e o número de intensidades. Estabeleceram-se então oito intensidades luminosas a serem testadas, a saber: 350, 295, 250, 160, 125, 60, 30 e 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A produtividade primária foi medida em frascos claros e escuros (em triplicata) através do método do oxigênio e convertida para carbono a partir dos coeficientes fotossintético (PQ=1,2) e respiratório (RQ=1,0) (Wetzel & Likens 1991). As concentrações de oxigênio foram determinadas por espectrofotometria (Roland *et al.* 1999). De acordo com Strickland & Parsons (1972), este método do oxigênio é aplicável a intervalos de 3 a 2000 $\mu\text{g C m}^{-3} \text{h}^{-1}$. Assumindo PQ=1,2 e p=0,05, o limite de detecção do método corresponderá a 20 $\mu\text{g C L}^{-1}$ (Strickland, 1960).

A densidade de *C. raciborskii* foi analisada como descrito em Sipaúba-Tavares & Rocha (2003), após preservação em lugol. O método consiste na contagem do número de células em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. A câmara apresenta marcações de dimensões conhecidas, o que facilita o trabalho, além de requerer pequeno volume de amostra. O biovolume celular (em μm^3) foi calculado a partir da fórmula do cilindro sendo a biomassa obtida a partir deste (Wetzel & Likens 1991), baseando-se na premissa de que o citoplasma desses organismos é predominantemente constituído de água e, por consequência, 1 g corresponderia a 1 ml (Gosselain *et al.* 2000). Uma vez que o volume de cultivo disponível para os experimentos era limitado, optou-se por não realizar a análise de clorofila *a* diretamente. Dessa forma, a biomassa em clorofila *a* foi obtida a partir da equação:

$$\text{Log } chl\ a = 1.00 \log v - 2.26$$

Onde *chl a* é o conteúdo celular de clorofila *a*, em pg, e *v* é o volume celular, em μm^3 (Reynolds 2006).

A produtividade específica foi calculada a partir da produtividade bruta, em $\text{mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e das medidas de biomassa, em mg de clorofila *a* L^{-1} . Os parâmetros fotossintéticos analisados foram: P^b ou produtividade específica (produtividade por unidade de biomassa), *I* ou intensidade luminosa, I_k ou índice de saturação luminosa (intensidade onde P^b é máxima), α ou inclinação da curva $P^b \times I$ em níveis baixos de *I*, P_m^b ou produtividade específica quando I_k é atingido.

A diferença da produtividade entre as cepas e em cada cepa antes e depois da dieta foi avaliada estatisticamente através do teste de Mann-Whitney uma vez que as amostras são independentes. O intervalo de confiança foi de 95% e as análises foram feitas na versão de avaliação do programa XLStat versão 7.5.2. Os pontos considerados pertencentes a parte linear da curva $P \times I$ foram separados e ajustados a regressão linear a fim de estimar o valor de α (Platt & Jassby 1976).

3.3. Resultados

No experimento realizado antes da dieta, o conteúdo celular de clorofila *a* era de 0,14 pg Cl a cél⁻¹ para as duas cepas. Ao final da dieta, a cepa não tóxica apresentava 0,02 pg Cl a cél⁻¹ e a cepa tóxica, 0,01 pg Cl a cél⁻¹. Em ambas as cepas, a produtividade específica antes da dieta foi significativamente menor do que depois da dieta ($p=0,023$ para a cepa não tóxica e $p=0,025$ para a cepa tóxica). Após a dieta, P^b foi, em média, sete vezes maior na cepa não tóxica e 25 vezes maior na tóxica. A cepa não tóxica apresentou-se significativamente mais produtiva ($p<0,05$) do que a cepa tóxica antes da dieta na maior parte das intensidades testadas (10, 125, 250, 295 e 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tal comportamento inverteu-se após a dieta, com a produtividade da cepa tóxica sendo significativamente maior ($p<0,05$) em metade das intensidades testadas (60, 160, 250 e 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e estatisticamente igual a da cepa não tóxica na outra metade (10, 30, 125 e 295 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A figura 1.2 mostra as curvas P_{xl} para cada cepa antes da dieta. A cepa não tóxica apresentou $\alpha = 0,59 \text{ mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$ ($n=6$; $r^2=0,97$) e a cepa tóxica apresentou $\alpha = 0,76 \text{ mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$ ($n=6$; $r^2=0,99$) (fig. 1.2b e 1.2c). A produtividade específica máxima média foi de 15,60 mg C (mg Cl a)⁻¹ h⁻¹ para a cepa não tóxica e 16,15 mg C(mg Cl a)⁻¹ h⁻¹ para a cepa tóxica, ambas com $I_k = 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fig. 1.2d)

Após a dieta, no entanto, a relação entre a produtividade específica e a luz não apresentou comportamento claramente próximo ao esperado, ou seja, ajustado a hipérbole retangular (figura 1.2d). No entanto, através da inspeção visual da figura 1.2a pode-se verificar que a cepa tóxica apresentou valores crescentes de produtividade até cerca de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (I_k) quando então se tornou saturada pela luz. Já a cepa não tóxica apresentou I_k novamente em torno de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para a cepa não tóxica P_m^b foi de 86,13 mg C (mg Cl a)⁻¹ h⁻¹ e para a cepa tóxica de 104,44 mg C (mg Cl a)⁻¹ h⁻¹ (fig. 1.2d). Ajustando-se a regressão a parte linear das curvas P_{xl}

apresentadas após a dieta, pode-se estimar $\alpha = 0,29 \text{ mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$ (n=6; $r^2=0,25$) para a cepa não tóxica e $0,38 \text{ mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$ (n=9; $r^2=0,52$) para a cepa tóxica (fig. 1.2b e 1.2c).

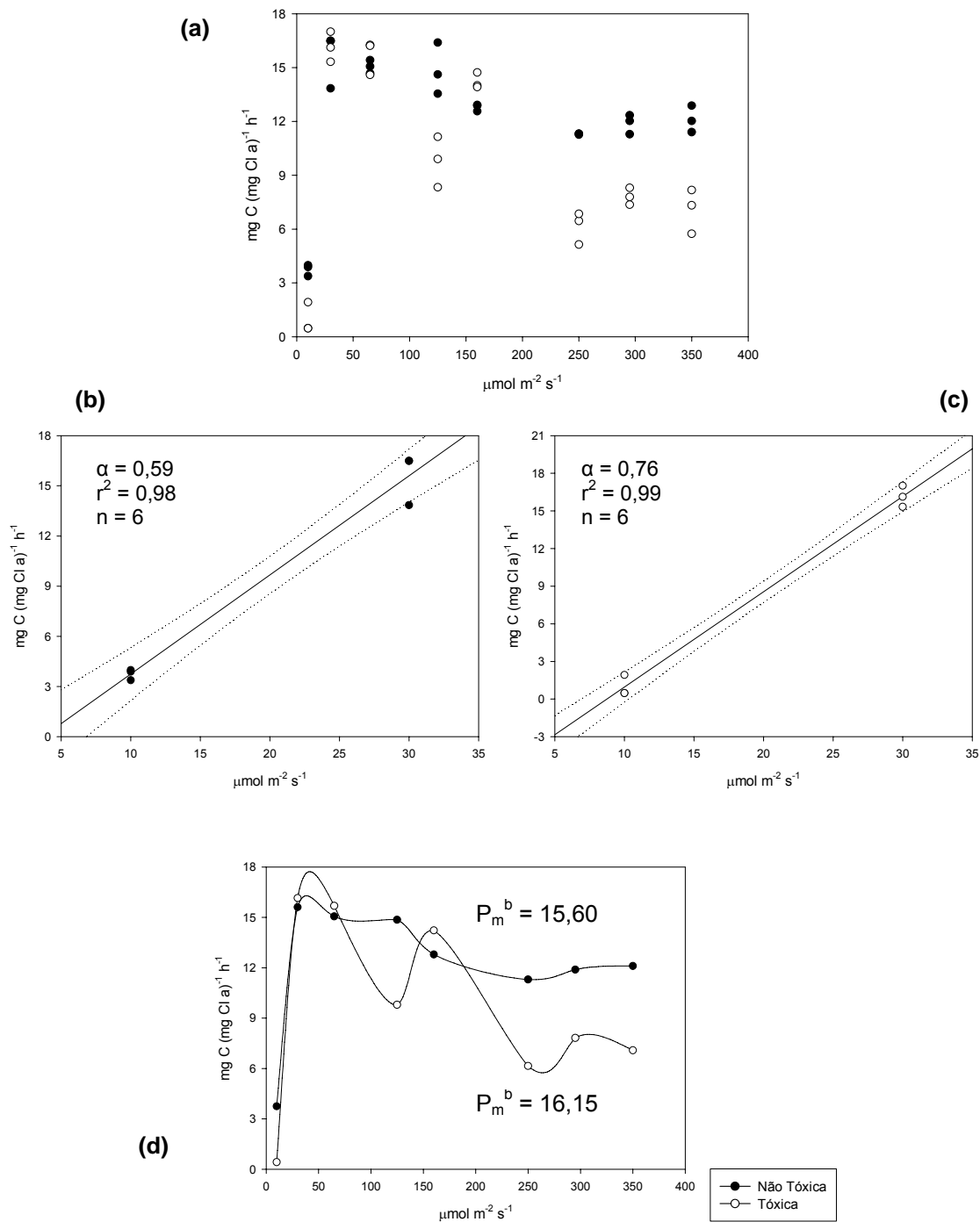


Figura 1.2: Curvas Pxl de cepas tóxica e não tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* antes de serem submetidas a limitação por fósforo. Em (a) tem-se todos os dados experimentais, realizados em tréplica. Em (b) e (c) têm-se a regressão ajustada à parte linear da curva, os valores de α (em $\text{mg C}(\text{mg Cl a})^{-1} \text{h}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$) e o r^2 . As linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança de 95%. Em (d) observam-se as curvas a partir dos valores médios de produtividade específica para cada intensidade luminosa testada e os valores médios máximos de P_m^b ($\text{mg C}(\text{mg Cl a})^{-1} \text{h}^{-1}$) observados para cada cepa.

