

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ecologia

Marcela Aparecida Campos Neves Miranda

EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS NO CRESCIMENTO E
ECOFISIOLOGIA DE DUAS CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE
FLORAÇÕES

JUIZ DE FORA
2011

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ecologia

Marcela Aparecida Campos Neves Miranda

EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS NO CRESCIMENTO E
ECOFISIOLOGIA DE DUAS CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE
FLORAÇÕES

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

Orientadores: Prof. Dr. Maria Carolina Silva Soares

Prof. Dr. Ricardo Moreira Chaloub

JUIZ DE FORA
2011

Miranda, Marcela Aparecida Campos Neves.

Efeitos de diferentes intensidades luminosas no crescimento e ecofisiologia de duas cianobactérias formadoras de florações /
Marcela Aparecida Campos Neves Miranda. – 2011.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Ecologia. 2. Fotossíntese. 3. Cianobactérias I. Título.

CDU 574

***EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS NO CRESCIMENTO
E ECOFISIOLOGIA DE DUAS CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE
FLORAÇÕES.***

Marcela Aparecida Campos Neves Miranda

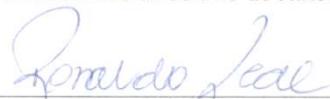
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Carolina Soares

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Aprovada em 12 de abril de 2011.



Prof. Dr. Ricardo Moreira Chaloub (co-orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Prof. Dr. Ronaldo Leal Carneiro
Universidade de São Paulo - USP



Prof^a. Dr^a. Anita Ferreira da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

*Á minha família mãe, pai, Valtinho,
Juninho e Felipe por todo apoio e carinho
durante a realização deste trabalho*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar sempre presente iluminando e guiando meu caminho.

À minha família: pai, mãe, Valtinho e Juninho, por todo suporte e carinho ao longo desta caminhada. Sem vocês esta conquista não seria possível. Vó Irene você também foi super importante nesta etapa. Tia Deta e Tio Luís, obrigada pelo imenso carinho, por sempre estar dispostos a ajudar e pelos belos almoços de domingo.

Aos componentes da banca, Prof^a. Dr^a Anita Ferreira da Silva e ao Prof. Dr. Ronaldo Leal Carneiro por terem aceitado o convite e pelas contribuições.

Carol obrigada por tudo! Pela confiança, por toda paciência pelo companheirismo e carinho, nesses três anos de convivências aprendi muito com você. Sua determinação e disciplina é exemplo a ser seguido.

Chaloub obrigada por permitir que eu fizesse o curso de Fotossíntese em 2009, onde essa parceria surgiu. Por abrir a porta de seu laboratório e por me acolher de maneira tão carinhosa. Obrigada também pelas longas horas de bancadas, pelas conversas e pelos ensinamentos. Os quatro meses em seu laboratório fez com que eu amadurecesse muito!

Fábio obrigado pelas inúmeras oportunidades oferecidas. Agradeço todo apoio e incentivo durante esses seis anos de trabalho em seu laboratório.

Anita obrigada pela recepção e por me abrigar em sua casa no período que passei no Rio, o carinho, o cuidado e a dedicação despendida por você e pelo Rodrigo foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos amigos da família LEA pelos inesquecíveis momentos de alegria, pelo companheirismo e pela troca de experiências Caique, Fran, Felipe R., Fernanda, Luciana, Lúcia, Malafaia, Mariana, Michaela, Michele L., Michele S., Natália, Nathan, Rafael Almeida, Rafael (Papel), Raquel, Simone, Tabatha e Yonara é muito bom tê-los por perto!

Gladson, obrigada por colocar em prática minhas idéias para os experimentos e por estar sempre disposto a ajudar. Senti muito a sua falta em minha longa jornada na UFRJ. Você é 10!

Aos amigos do Laboratório de Estudos Aplicados à Fotossíntese – LEAF, Anita, Bruna, Daniel, Fernando, Marcoaurélio, Raquel, Silvia, Nathania, obrigada por todo carinho e pela companhia em minhas longas jornadas de experimentos. Daniel por

“coletar amostra” nos experimento nos fins de semana, permitindo minhas vindas à Juiz de Fora.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química da UFRJ pela excelente recepção e constante satisfação em me ajudar no que fosse preciso. Cláudio e Marcoaurélio obrigada por suas caronas para sair do Fundão depois das 22 horas.