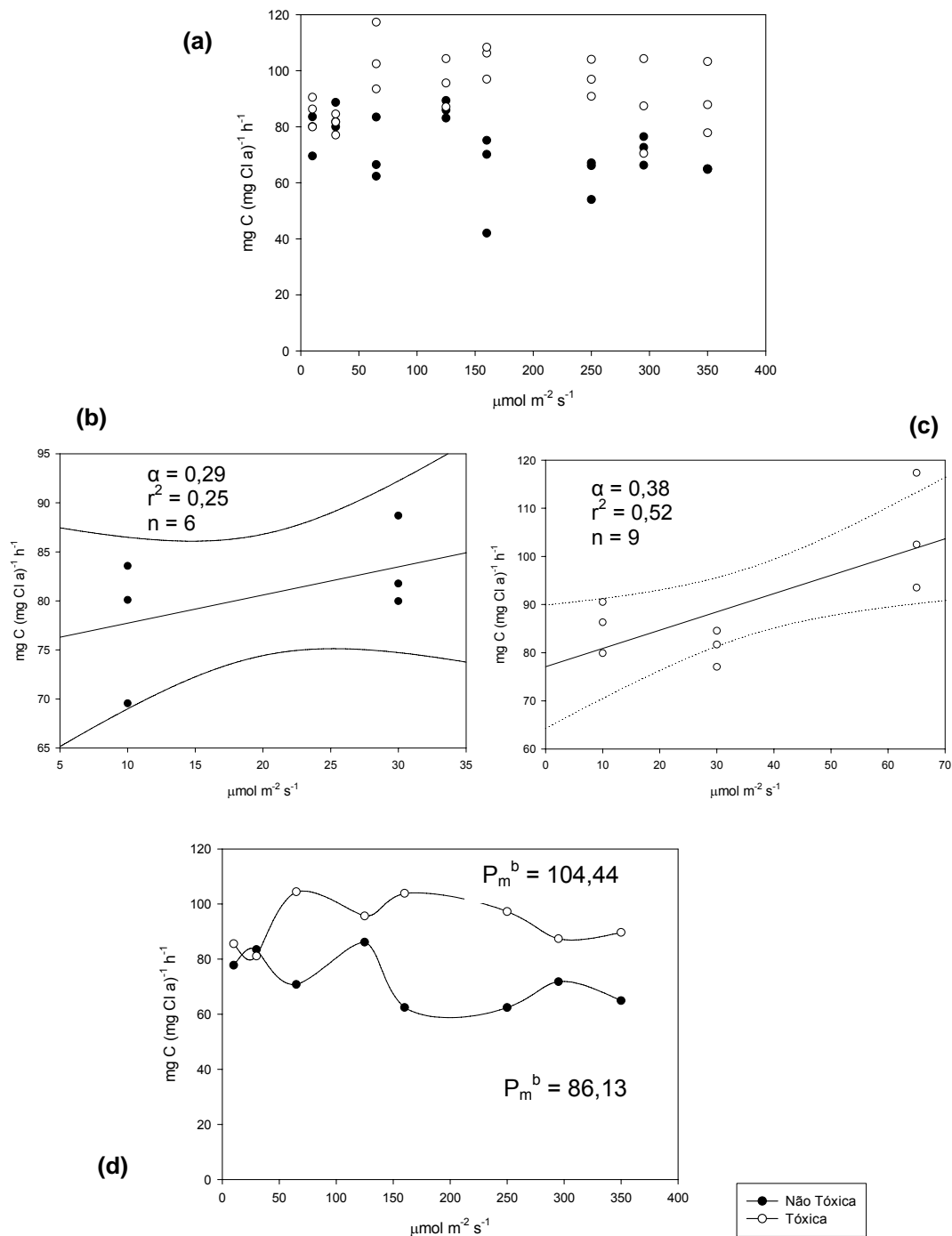


Figura 1.3: Curvas Pxl de cepas tóxica e não tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii* após serem submetidas a limitação por fósforo. Em (a) tem-se todos os dados experimentais, realizados em réplica. Em (b) e (c) têm-se a regressão ajustada à parte linear da curva, os valores de α (em $\text{mg C (mg Cl a)}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$) e o r^2 . As linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança de 95%. Em (d) observam-se as curvas a partir dos valores médios de produtividade específica para cada intensidade luminosa testada e os valores médios máximos de P_m^b ($\text{mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{h}^{-1}$) observados para cada cepa.

3.4. Discussão

A produtividade máxima nas duas cepas foi atingida em baixas intensidades luminosas, confirmando a adaptação desses organismos à sombra (Padisák 1997). No entanto, altas taxas de produtividade foram mantidas até intensidades elevadas, de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a foto-inibição não foi claramente observada em nenhuma das situações testadas. Ao contrário, Dokulil & Mayer (1996) relatam duas situações de fotoinibição da comunidade fitoplanctônica de um lago austríaco raso (cuja biomassa correspondia a 90% de *C. raciborskii*): uma a $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e outra a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nessas ocasiões, o índice de saturação luminosa foi de 60 e $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Foy & Gibson (1982a, b) relatam intensidades semelhantes de foto-inibição para *Limnothrix redekei*, enquanto *Planktothrix aghardii* tornou-se inibida pela luz a $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Van Liere & Mur 1979, 1980) e *Aphanizomenon flos-aquae* Elenk. a $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Uehlinger 1980).

A não observância da foto-inibição em nosso trabalho pode ser decorrente das condições de cultivo, anteriores ao experimento. Reynolds (2006) ressalta que o histórico luminoso recente das células representa papel relevante na determinação de suas eficiências fotossintéticas e no início da saturação luminosa. As cepas utilizadas foram cultivadas em intensidades relativamente altas de luz (cerca de $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) quando comparadas tanto ao índice de saturação encontrado em nosso trabalho quanto ao relatado na literatura. Aliada a manutenção de taxas de produtividade altas em intensidades elevadas de luz, a ausência de foto-inibição sugere que apesar de *C. raciborskii* ser favorecida por baixa luminosidade, esta espécie permanecerá boa competidora em altas intensidades de luz.

Os valores de produtividade máxima observados foram superiores aos encontrados para populações naturais de fitoplâncton. Platt & Jassby (1976) encontraram P_m^b médio em torno de $5 \text{ mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em ambientes costeiros da Nova Escócia. Cole *et al.* (1992) relatam valores de P_m^b entre 4 e $6 \text{ mg C (mg Cl a)}^{-1} \text{ h}^{-1}$

¹ para a comunidade fitoplanctônica do Rio Hudson (EUA). Tais trabalhos, porém foram realizados em ambientes de regiões temperadas, onde a temperatura é consideravelmente menor que a testada em nosso trabalho. Reynolds (2006), no entanto, traz P_m^b variando entre 7 e 20 mg C (mg Cl a)⁻¹ h⁻¹ para temperaturas de 27 a 30°C, próximas àquela utilizada no presente trabalho (26°C). Em condições normais, ou seja, de suficiência de nutrientes, pode-se dizer que *C. raciborskii* é uma espécie com elevada capacidade fotossintética uma vez que os valores de médios P_m^b encontrados antes da dieta estão próximos ao limite superior relatado por Reynolds (2006) (figura 1.2d).

De acordo com Reynolds (2006), a eficiência fotossintética (α) pode variar em média entre 6 e 18 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m² e com limites de 2 e 37 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m². Cole *et al.* (1992) trazem α entre 3-4 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m². Convertendo nossos valores para as unidades apresentadas, temos que α antes da dieta foi de 2,13 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m² para a cepa não tóxica e 2,7 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m² para a cepa tóxica. A eficiência fotossintética antes da dieta, portanto, estaria próxima aos valores mínimos relatados na literatura. Após a dieta, os valores de α corresponderiam a 1,04 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m² para a cepa não tóxica e 1,37 mg C (mg Cl a)⁻¹ mol⁻¹ m² para a cepa tóxica. A baixa eficiência fotossintética encontrada antes da dieta, bem como sua diminuição após o período limitante é atribuída ao baixo conteúdo de clorofila a dessas cepas e sua diminuição após o período de limitação por fósforo. Antes da dieta, ambas as cepas apresentavam conteúdo celular de clorofila a próximos aos encontrados em outras cianobactérias, como: *Woronichinia naegeliana* (0,2 pg cel⁻¹) e *Anabaena lemmermannii* (0,22 pg cel⁻¹) (Reynolds 2006) mas consideravelmente inferiores aos valores relatados por Foy & Gibson (1982a, b) para *Oscillatoria redekei* e por Wolf (1991) para *Oscillatoria limosa*. Após a limitação por fósforo, no entanto, o conteúdo de clorofila diminuiu cerca de dez vezes, comprometendo a capacidade dessas células em absorver e utilizar a luz disponível. Alterando seu conteúdo de pigmentos, as células tornam-se capazes de regular sua

eficiência fotossintética (Harris 1978). No entanto essa variação não é rápida, sendo necessária uma ou mais gerações para a adaptação cromática ser repassada geneticamente. Como as cepas utilizadas estiveram sob limitação de fósforo por três semanas e o tempo de duplicação de *C. raciborskii* em condições de cultivo foi de 0,58 dias, ou seja, 1,7 duplicações por dia (Hawkins 1996), pode-se dizer que houve tempo suficiente para as cepas se readaptarem as novas condições de nutrientes e regularem seu conteúdo de clorofila *a*.