Ao programa de Pós Graduação em Ecologia pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho. E ao José Carlos por estar sempre pronto a ajudar.

Aos amigos extra-LEA pelas horas de descontração: Luísa e Léo, Bruno e Rafaela, Marcelo e Hellen, Eduarda e Felipão. Carolina Miranda, Cabrini e Nilson, Michele Lima, Léo (magrelo) obrigada por me receber em sua casa nas minhas idas ao Rio.

Ao Felipe pelo apoio, incentivo, compreensão, paciência e acima de tudo pelo carinho e amor. Suas belas figuras abrilhantaram este trabalho. Conviver com Você é um parentizado constante. Amo você!

RESUMO

Alterações no padrão de distribuição de luz em ambientes aquáticos podem afetar as características fisiológicas das cianobactérias, e com isso, influenciar na ocorrência de suas florações. *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* estão entre os gêneros mais comuns formadores de florações em sistemas brasileiros. Conhecer e entender os requerimentos por luz e seu efeito no crescimento dessas duas cianobactérias é de fundamental importância para a compreensão e manejo de florações em ambientes aquáticos continentais. Este trabalho buscou avaliar o efeito de diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na ecofisiologia de *M.aeruginosa* (cepa MIRF-01) e de *C. raciborskii* (cepa CYRF-01) e a interação entre uma cepa de *M. aeruginosa* (MIRF-01) com duas cepas de *C. raciborskii* (CYRF-01 e T3) em duas intensidades luminosas (50 e 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para avaliar a ecofisiologia as células das duas espécies foram previamente aclimatadas por três gerações as intensidades luminosas utilizadas e os parâmetros avaliados foram turbidez, densidade do fluxo de fótons, densidade celular, pigmentos totais, atividade fotossintética e a morfologia das duas espécies. A interação entre as espécies foi verificada através da taxa de crescimento. O aumento na densidade celular ao longo do tempo promoveu aumento da turbidez e reduziu a disponibilidade da intensidade luminosa por volta de 50% em todos os tratamentos, devido ao auto-sombreamento. MIRF apresentou taxa de crescimento maior do que CYRF ($0,38 \pm 0,015$ e $0,29 \pm 0,019$ respectivamente) em todos os tratamentos. Em ambas as cepas houve um aumento na concentração de pigmentos ao longo do tempo e uma diminuição com o aumento da intensidade luminosa. O aumento na relação carotenóide/clorofila, nas culturas de CYRF cultivadas em alta intensidade luminosa (CYRF-300 e CYRF-600), justifica a mudança na coloração de “verde”

para “verde-amarelada” das culturas de *C. raciborskii*. As duas espécies apresentaram taxa de transferência de elétrons semelhantes entre os tratamentos, não sendo verificados mecanismos de dissipação de energia. Em relação a morfologia MIRF apresentou agregação celular em baixas intensidade luminosas (25 e 50 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e CYRF apresentaram alterações nos tricomas cultivados as altas intensidade luminosas (300 e 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), levemente curvados com diferenciação nas extremidades e filamentos bifurcados. A interação entre *M.aeruginosa* e *C. raciborskii* foi evidente para as cepas coexistentes MIRF e CYRF. Em baixa intensidade luminosa (50 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), CYRF apresentou menor taxa de crescimento quando na presença de MIRF; em alta intensidade luminosa (500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) MIRF apresentou maiores taxas de crescimento quando na presença de CYRF do que quando em monocultura. *M.aeruginosa* e *C. raciborskii* quando aclimatadas não apresentaram diferenças em relação à ecofisiologia nas diferentes intensidades luminosas utilizadas. E a interação entre cepas coexistentes pode refletir no crescimento das espécies com a alteração da intensidade luminosa.

Palavras-chave: atividade fotossintética, *Cylindrospermopsis raciborskii*, ecologia aquática, interação, luz, *Microcystis aeruginosa*.

ABSTRACT

Changes in the distribution pattern of light in aquatic environments can affect the physiological characteristics of cyanobacteria and, thus, influence on the occurrence of blooms. *Cylindrospermopsis* and *Microcystis* are among the most common bloom-forming genera in Brazilian systems. Knowing and understanding the requirements for light and its effect on the growth of these two cyanobacteria are important for the understanding and management of algal blooms in freshwater ecosystems. This study evaluated (1) the effect of different light intensities (25, 50, 300, 600, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on growth, physiology and morphology of the species *M. aeruginosa* (strain MIRF) and *C. raciborskii* (strain CYRF) and; (2) the interaction between one strain of *M. aeruginosa* (MIRF-01) with two strains of *C. raciborskii* (CYRF-01 and T3) at two light intensities (50 and 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Both strains were previously acclimated. Cell density, total pigments, turbidity, density of photon flux, photosynthetic activity and morphology of the two species were analyzed. The interaction between two species was verified by changes in growth rates. The increase in cell density over time promoted increase in turbidity and reduced the availability of light intensity by about 50% in all treatments, due to self-shading. MIRF showed higher growth rate than CYRF ($0.38 \pm 0.29 \pm 0.015$ and 0.019 respectively) in all treatments. There was no difference in the growth rates between treatments for MIRF and CYRF in different light intensities. In both strains, there was an increase in pigment concentration over time and decrease with increasing irradiance. The increase in the ratio carotenoid/chlorophyll-a in cultures grown in high irradiance CYRF (CYRF-300 and CYRF-600) explains the change in color from green to green-yellow of cultures of *C. raciborskii*. The rapid light curves were similar among treatments, and was not verified

down regulation mechanisms. It was also noted that while MIRF showed cell aggregation at low light intensities (25 and 50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), CYRF showed morphological changes in the trichomes at high light intensities (300 and 600 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), slightly curved filaments and bifurcate at the ends. The interaction between *M.aeruginosa* and *C.raciborskii* was evident for coexisting MIRF and CYRF strains. In low light intensity (50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), CYRF showed a lower growth rate in the presence of MIRF. In high light-intensity (500 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) MIRF growth rates were higher in the presence of CYRF than in monoculture. When *M.aeruginosa* and *C.raciborskii* are acclimated there is no ecophysiology difference in different light intensities. The interaction between coexisting strains may reflect the growth of species in different light intensity.

Keywords: photosynthetic activity, *Cylindrospermopsis raciborskii*, aquatic ecology, interaction, light, *Microcystis aeruginosa*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
Luz em ecossistemas aquáticos	13
Produção Primária e Fotossíntese.....	17
Cianobactérias	20
Microcystis aeruginosa e Cylindrospermopsis raciborskii.....	21
OBJETIVO.....	23
Geral	23
Específicos.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
Experimento Ecofisiologia	24
Organismos.....	24
Determinação da intensidade luminosa	25
Aclimação das células	26
Culturas.....	26
Cronograma de análises.....	27
Crescimento de <i>M.aeruginosa</i> e <i>C.raciborskii</i>	27
Parâmetros fisiológicos relacionados ao crescimento de <i>M.aeruginosa</i> e <i>C.raciborskii</i>	29
Experimento Interação.....	32
Efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosas .	32
Análise dos dados	33
RESULTADOS	34
Relações entre crescimento celular e disponibilidade de luz	34

Caracterização dos parâmetros fisiológicos relacionados à assimilação de luz por	
<i>M.aeruginosa</i> e <i>C.raciborskii</i>	38
Espectro de absorção de luz na região do visível	38
Fluorescência Estacionária do PSII	40
Curva Rápida de Luz	43
Efeito da luz na morfologia	46
Variações na morfologia de MIRF	46
Variações na morfologia de CYRF	47
Efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosa.....	50
DISCUSSÃO	52
Relações entre crescimento celular e disponibilidade de luz	52
Caracterização dos parâmetros fisiológicos relacionados à assimilação de luz por.....	55
<i>M.aeruginosa</i> e <i>C.raciborskii</i>	55
Efeito da luz na morfologia	57
Efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosa.....	59
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

INTRODUÇÃO

Luz em ecossistemas aquáticos

A disponibilidade de luz, além de ser um dos principais fatores que limitam a fotossíntese em ecossistemas aquáticos, exerce uma grande influência na distribuição das espécies, assim como na adaptação morfológica e fisiológica dos organismos fotossintetizantes (KIRK, 1994). A intensidade luminosa também pode variar: com altitude, como período do ano, com a hora do dia, com o estado da cobertura das nuvens e com as partículas em suspensão no ar que podem atuar como filtros e interferir na quantidade de luz que chega aos ecossistemas aquáticos. (ESTEVES, 1998; TUNDISI e MATSUMURA-TUNDISI, 2008). Além disso, o espectro luminoso, que penetra nos ambientes aquáticos, é modificado pela absorção, espalhamento, matéria orgânica dissolvida e outras partículas, inclusive pelos próprios organismos fotossintetizantes (FALKOWSKI e RAVEN, 2007; LEECH e JOHNSEN, 2009). A quantidade de luz disponível para o processo fotossintético em ambientes aquáticos resulta do balanço da radiação incidente e da atenuação vertical da luz (KIRK, 1994) (Fig.1).