De acordo com os valores de eficiência fotossintética (α) encontrados, pode-se dizer que *C. raciborskii* apresenta baixa eficiência de utilização da luz disponível e que essa eficiência é ainda menor em situações de limitação de fósforo. Tal fato contraria a hipótese apresentada por Bannister (1974) de que α seria um parâmetro relativamente estável uma vez que a absorção de luz em intensidades luminosas baixas estaria mais relacionada às reações fotoquímicas no cloroplasto do que nas condições de temperatura e nas adaptações das espécies. Variações em α também foram observadas por Platt & Jassby (1976). Tais autores argumentam que a hipótese de Bannister (1974) seria verídica para cloroplastos isolados, mas a eficiência fotossintética propriamente dita dependeria também da arquitetura celular e da habilidade de cada espécie em utilizar a luz disponível. No entanto, a capacidade fotossintética (P_m^b) dessa espécie é alta. Essa elevada capacidade de produção de matéria orgânica é provavelmente fator importante para a ocorrência de florações em ambientes aquáticos, mesmo aqueles em que ocorre limitação de nutrientes.

4. Capítulo 2

Morfologia e crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* em cultivo sob limitação de fósforo

4.1. Introdução

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju (Seenayya & Raju 1972) é uma cianobactéria filamentosa fixadora de nitrogênio que tem se tornado alvo de diversos estudos devido a sua toxicidade potencial e sua elevada adaptabilidade ecofisiológica. *C. raciborskii* ocorre em diversos ambientes, de lagos de tamanho e grau de trofia diferentes a rios e reservatórios (Komárkova *et al.* 1999). Seu sucesso adaptativo é atribuído a inúmeras razões, dentre elas: capacidade de regular a flutuação; tolerância à baixa disponibilidade de luz; elevada afinidade por amônia e por fósforo; capacidade de fixar nitrogênio e de armazenar fósforo; e resistência a predação (Padisák 1997).

Cylindrospermopsis é freqüentemente alvo de debates e impasses taxonômicos devido a suas semelhanças com outros gêneros, como *Anabaenopsis* e *Cylindrospermum*. A principal diferença em relação à *Anabaenopsis* consiste no desenvolvimento dos heterocitos a partir de células terminais (Padisák 1997). Em relação a *Cylindrospermum*, difere quanto à presença de vesículas de gás e à posição intercalar dos acinetos (Padisák 1997). Heterocitos e acinetos são células vegetativas de extrema importância ecológica para esta espécie. Os primeiros são células de parede fina e protoplasma hialino, capazes de fixar nitrogênio. Os acinetos são células grandes, também de parede fina, mas contendo material de reserva em seu protoplasma o que permite a sobrevivência da espécie sob condições desfavoráveis. No entanto, os heterocitos e os acinetos não estão sempre presentes nos filamentos, e sua ausência dificulta a identificação da espécie.

As variações morfológicas, apesar de estarem sob controle genético, são largamente influenciadas tanto pela diversidade de condições ambientais quanto pela fase de crescimento dos organismos. Através da análise do seqüenciamento de nucleotídeos de 16S rRNA, Saker *et al.* (1999) verificaram 99,8% de similaridade entre tricomas retos e curvados de *C. raciborskii* apesar das grandes diferenças morfológicas e fisiológicas entre os indivíduos.

O presente estudo busca investigar as variações morfológicas de *C. raciborskii* induzidas por uma condição ambiental específica, a limitação por fósforo, e a influência desta condição ambiental no crescimento da população.

4.2. Métodos

Os experimentos foram realizados com duas cepas de *C. raciborskii* – uma tóxica, produtora de saxitoxina, e uma não tóxica, ambas isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros (Represa de Guarapiranga-SP e Lago Paranoá Brasília-DF, respectivamente). As cepas foram gentilmente cedidas pela Dra Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A cepa tóxica utilizada foi a primeira cepa sul-americana na qual foi identificada a produção de saxitoxina (Lagos *et al.* 1999).

No Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora, as cepas foram mantidas em meio ASM-1 (Gorham *et al.* 1964), aeradas, a uma temperatura de 26°C e submetidas a foto-período de 12 horas, com fluxo de fótons de densidade média de 170 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em incubadora da marca Fanem modelo 347. A aeração foi realizada com auxílio de compressor de ar para aeração em aquário. Taxas de crescimento líquido positivas em *C. raciborskii* são observadas desde 20 a 35 °C e de 20 a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Briand *et al.* 2004). Dessa forma, as cepas utilizadas no presente estudo cresceram em condições suficientes de luz e

temperatura. Os cultivos foram unialgais, do tipo não axênicos (incluíam a presença de bactérias) e lote (“batch”), no qual os nutrientes vão diminuindo e o número de células aumenta até a capacidade suporte. Neste tipo de cultivo, há indivíduos em todos os estágios de crescimento e o estado fisiológico das células não é necessariamente semelhante. A densidade bacteriana foi analisada no cultivo antes do experimento através de microscopia de epifluorescência após coloração com acridina laranja (Hobbie *et al.* 1977). No cultivo da cepa não tóxica a densidade de bactérias era de $0,98 \times 10^{-6}$ céls ml⁻¹ e, na cepa tóxica, de $0,40 \times 10^{-6}$ céls ml⁻¹.

A partir dos cultivos existentes, chamados *ESTOQUE*, foram preparados, para cada cepa, novos cultivos após centrifugação (2000 r.p.m., 20 min, 25°C) e inoculação do *pellet* (material centrifugado, sem o sobrenadante) em meio ASM-1 sem fósforo. Tais cultivos foram denominados *DIETA*. Durante 21 dias a concentração de fósforo particulado e a densidade algal foram monitoradas e não foram repicadas, ou seja, não houve nenhuma adição de meio de cultivo às culturas nesse período. Em experimentos realizados por Junqueira-Melgaço (2007), foi verificado o colapso da cepa tóxica de *C. raciborskii* após dez dias de limitação por fósforo. Esse período foi considerado, pois, como o período mínimo a ser utilizado no experimento. Por conveniências logísticas e buscando-se deixar as cepas o máximo de tempo possível sob limitação de fósforo, chegou-se ao período de 21 dias de dieta. O monitoramento foi diário nos quatro primeiros dias de experimento e depois foi realizado em dias alternados, sempre no mesmo horário.

A análise de fósforo particulado foi feita seguindo o método de digestão por persulfato de potássio (Wetzel & Likens 1991). Após a coleta, 15 ml de amostra eram centrifugados para concentrar a biomassa presente (2000 rpm; 25°C; 20 min.) e congeladas sem o sobrenadante para serem analisadas posteriormente. Como os cultivos não eram axênicos, o fósforo particulado analisado incluía a biomassa de bactérias.

Os caracteres morfológicos – comprimento e diâmetro celular, comprimento e forma dos tricomas, volume celular, presença/ausência de heterocitos e acinetos – foram analisados em microscópio óptico e as medidas foram realizadas com ocular micrométrica em aumento de 1000x. Todos os tricomas presentes nos campos analisados foram contados e medidos em aumento de 400x. O comprimento celular foi obtido a partir das medidas de 90 células. Para o diâmetro celular foram medidas pelo menos 30 células.

A densidade de *C. raciborskii* foi analisada como descrito em Sipaúba-Tavares & Rocha (2003), após preservação em lugol. O método consiste na contagem do número de células em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. A câmara apresenta marcações de dimensões conhecidas, o que facilita o trabalho, além de requerer pequeno volume de amostra. O biovolume (em μm^3) foi calculado a partir da fórmula do cilindro sendo a biomassa obtida a partir deste (Wetzel e Likens 1991), baseando-se na premissa de que o citoplasma desses organismos, assim como o das algas, é predominantemente constituído de água e, por conseqüência, 1 g corresponderia a 1 ml (Gosselain *et al.* 2000). A taxa de crescimento populacional μ foi calculado segundo Fogg & Thake (1987). Estimativas do aumento e decréscimo populacional foram avaliadas através da taxa líquida de mudança na densidade (K; Dokulil & Mayer 1996), da seguinte forma:

$$K = \frac{\ln B_2 - \ln B_1}{t_2 - t_1}$$

Onde B_1 é a biomassa no tempo t_1 e B_2 a biomassa no tempo t_2 . $K=0,69 \text{ d}^{-1}$ é equivalente a uma duplicação ou, quando negativa, uma divisão por dia (Dokulil & Mayer 1996). Conseqüentemente, $K/0,69$ fornece o número de duplicações/divisões por dia.

4.3. Resultados

Morfologia

De maneira geral, foi observada acentuada diminuição do comprimento celular (medido entre os limites de uma célula e aquela adjacente) durante o período de dieta e aumento do tamanho do filamento. Os filamentos apresentaram-se retos nas duas cepas e aumentaram 4,5 vezes na cepa não tóxica ($15,39 \pm 1,10 \mu\text{m}$ a $67,72 \pm 14,35 \mu\text{m}$) e 2,4 vezes na cepa tóxica ($38,53 \pm 6,12 \mu\text{m}$ a $91,79 \pm 18,43 \mu\text{m}$). O comprimento celular diminuiu mais na cepa tóxica (50% versus 30% para a cepa não tóxica) e o diâmetro diminuiu em 50% em ambas as cepas, resultando em uma diminuição de cerca de 5 vezes no volume celular (figura 2.1). Tal fato tornou difícil a visualização da delimitação das células de ambas as cepas ao final do experimento, mesmo no aumento de 1000x (objetiva de 100x). O comprimento celular variou de 3,65 a 2,60 μm na cepa não tóxica (média = $3,2 \pm 0,41 \mu\text{m}$) e 3,88 a 1,85 μm (média = $3,14 \pm 0,68 \mu\text{m}$) na tóxica. O diâmetro celular variou de 1,54 a 2,94 μm (média = $2,3 \pm 0,56 \mu\text{m}$) na cepa não tóxica e 1,43 a 2,94 μm (média = $2,22 \pm 0,57 \mu\text{m}$) na cepa tóxica. A relação superfície:volume aumentou nas duas cepas, passando na cepa não tóxica de 0,27 a 0,47 e na cepa tóxica de 0,26 a 0,60.