A profundidade que a luz penetra na água é conhecida como zona eufótica e nela está concentrada a maior parte da produção primária realizada pelos organismos fotossintetizantes aquáticos (macrófitas e fitoplâncton). Os níveis de luz aos quais os organismos fitoplanctônicos variam ao longo da zona eufótica e podem atingir valores superiores a $1500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em águas superficiais (LITCHMAN, 1998).

A radiação da luz visível, conhecida também como radiação fotossinteticamente ativa (PAR), compreende os comprimentos de onda no intervalo de 400 a 700 nm (violeta ao vermelho), é utilizada pela maioria dos organismos fotossintetizantes para a realização da fotossíntese.

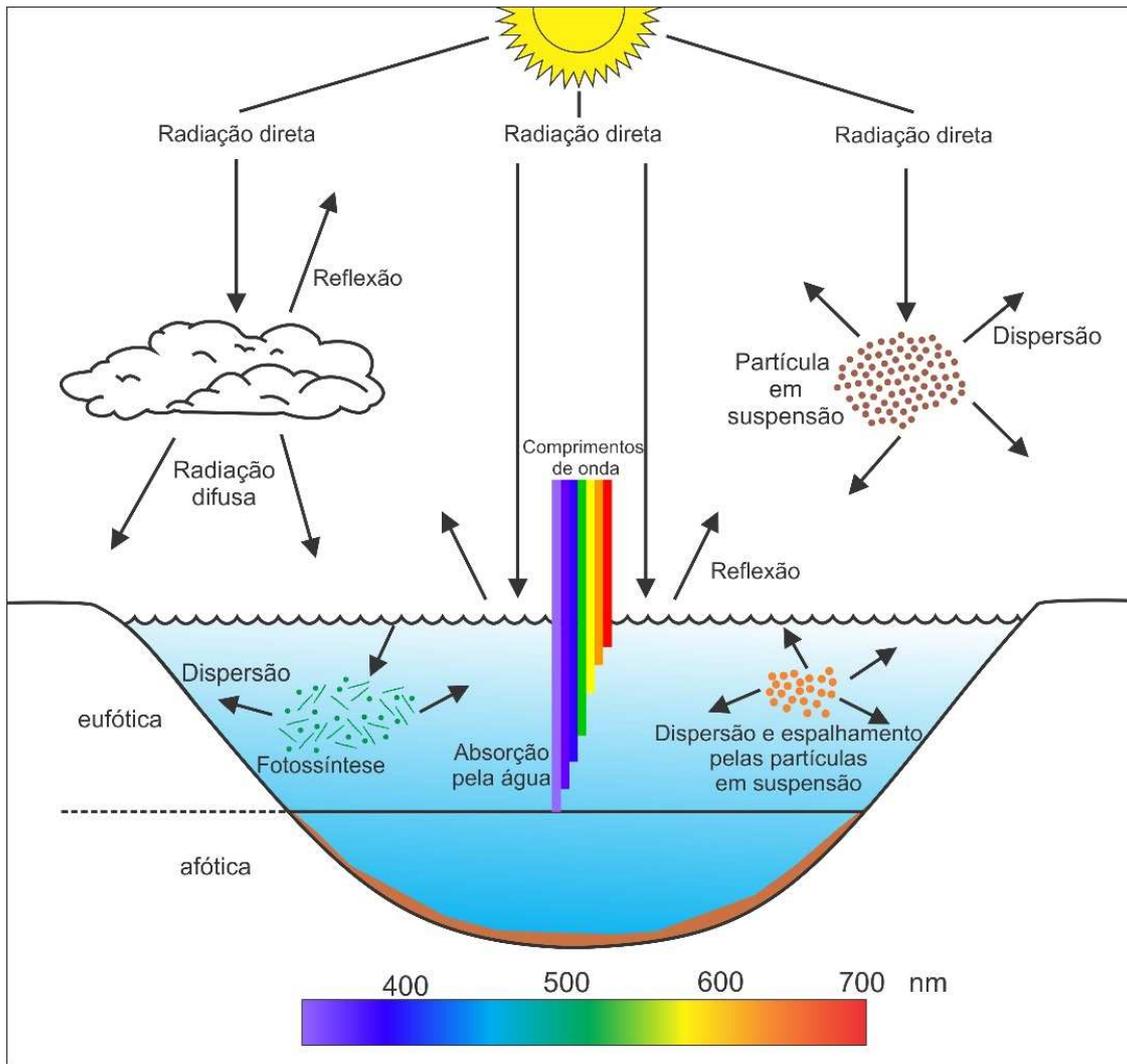


Figura1: Características do espectro de radiação solar que atinge e penetra nos ecossistemas aquáticos.

A captação energia luminosa pelos fotossintetizantes é realizada pelos pigmentos (clorofila-a e pigmentos acessórios) nos diferentes comprimentos da radiação fotossinteticamente ativa (Fig.2). Os pigmentos acessórios, clorofila-b, carotenóides e ficobilinas (ficoeritina, ficocianina e aloficocianina), captam a energia luminosa em regiões do espectro luminoso não absorvido pela clorofila-a, aumentando a faixa de absorção da energia luminosa pelos organismos fotossintetizantes (TAIZ e ZEIGER, 2004)

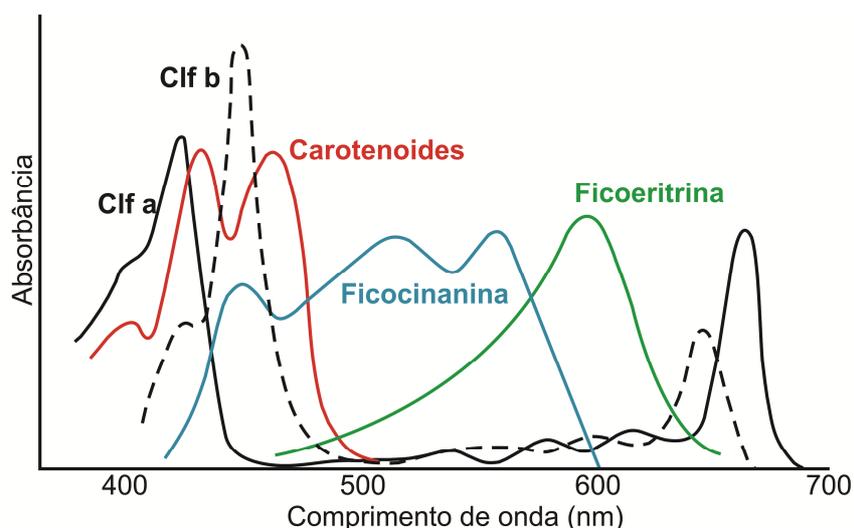


Figura2: Espectro de absorção da clorofila-a e dos pigmentos acessórios que atuam na captação da luz para a realização da fotossíntese
 (http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_11.htm#Clorofila_y_otros_pigmentos)

Tem sido demonstrado que a aclimação desses organismos a diferentes intensidades de luz influencia o funcionamento de processos fisiológicos, como fotossíntese e respiração (O'BRIEN et al., 2009), uma vez que esses processos são diretamente afetados pela variação da intensidade luminosa e pela aclimação ao escuro. Em função da variação na quantidade e qualidade da luz que chega para o fitoplâncton, estes organismos desenvolveram mecanismos de adaptação como modificações no aparato fotossintético e na quantidade dos pigmentos responsáveis pela captação de luz. Sob baixa intensidade luminosa, há um aumento na quantidade de clorofila-a, para aumentar a eficiência na captação de luz. E em alta intensidade luminosa, há um aumento na quantidade de carotenóides, que podem exercer função de fotoproteção (MÜLLER et al., 2003).

Os organismos são sensíveis não somente aos valores absolutos de intensidade luminosa, como também a variações no fotoperíodo (REYNOLDS, 1994). Variações nas condições luminosas podem também afetar organizações biológicas, como população e comunidade, uma vez que flutuações de luz podem ser traduzidas como

mudanças na taxa de crescimento em longo prazo, promovendo mudanças nos padrões de dominância e dinâmica de populações (LITCHMAN, 1998). Além disso, a variação na qualidade e quantidade da luz pode criar “nichos de luz”, e qualquer alteração nestes parâmetros pode promover a substituição de espécies no fitoplâncton (ZOHARY et al., 2010).