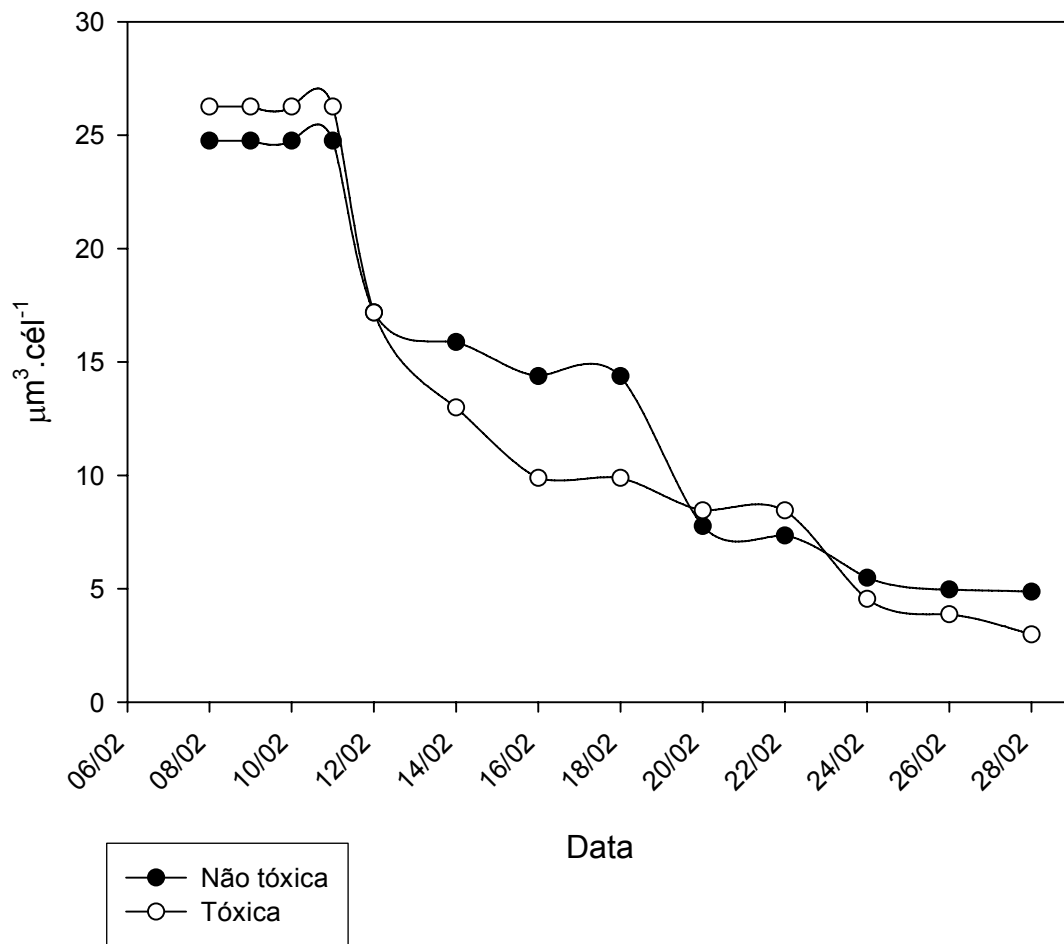


Figura 2.1. Variação do volume celular das cepas tóxica e não tóxica de *C. raciborskii* durante três semanas de limitação por fósforo.

Em ambas as cepas, foram observados filamentos com as células da extremidade menores que as da região intermediária (figura 2.2a). No entanto, o contrário foi observado com freqüência, ou seja, células da extremidade maiores que as células da região intermediária, principalmente na cepa tóxica. O aparecimento de heterocitos foi observado em torno do sexto dia de dieta para ambas as cepas, aumentando gradativamente com o passar do tempo e tornando-se, visualmente, muito freqüente na cepa tóxica ao décimo terceiro dia (figura 2.2b). Os heterocitos ocorriam tanto na extremidade quanto no meio do filamento. Divisões celulares foram observadas juntamente com o aparecimento de heterocitos em ambas as cepas.

No décimo sétimo dia de dieta, o aparecimento de acinetos tornou-se visualmente freqüente na cepa tóxica (figura 2.2c). De acordo com as observações registradas durante a contagem das amostras, estima-se que dois em cada cinco filamentos apresentaram acinetos (ca. 40%). Estes foram raramente observados na cepa não tóxica.

Crescimento

A cepa não tóxica entrou em crescimento exponencial no quarto dia, apresentando taxa de crescimento negativa de 0,018. A cepa tóxica entrou em crescimento exponencial somente no décimo terceiro dia de dieta, porém, com taxa de crescimento positiva de 0,017 (figura 2.3).

A taxa líquida de mudança na densidade populacional (K) variou entre $-0,45 \text{ d}^{-1}$ e $0,17 \text{ d}^{-1}$ para a cepa não tóxica, o que corresponde a $-0,7$ e $0,3$ divisões por dia. A cepa não tóxica apresentou K entre $-0,63 \text{ d}^{-1}$ e $0,37 \text{ d}^{-1}$, ou seja, $-0,9$ e $0,5$ divisões por dia. Para ambas as cepas, o K médio foi idêntico ($-0,02$) e a sua variação durante o período de dieta foi similar (figura 2.4).

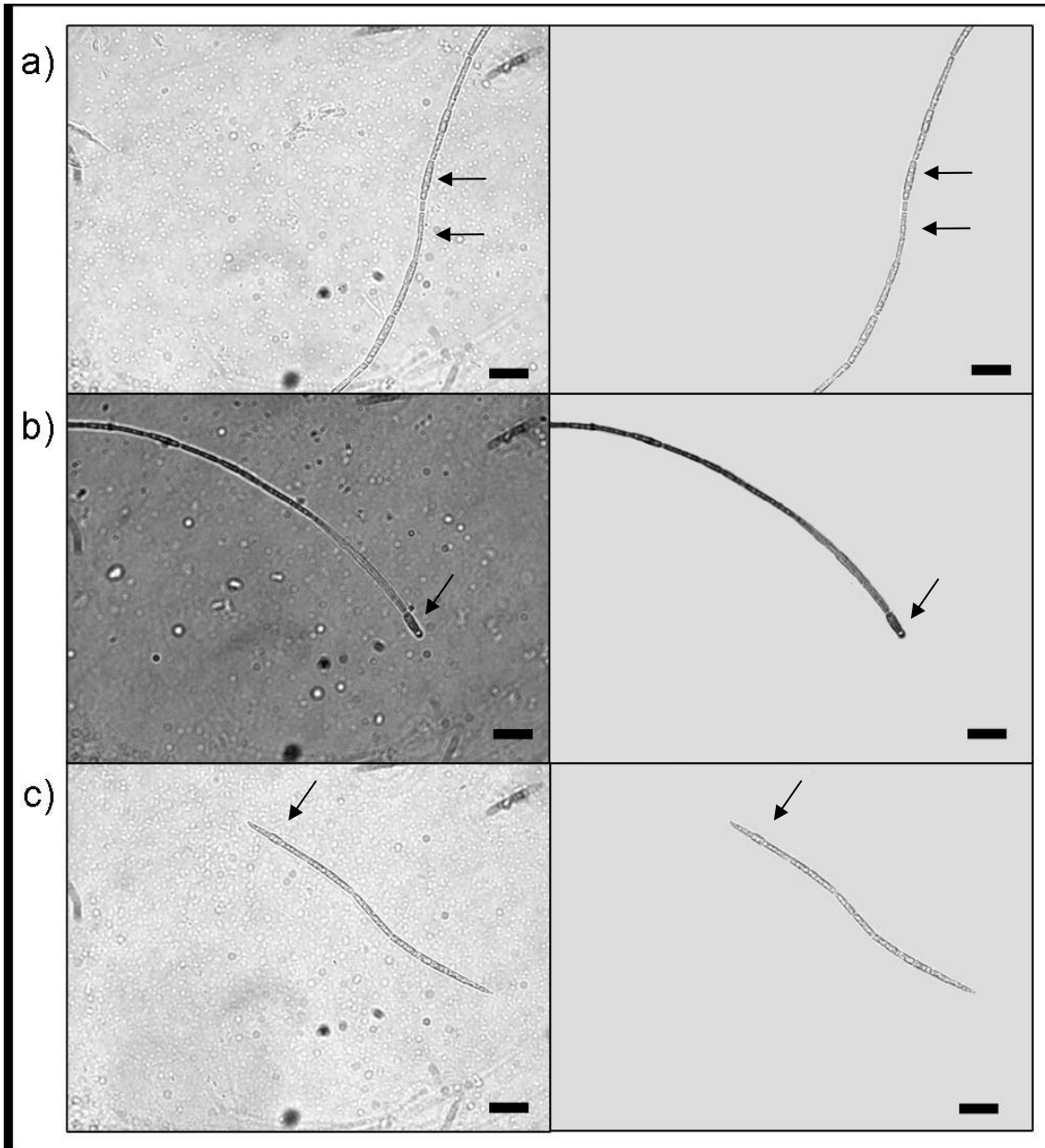


Figura 2.2: Tricomas da cepa tóxica de *C. raciborskii* durante a dieta mostrando em (a) a variação de tamanho celular no mesmo filamento; (b) um heterocito terminal; e em (c) um acineto. As fotos foram tiradas em aumento de 1000x. À direita de cada foto tem-se a imagem sem o fundo a fim de realçar as estruturas tratadas (barra = 1 μ m).