Em um lago, a atenuação vertical da radiação com a profundidade possibilita a criação de três regiões distintas na coluna d'água, que interfere na produtividade primária do fitoplâncton: 1) excesso de radiação, 2) saturação de radiação e 3) limitação por escassez de radiação (ESTEVES, 1998). Quando os organismos fotossintetizantes são expostos a valores ótimos de intensidade luminosa, o crescimento é aumentado. Porém quando a disponibilidade da intensidade luminosa é aumentada ou reduzida, estes organismos podem apresentar diferentes mecanismos e estratégias, para otimizar a taxa de fotossíntese e o crescimento. Essas modificações podem apresentar objetivos fisiológicos distintos e por isso, são classificadas como fotoaclimação, fotoproteção e fotoreparo (RAGNI et al., 2008; SILVA, 2008). A fotoaclimação compreende modificações necessárias para otimizar a fotossíntese como: modificação do conteúdo celular de clorofila, da razão clorofila/carbono, da razão pigmentos fotossintéticos/não fotossintéticos (SILVA, 2008). A fotoproteção inclui mecanismos rápidos capazes de prevenir ou diminuir o fotodano causado pela exposição a altas intensidade luminosas, geralmente dissipando o excesso da energia luminosa (FALKOWSKI e RAVEN, 2007). O fotodano e a fotoinibição ocorre depois da saturação da capacidade de fotoproteção e fotoaclimação da alga, e geralmente o primeiro está associado à degradação da proteína D1 (ADIR et al., 2003; SILVA, 2008), e o segundo a duas formas de inibição da fotossíntese: a) inibição fotoquímica, que consiste na paralização da taxa de transferência de elétrons, fotoxidação dos pigmentos

e na contração dos cloroplastos que levam a redução da fluorescência; b) aumento acentuado da fotorespiração. A inibição por excesso de radiação é um processo que depende do tempo de exposição, uma vez que em períodos curtos de exposição (inferiores a 10 minutos) o processo é reversível, ou seja, o fotossistema é reparado em horas, fotoreparo (ESTEVES, 2011).

Produção Primária e Fotossíntese

A produção primária é a assimilação da energia e a produção de matéria orgânica por organismos autótrofos – fotossintetizantes e quimiossintetizantes (ODUM e BARRETT, 2007). A fotossíntese corresponde à síntese de compostos orgânicos a partir da conversão biológica da energia luminosa em energia química. Este processo pode ser subdividido em duas etapas: uma diretamente (fase biofísica, ou seja, responsável pela absorção, transferência e interconversão de energia luminosa) e outra indiretamente (fase bioquímica, responsável pela fixação de carbono e produção de biomassa) dependente de luz (TAIZ e ZEIGER, 2004; FALKOWSKI e RAVEN, 2007). Para a realização da fotossíntese, os organismos fotossintetizantes dispõem de complexo pigmento-proteína, constituídos por clorofila-a e pigmentos acessórios, responsáveis pela captação e transferência da energia para uma região especializada, onde ocorrem as reações fotoquímicas, denominada de centro de reação. O conjunto formado por esses complexos com centros de reação origina as duas unidades fotossintéticas distintas: fotossistemas I (PSI) e II (PSII). O PSII e o PSI estão arrançados em série e interligados por uma cadeia de transporte de elétrons, cujo fluxo é determinado em função da diferença do potencial de redução entre os diferentes constituintes: plastoquinona (PQ), complexo citocromo *b6f*, plastocianina (PC), ferredoxina e ferredoxina-NADP redutase (RAVEN et al., 2001, FALKOWSKI e RAVEN, 2007). Ao absorver energia luminosa

(fóton), os pigmentos fotossintéticos transferem elétrons de um orbital mais interno para um mais externo (mais energético). O retorno para o estado fundamental transfere a energia absorvida para um pigmento vizinho e, neste processo, parte da energia é dissipada por emissão de luz e/ou de calor (Fig.3). A emissão da luz envolvida nesse processo é chamada de fluorescência e a sua medida é uma ferramenta importante para o estudo do funcionamento e eficiência dos fotossistemas dos organismos fotossintetizantes. Os pigmentos que participam deste processo são a clorofila-a, e os pigmentos acessórios (clorofilas b e c, os carotenóides e as ficobilinas) (FALKOWSKI e RAVEN, 2007).