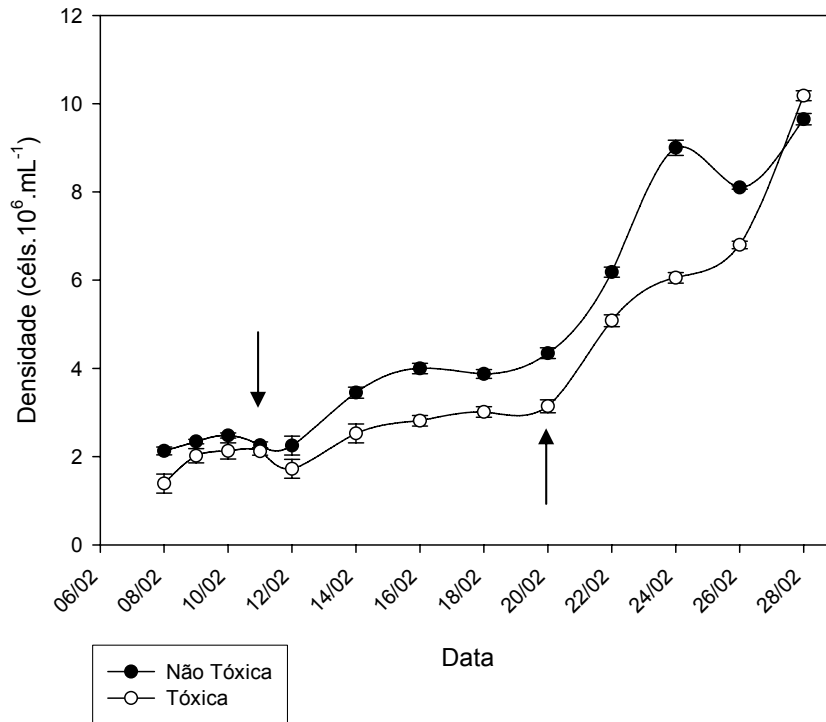


Figura 2.3. Variação da densidade das cepas tóxica e não tóxica de *C. raciborskii* durante três semanas de limitação por fósforo. As setas indicam o início do crescimento exponencial em cada cepa.

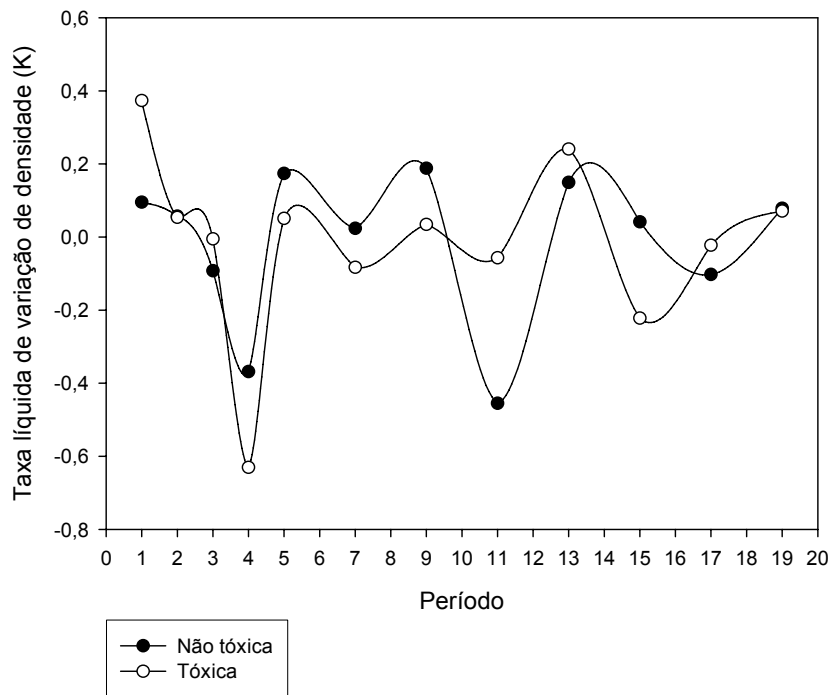


Figura 2.4: Variação na taxa líquida de mudança na densidade populacional (K; Dokulil & Mayer 1996) durante as três semanas em que cepas tóxica e não tóxica de *C. raciborskii* estiveram submetidas a limitação por fósforo.

Conteúdo de fósforo

A concentração de fósforo total nas duas cepas diminuiu de maneira semelhante logo no início do experimento e apresentou dois episódios de aumento abrupto, sendo um próximo à metade e o outro no final do experimento.

Durante os três primeiros dias de dieta da cepa tóxica e os quatro primeiros da cepa não tóxica, observou-se diminuição acentuada na concentração de fósforo total. No dia imediatamente seguinte a essa diminuição, a concentração desse nutriente praticamente dobrou nas duas cepas. Outro episódio de elevação na concentração de fósforo foi observado no fim do experimento em ambas as cepas (figura 2.5). A concentração média de fósforo total durante o período de dieta foi de $198 \pm 88,6 \mu\text{g P L}^{-1}$ para a cepa não tóxica e $185 \pm 117,1 \mu\text{g P L}^{-1}$ para a tóxica.

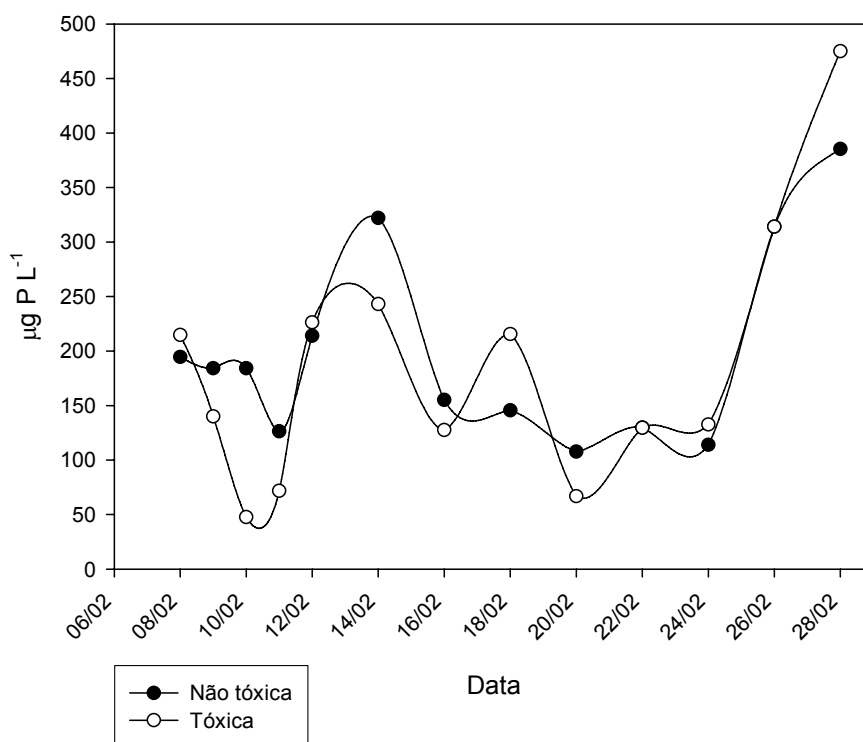


Figura 2.5: Variação na concentração de fósforo total em cepas tóxica e não tóxica de *C. raciborskii* durante três semanas de limitação de fósforo.

4.4. Discussão

Shafik *et al.* (2003) analisaram mudanças morfológicas de *C. raciborskii* em cultivos “batch” e em cultivos contínuos. No cultivo “batch”, após três semanas sem repor nutrientes (ou seja, limitadas por fósforo principalmente) e sem aerar, foi observado que o tamanho e o diâmetro dos filamentos ($68,8 \pm 7,6 \mu\text{m}$ e $1,04 \pm 0,3 \mu\text{m}$, respectivamente) eram bem menores neste tipo de cultivo do que nos cultivos contínuos. Além disso, os filamentos apresentavam-se no formato de agulha, com uma das extremidades mais fina que o restante do filamento. No presente trabalho, após o mesmo período de tempo, a cepa tóxica apresentava filamentos bem maiores e a cepa não tóxica apresentava filamentos de tamanho semelhante ao encontrado por Shafik *et al.* (2003). Porém, freqüentemente, as extremidades apresentavam-se mais espessas que a região intermediária (figura 2.2a). A região intermediária estaria, portanto, mais frágil, devido à limitação de fósforo, sendo um provável local de fragmentação desses filamentos. Os filamentos com uma das extremidades finas seriam, então, decorrentes dessa quebra. Nos dois trabalhos, a limitação de nutrientes induziu morfologias extremas e diminuição de tamanho celular, proporcionando razões superfície:volume favoráveis a absorção de nutrientes. A ocorrência de tricomas com características morfológicas extremas foi observada também na Lagoa do Peri (SC) por Komarkóva *et al.* 1999, sendo esta atribuída à baixa concentração de fósforo nesse ambiente.

Moore *et al.* (2003) sugerem que a disponibilidade de fósforo e a temperatura são responsáveis por estimular o aparecimento de acinetos. A produção dos acinetos seria induzida por um choque inicial de temperatura (de 25 a 15°C) e o fósforo seria necessário para o crescimento e completo desenvolvimento dos mesmos. Shafik *et al.* (2003) e Istvánovics *et al.* (2000) não observaram a formação de acinetos em condições de ausência ou limitação de fósforo, sugerindo que o choque de temperatura seria o fator essencial para a formação dessas estruturas. Em nosso

trabalho, o fósforo pareceu mais relevante do que a temperatura. Esta esteve constante durante todo experimento e acinetos foram formados alterando-se a disponibilidade de fósforo. Tal fato pode ser decorrente das condições prévias de cultivo das cepas utilizadas e suas conseqüentes estratégias adaptativas. Durante o cultivo as cepas não passam por limitação de luz nem de nutrientes sendo a variação de fósforo a única condição limitante aplicada às cepas. A formação de acinetos induzida pela variação na disponibilidade de fósforo é de interesse relevante em estudos de ecossistemas tropicais eutrofizados. A geração de tais formas de resistência pode garantir a sobrevivência da população de cianobactérias durante e após medidas de recuperação desses ecossistemas permitindo que tais indivíduos reapareçam posteriormente. Pàdisak & Isvànovics (1997) sugerem que os acinetos de *C. raciborskii* servem de inóculo para a próxima geração e são capazes de assimilar fósforo durante seu estágio no sedimento, podendo ser usados com fonte de fósforo para o crescimento inicial da população.

A variação na concentração de fósforo total no decorrer do experimento é reflexo da relação da interação entre *C. raciborskii* e bactérias. Testes experimentais anteriores a esse trabalho mostraram que a densidade de bactérias e de *C. raciborskii* no mesmo cultivo sob limitação de fósforo variam de maneira semelhante, senoidalmente, porém com os picos e vales intercalados. A retirada do fósforo parece favorecer o crescimento de bactérias, que remineralizam o fósforo orgânico proveniente das excretas, do "leakage", ou seja, o extravasamento involuntário de material celular, e da morte de indivíduos da população de cianobactérias. Como ressaltado por Falkner *et al.* (1989), altas taxas de "leakage" são o preço que microrganismos pagam por sua elevada afinidade por fósforo. Esse processo rápido de reciclagem de fósforo irá liberar fósforo disponível para consumo e irá favorecer o crescimento de *C. raciborski*. Ele é observado em comunidades planctônicas naturais e é freqüentemente o responsável pela manutenção das taxas de produtividade no eplímnio de lagos com baixas concentrações de fósforo dissolvido (Hudson *et al.*

2000; Ferreira *et al.* 2005). Além disso, a maior afinidade por fósforo de *C. raciborskii* em relação a outras espécies fitoplanctônicas e de cianobactérias sugere que essa espécie, quando competindo com outros microrganismos, seja capaz de reabsorver a maior parte do fósforo extravasado involuntariamente (Isvànovics *et al.* 2000). Conseqüentemente, o processo de “leakage” é essencial para absorver fósforo em baixas concentrações (Istvanovics *et al.* 2000).

A cepa tóxica mostrou-se mais sensível à retirada de fósforo do que a não tóxica, porém o presente trabalho não permite atribuir esse comportamento somente ao potencial tóxico desses indivíduos. Quando a densidade de bactérias foi monitorada, observou-se que esta era bem menor nos cultivos de cepas tóxicas do que nos de cepas não tóxicas ($0,40 \times 10^{-6}$ céls ml⁻¹ contra $0,98 \times 10^{-6}$ céls ml⁻¹). Dessa forma, pode ser que o mecanismo de reciclagem de fósforo nos cultivos de cepas tóxicas necessite um pouco mais de tempo para regenerar fósforo suficiente ao crescimento de *C. raciborskii*.

De acordo com Isvànovics *et al.* (2000) as células deficientes em fósforo necessitam de várias horas para se readaptar ao crescimento rápido. A readaptação resulta então em um atraso na absorção de fósforo em relação ao crescimento (Grover 1991). As figuras 2.3 e 2.5 mostram que tal readaptação levou cerca de quatro dias em nosso experimento. Após esse período, a densidade começou a aumentar – lentamente na cepa tóxica e exponencialmente na cepa não tóxica. O aumento da densidade de *C. raciborskii* durante todo o experimento, apesar de em menor velocidade, foi possível devido ao aumento da relação superfície:volume. Como dito anteriormente, tais mudanças morfológicas constituem uma estratégia adaptativa comum em microrganismos em situações de limitação de recursos. Elas permitem melhor absorção de nutrientes, pois esse processo ocorre através da membrana celular e está diretamente relacionado a superfície disponível para absorção.

O tempo de duplicação de *C. raciborskii* em ecossistemas naturais varia de 2,9 a 7 dias (4,1 e 2,9 dias em Padisàk 1994; 3 dias em Fabbro & Duivenvoorden 1996; 7

dias em Dokulil & Mayer 1996). Em cultivo o crescimento é acelerado, resultando em 1,7 divisões por dia (Hawkins 1996), ou seja, 0,58 dias para duplicação. No experimento realizado, a taxa da duplicação, quando positiva, variou de 3,7 a 29,3 dias para a cepa não tóxica e 1,8 a 20,1 dias para a cepa tóxica, com média de 10,1 dias para as duas cepas. O crescimento rápido de *C. raciborskii* em condições de cultivo é devido a suficiência de nutrientes e luz para os indivíduos, enquanto que em campo eles estão sujeitos a condições freqüentemente abaixo dos limites ótimos para cada espécie. A diminuição de disponibilidade de fósforo retardou o crescimento de *C. raciborskii*, causando crescimento mais lento que as condições observadas em campo.

Com oito espécies descritas (*C. raciborskii*, *C. africana*, *C. cuspis*, *C. philippinensis*, *C. allantoidispora*, *C. taveræ* e *C. catemaco*) (Komárková-Legnerová, 1996), o gênero *Cylindrospermopsis* apresenta variações morfológicas que dificultam sua identificação devido à importância que cada autor confere aos diferentes caracteres morfológicos, como a posição do heterocito e a presença de acineto. Ryan *et al.* (2003) relatam um caso de identificação incorreta de *C. raciborskii* na Nova Zelândia. A espécie havia sido descrita com *C. minutissimum* Collins devido à ênfase dada na literatura taxonômica relacionada à posição do heterocito em relação ao acineto. Assim como para outras cianobactérias filamentosas, a plasticidade morfológica de *C. raciborskii* reflete variações naturais da população (Komárek & Kling 1991; Branco & Senna 1991), mas pode ser também reflexo das condições ambientais momentâneas durante o crescimento (Moore *et al.* 2004). Apesar de estudos detalhados terem sido conduzidos acerca da variação morfológica de tricomas maduros de *C. raciborskii* (Singh 1962) e das fases iniciais de crescimento, pós-germinação de acinetos (Moore *et al.* 2004), ainda há muito debate sobre o quanto as diferenças morfológicas refletem distinção entre espécies (Komárek 2003).

5. Discussão Geral

C. raciborskii pode ser um organismo chave na reciclagem interna de fósforo de lagos (Padisák 1997). Mesmo que o aporte de fósforo diminua no ecossistema ou outras condições ambientais apresentem-se desfavoráveis a manutenção da população de *C. raciborskii*, esta espécie pode repousar no sedimento em sua forma de resistência, o acineto, e germinar quando as condições ambientais forem favoráveis. Da mesma forma, a interrupção do aporte de fósforo em ecossistemas eutrofizados e com ocorrência de *C. raciborskii*, dominante ou não, não garante o controle ou a eliminação da população, como observado no Lago Balaton, na Hungria (Padisák & Istvanovics 1997). Nesse lago, a redução de 65% no aporte externo de fósforo não impediu que ocorressem florações de *C. raciborskii*. Istvanovics *et al.* (1993) verificaram experimentalmente que a assimilação de fósforo ocorria independentemente do crescimento na cianobactéria colonial *Gloeotrichia echinulata*, tanto espacialmente quanto temporalmente. O aparecimento dessa cianobactéria no ecossistema era precedido por assimilação bêntica de fósforo e o crescimento epilimnético era baseado principalmente no fósforo armazenado internamente. Este caso ilustra a importância da assimilação de fósforo no sedimento e seu papel como estratégia evolutiva no grupo das cianobactérias (Padisák & Istvanovics, 1997).

A diminuição da eficiência fotossintética tratada no capítulo 1 pode ser explicada de acordo com os argumentos de Platt & Jassby (1976). Como pode ser visto no capítulo 2 (figuras 2.2c) a arquitetura celular das cepas utilizadas variou bastante, influenciando, portanto na eficiência fotossintética desses organismos. Além disso, o conteúdo de clorofila *a* diminuiu cerca de dez vezes após a dieta (cap. 1, p. 12) diminuindo a capacidade dessas células em absorver a luz.

O aumento da capacidade fotossintética após a limitação por fósforo confirma a hipótese apresentada por Banse (1976) e Fenchel (1974). Tais autores afirmam que, considerando um dado processo de transporte de nutrientes, as células menores

apresentariam, em geral, maiores taxas de renovação (“turnover”) do que células maiores. As taxas de renovação seriam expressas, nesse caso, pelos valores de P_m^b . Após a dieta, observou-se diminuição de cinco vezes no volume celular e aumento médio de 0,5 vez na relação superfície:volume. Dessa forma, as células de *C. raciborskii* apresentavam-se bem menores, com maior capacidade de absorção de nutrientes após a dieta o que possibilitou maior produção de matéria orgânica.

Caracteres morfológicos extremos de *C. raciborskii* como os observados no presente trabalho após a dieta também foram observados por Komarkova *et al.* (1999) em ecossistemas naturais limitados por fósforo (Lagoa do Peri, SC) e por Shafik *et al.* (2003), em condições de cultivo, também após a limitação por fósforo. Devido à plasticidade fenotípica dessa espécie (Komarek & Kling 1991; Branco & Senna 1991), sua identificação taxonômica baseada exclusivamente na morfologia deve ser feita com cautela e considerando-se as condições ambientais (temperatura, luz e disponibilidade de nutrientes) a fim de evitar identificações incorretas como o relatado por Ryan & Hamilton (2003). Tais estudos evidenciam a importância do fósforo na determinação morfologia de *C. raciborskii*. No entanto, a importância relativa desse nutriente para a morfologia de *C. raciborskii* só poderá ser identificada relacionando simultaneamente fatores como temperatura, luz e disponibilidade de outros nutrientes, como o nitrogênio, a fim de se conhecer a relevância de cada um deles na determinação do fenótipo dessa espécie.

Devido a seu sucesso e ubiquidade em ecossistemas aquáticos de água doce, as cianobactérias são, provavelmente, o grupo de microrganismos planctônicos mais bem estudados (Stanier & Cohen-Bazire 1977; Bryant 1994). Schreurs (1992), Mur *et al.* (1993) e Bryant (1994) descrevem diversas características ecológicas e moleculares de cianobactérias. No entanto, as particularidades de cada espécie e seu desempenho ecológico ainda são pouco conhecidos, mesmo para aquelas espécies potencialmente tóxicas que, por causarem florações, podem trazer prejuízos aos sistemas de abastecimento de água potável, por exemplo. A compreensão da eco-

fisiologia dessas espécies e dos mecanismos que causam as florações faz-se, pois, essencial para o manejo e a conservação da biodiversidade aquática, bem como para a recuperação de ecossistemas degradados pela eutrofização.

6. Referências Bibliográficas

- Andrade, L. F.; R. F. Brunkow; C. F. Xavier and L. L. Domingues. (1988). "Fitoplâncton e características físico-químicas do reservatório de Itaipu, Paraná, BR". In J. G. Tundisi [ed.], *Limnologia e manejo de represas*. EESC-USP/CRHEA/ACIESP.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jockimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2002) "Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil". *Toxicology*, 181, 441-446.
- Banse, K. (1976). Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell-size – a review. *J. Phycol.*12:135-40.
- Bannister, T. T. (1974). Production equations in terms of chlorophyll concentration, quantum yield and upper limit to production. *Limnol. Oceanog.* 19:1-12
- Barroso, A. D. (2000). *Comunidade fitoplanctônica do reservatório Duas Bocas (Reserva, Biológica de duas Bocas)-ES: variação vertical e temporal em duas épocas distintas*. Dissertação Msc.. Universidade. Federal de. São Carlos, São Carlos, SP.
- Borics, G., Grigorszky, I., Szabo, S. & Padisák, J. (2000). "Phytoplankton associations in a small hypertrophic fishpond in east Hungary during a change from bottom-up to top-down control". *Hydrobiologia* 424:79–90.
- Bouvy, M., Molica, R., Oliveira, S., Marinho, M., Becker, B. (1999) "Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil". *Aquatic Microbial Ecology*, 20, 285-297.

- Branco C.W.C and Senna P.A.C. (1991) The taxonomic elucidation of the Paranoa Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*- Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 61:85-91
- Branco, C.W.C. e Senna, P.A. (1994). "Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil." *Algological Studies*, 75, pp. 85-96.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.-F., Coute, A. & Bernard, C. (2002). "Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France". *Water Research* 36:31 83–92.
- Briand, J-F.; Leboulanger, J. C.; Humbert, J-F.; Bernard, C. and Dufour, P. (2004). "*Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming?" *Journal of Phycology*. 40: 231-238.
- Bryant D. A. (1994). *The Molecular Biology of Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 1. Springer, Dordrecht,
- Byth, S. (1980). "Palm Island mystery disease". *Med. J. Aust.*, 2, 40-42.
- Carmichael, W.W., (1998). "Microcystin concentration in human livers: estimation of human lethal dose – lessons from Caruaru, Brazil". *4th International Conference on Toxic Cyanobacteria*. USA. p 115.
- Castenholz, R.W. and Waterbury, J.B. (1989) In: Chorus, I e Bartram, B, (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, United Kingdom.
- Chonudomkul, D.; Yongmanitchai, W.; Theeragool, G.; Kawachi, M.; Kasai, F.; Kaya, K. and Watanabe, M. M. (2004). Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology and Ecology*, v. 48, p. 345-355, 2004.

- Chorus, I. & Bartram, J., Editors (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, United Kingdom.
- Cole, J. J., N. F. Caraco, and B. L. Peierls. (1992). Can phytoplankton maintain a positive carbon balance in a turbid, freshwater, tidal estuary? *Limnology and Oceanography* 37:1608-1617.
- Coute, A., Leitao, M. & Martin, C. (1997). "Premiere observation du genre *Cylindrospermopsis* (Cyanophyceae, Nostocales) en France". *Cryptog. Algol.* 18:57-70.
- Dokulil M.T. & Mayer J. (1996) "Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* — *Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria". *Algological Studies*, 83, 179-195
- Fabbro, L. D. & Duivenvoorden, L. J., (1996). "Profile of a bloom of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical Queensland". *Mar. Fresh. Res.*, v. 47, pp. 685-694.
- Falkner, G. Falkner, R. & Schwab A. J. (1989). "Bioenergetic characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archiv für Microbiologie*", 152, 353-361.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G. K. & Chorus, I. (2003). "Cylindrospermopsis occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates". *Toxicon* 42:313-21.
- Fenchel, T. (1974). Intrinsic rate of natural increase: the relationship with body size. *Oecologia* 14:317-26. In: Platt, T. & Jassby, A. D. (1976). The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *J. Phycology* 12, 421-430

- Ferreira, R. M.; Barros, N.; Duque-Estrada, C. H.; Roland, F. "Caminhos do Fósforo em Ecossistemas Aquáticos". In: Fábio Roland; Dionéia Cesar; Marcelo Marinho. (Org.). *Lições de Limnologia*. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2005,p. 229-242.
- Flynn, JJ (1988) "The concept of primary production in aquatic ecology". *Limnol. Oceanogr.*, 33(5), 1215-1216.
- Fogg, G. E. & Thake, B., (1987) "Algal cultures and phytoplankton ecology", Univ. Wisconsin Press. Madison. p. 12-42.
- Foy, R. H. & Gibson, C. E. (1982a). "Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: the response of twenty strains grown under high and low light". *Br. Phycol. J.* 17:169-182.
- Foy, R. H. & Gibson, C. E. (1982b). "Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: changes in photosynthetic capacity and pigmentation of *Oscillatoria redekei* Van Goor under high and low light". *Br. Phycol. J.* 17:183-193.
- Geider, R. J. & MacIntyre, H. L. 2002. Physiology and biochemistry of photosynthesis and algal carbon acquisition. In Williams, P. J., Thomas, D. N. & Reynolds, C. S. [Eds.] *Phytoplankton Productivity: Carbon Assimilation in Marine and Freshwater Ecosystems*. Blackwell, Oxford, pp. 44–77.
- Gorham, P. R.; Mc Lachlon, L.; Hammer, U. T. & Kim, W. K. (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. *Verhandlungen der internationale angunundle. Limnologie.* 15, 796-804.
- Gosselain, V., Hamilton, P. B. & Descy, J.P. (2000) "Estimating phytoplankton carbon from microscope counts: an application for riverine systems". *Hydrobiologia* 438: 75-90.
- Grover J. P. (1991). Non-steady state dynamics of algal population growth : experiments with two chlorophytes. *Journal of Phycology*, 27, 70-79.
- Harris, G. P. (1978). "Photosynthesis, productivity and growth: The physiological ecology of phytoplankton". *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.* 10: 1-171.

- Harris, G. P. (1986). *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*. Chapman and Hall, New York. 384p.
- Hawkins, PR (1996). "Factors which influence the development of blooms of *Cylindrospermopsis*". In "*Cylindrospermopsis – a new toxic algal bloom challenge for Australia*". *Proceedings of a Symposium held in Brisbane*. (Ed. G. Jones).
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. and Jasper, S. 1977. The use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol* 22: 1225-1228
- Hudson, J.J., Taylor, W.D. and Schindler, D.W. (2000). "Phosphate concentrations in lakes". *Nature* 406: 54-56.
- Huszar, V. L. M., & Silva, L. H. (1999) "Estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudos". *Limnotemas* 2, 17p.
- Huszar, V. L. M. ; Silva, L. H. S.; Marinho, M. M.; Domingos, P.; Sant'anna, C. L. . (2000) "Cyanoprokaryotes assemblages in eight productive tropical Brazilian waters". *Hydrobiologia*, 424:67-77
- Istvanovics, V., Pettersson, K., Rodrigo, M.A., Person, D., Padisák, J. e Colom, W. (1993). *Gloeotrichia echinulata*, a colonial cyanobacterium with a unique phosphorus uptake and life strategy, *J. Plankton Res.* 15:31–552
- Isvánovics, V., Shafik, H. M., Présing, M. & Juhas, S., (2000), "Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures", *Fresh. Biol*, v.43, pp. 257-275.
- Jardim F. A. (1999). *Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA, MG*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte (MG).
- Jassby, A. D. & Platt, T. (1976) "Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton". *Limnology and Oceanography* 21(4), 540-547.

- Junqueira-Melgaço, M. (2007). Efeitos da disponibilidade de luz e limitação de nutrientes sobre a competição entre cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora (MG)
- Kalff, J. (2002). Limnology. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Komárek, J. & Kling, H. (1991). "Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa)". *Arch. Hydrobiol., Suppl.88, Algological Studies* 61:21–45.
- Komárek, J. (2003) "Planktic oscillatorial cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects)". *Hydrobiologia*. 502:367-382.
- Komárková-Legnerová, J. & Taverna, R. (1996). "Cyanoprokaryota (Cyanobacteria) in the phytoplankton of Lake Catemaco (Veracruz, Mexico)". *Arch. Hydrobiol., Suppl.117, Algological Studies* 83:403–422.
- Komarkova, J. 1998. "The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria), p. 327:340. In T Azevedo (ed.). *Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia*, vol.I. São Paulo, Brazil.
- Komárková, J.; Laudares-Silva, R. e Senna, P.A.C. (1999). "Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil." *Algological Studies*, 94, pp. 207-222.
- Konrath, J. (1995). *Flutuação temporal da taxa de fixação de carbono particulado, estrutura do fitoplâncton e fatores ambientais em uma lagoa costeira eutrófica (Lagoa Caconde, Osório, RS)*. Dissertação. Univ. Fed. Rio Grande do Sul.
- Lagos N., Onodera H., Zagatto P. A., Andrinolo D., Azevedo S. M. F. Q., Oshima Y. (1999) "The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil". *Toxicon*, 37, 1359 – 1373.

- Li, R., Carmichael W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R. , Liu Y.K. , e Watanabe M.M. (2001). Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria).
- Lippy, E.C. and Erb, J. (1976). "Gastrointestinal illness at Sewickley, PA". *J. Am. Water Works Assoc.*, 68, 606-610.
- Marinho, M. M. & Huszar, V. L. M. (2002). "Nitrogen availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (Southern Brasil)". *Arch. Hydrobiol.*, 153: 443-468.
- Marinho, M. M.; Molica, R.; Jardim, F.; Huszar, V. L. M. (2005). "*Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) em Ecossistemas Brasileiros: Um Novo Desafio para o Gerenciamento Aquático". In: Roland, F.; César, D.; Marinho, M. M.. (Org.). *Lições de Limnologia*. São Carlos: Rima Editora, (2005), v. 1, p. 325-339.
- Melo, S. (2001). *Fitoplâncton da lagoa Imboassica (Macaé, RJ-Brasil): flora, estrutura de comunidade e variações espaciais e temporais*. Tese. Univ. Fed. do Rio de Janeiro.
- Moore, D.; O'donohue, M.; Shaw, G. & Critchley, C., (2003). "Potential triggers for akinete differentiation in an Australian strain of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (AWT 205/1)", *Hydrobiologia*, v. 506-509, pp. 175-180.
- Moore, D., McGregor, G. B. & Shaw, G. (2004). "Morphological changes during akinete germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria)". *J. Phycol.* 40(6):1098-1105.
- Moss, G. & Moss, M. (2005). *Brasil das Águas : revelando o azul do verde e amarelo*. 1ª.ed. São Paulo, SP. Supernova Editora.
- Mur, L. R., H. Schreurs & P. Visser, (1993). "How to control undesirable cyanobacterial dominance". In Giussani, G. & C. Callieri (eds), *Strategies for Lake Ecosystems*

- Beyond 2000*. Proc. 5th Int. Conf. Conservation and management of Lakes, Stresa 1993: 565–569.
- Nascimento, S. M. (2000) “Toxic cyanobacterial blooms in the Tapacurá reservoir, northeast Brazil”. *IX International Conference On Harmful Algal Bloom*.
- Padisák, J., (1994). “Identification of relevant time-scales in non-equilibrium community dynamics: conclusions from phytoplankton surveys”. *New Zealand J. of Ecology* 18: 169-176.
- Padisák, J., 1994. Identification of relevant time-scales in non-equilibrium community dynamics: conclusions from phytoplankton surveys. *New Zealand J. of Ecology* 18: 169-176
- Padisák, J (1997) “*Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology”. *Arch. Hydrobiol.* 107, 563-593.
- Padisák, J. & V. Istvánovics, (1997). “Differential response of blue-green algal groups to phosphorus load reduction in a large shallow lake: Balaton, Hungary”. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 574-580.
- Paerl, H. W. (1988) “Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria)”. In Chorus, I. e Bartram, J., Editors (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London.
- Pedrosa P.; Calasans C. V. C. & Resende C. E. (1999). “Particulate and dissolved phases as indicators of limnological and ecophysiological spacial variation in Cima Lake system, Brazil: a case study”. *Hidrobiologia.* 411: 89-99.
- Platt, T. & Jassby, A. D. (1976). The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *J. Phycology* 12, 421-430.
- Reynolds, C.S. 1997. *Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory*, Ecology Institute, Germany. 371pp.

- Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of Phytoplankton*. Cambridge, UK. Cambridge University Press.
- Roland, F. ; Esteves, F. A. . (1998) "Effects of bauxite tailing on PAR attenuation in an Amazonian crystalline water lake". *Hydrobiologia*, v. 377, p. 1-7.
- Roland, F, Caraco, NFR, Cole, JJ, Del Giorgio, P (1999) Rapid and precise oxygen by spectrophotometry evaluation of interference from color and turbidity. *Limnol. Oceanogr.* 44(4),1148-1154.
- Ryan, E. F., Hamilton, D. P. & Barnes, G. E. (2003). Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waitako lakes of New Zealand. *New Zeal. Journal of Mar. and Freshw. Research*, 37:829-836.
- Saker, M. L.; Neilan, B. A. & Griffiths, D. J., (1999) "Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland", *J. Phycol.*, v. 35, pp. 599-606.
- Sant'anna, C.L. & Azevedo, M.T.P. (2000). "Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil". *Nova Hedwigia* 71:359-385
- Schreurs, H., (1992). *Cyanobacterial dominance relations to eutrophication and lake morphology*, Thesis. University of Amsterdam: 198 pp.
- Seenayya G. & Subba Raju, N. (1972). "On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Woloszynska) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*". In: Padisák, J (1997) "*Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology". *Arch. Hydrobiol.* 107, 563-593.
- Shafik, H. M., L. Voros, P. Sprober, M. Presing and A. W. Kovacs. (2003). "Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures". *Hydrobiologia* 506-509:163-167
- Singh, R. N. (1962). "Seasonal variants of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz". *Hydrobiologia.* 20:87-91.

- Sipaúba-Tavares, L. H. & Rocha, O. (2003). *Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de Organismos Aquáticos*. Rima/FAPESP. 122p.
- Sommer, U (1989) *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer, Berlin. 369p.
- Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. In M. P. Starr, J. L. Ingraham, & A. Balows (Eds.), *Annual Review of Microbiology* (pp. 225-274). Palo Alto, CA: Annual Reviews Inc
- Strickland, J. D. H. (1960). "Measuring the production of marine phytoplankton". *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, 122:1-172.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. (1972). "A practical handbook of sea-water analysis". (2a. Ed) *J. Fish. Res. Bd. Canada*. 167: 311 pp.
- Tucci, A. & Sant'Anna, C. L. (2003). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação sazonal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revta. Bras. Bot.*, 26(1): 97-112
- Uehlinger, U. F. (1980). Untersuchungen zur Autökologie der planktischen Blaualge *Aphazinomenon flos-aquae*. – Tese ETH Zürich Nr. 6723: 1-124. In: Dokulil M.T. & Mayer J. (1996) "Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* — *Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria". *Algological Studies*, 83, 179-195
- Van Liere, L. & Mur, L. R. (1979). "Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply". *J. Gen. Mikrobiol.* 115: 152-160 In: Dokulil M.T. & Mayer J. (1996) "Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* — *Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria". *Algological Studies*, 83, 179-195
- Van Liere L. & Mur, L. R. (1980). "Occurrence of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey". *Dev. Hydrob.* 2:67-77 In: Dokulil M.T. & Mayer J. (1996)

- “Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* — *Limnithrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria”. *Algological Studies*, 83,179-195
- Wetzel, R. G. e Likens, G. E. (1991) *Limnological Analyses*, 2a.Ed. Springer-Verlag New York. 105 pp.
- Whitton, B.A. (1992). Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: Chorus, I. e Bartram, J., Editors (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. 416p. E&FN Spon, London.
- Yu, S.-Z. (1995). “Primary prevention of hepatocellular carcinoma”. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10(6), 674-82.
- Yunes, J. S., Cunha N. T., Conte S. M., Rabello I. M., Giordani A. T., Bendatti M. M., Maizonave, C. M., Granada G. L., Hein R. P. (2000) “Programa AGUAAN - Agilização do Gerenciamento e Utilização de Águas com Algas Nocivas”. *Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, P. Alegre, RS. Brasil. pp. 273-274 .
- Zilberg, B. (1966). “Gastroenteritis in Salisbury European children - a five-year study”. *Cent. Afr. J. Med.*, 12(9), 164-168. In: Chorus, I. e Bartram, J., Editors (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, United Kingdom.
- Zevenboom, W. (1987). Ecophysiology of nutrient uptake, photosynthesis and growth. *Can. Bull. Fish. Aquatic. Sci.*, 214:391-422.
- Wolf, G. (1991). Beiträge zur Zyklomorphose der Blaualge *Oscillatoria limos* im Piburguer See (Ötztal, Tirol). 157pp., Thesis Univ. Innsbruck In: Dokulil M.T. & Mayer J. (1996) “Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* — *Limnithrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria”. *Algological Studies*,83,179-195