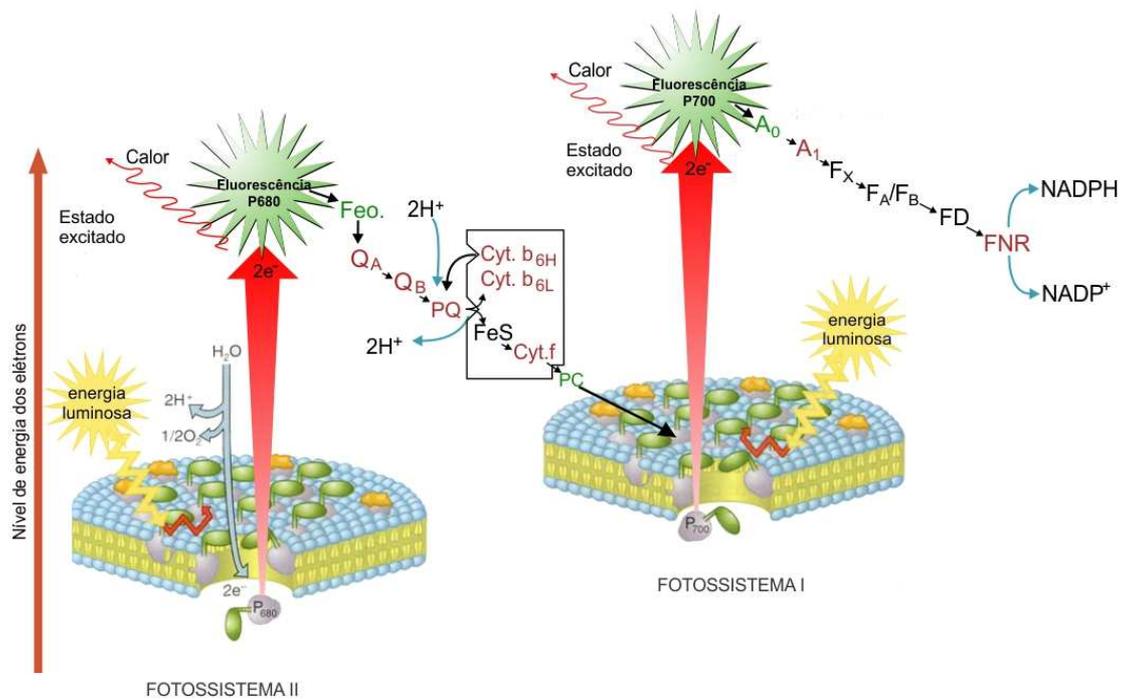


Figura3: Esquema em Z da fotossíntese demonstrando o transporte de elétrons entre os fotossistemas II e I, a emissão de fluorescência pela clorofila-a e a dissipação de calor. Modificado de <https://sites.google.com/site/geologiaebiologia/geologia-e-biologia-10o/conteudos-de-biologia/obteno-de-matria/fotossntese-1#TOC-Mecanismo-fotossint-tico>.

O excesso de luz pode causar danos ao PSII, promovendo a degradação da proteína D1. Quando o PSII é danificado ocorre um bloqueio do transporte de elétrons,

pois a proteína D1 sofre alterações em sua conformação, sinalizando sua degradação por meio de proteases ligadas ao PSII. O dano em proteínas do centro de reação resulta numa desorganização estrutural do PSII que implica em nova síntese da proteína D1 no PSII, restabelecendo a atividade desses complexos e garantindo a sobrevivência de organismos fotossintetizantes no meio ambiente (ARAÚJO e DEMINICIS, 2009; SILVA, 2008).

Cianobactérias são conhecidas por serem fortes competidoras por luz (VISSER et al., 2005). Conhecer como estes organismos se comportam sob variação da intensidade luminosa é importante para entender melhor a ecofisiologia destes organismos. As curvas rápidas de luz (CRL) medem o rendimento quântico efetivo do PSII em função da intensidade luminosa através da taxa de transferência de elétrons (ETR) entre os fotossistemas. A relativa ETR é uma aproximação da taxa de elétrons bombeados através da cadeia fotossintética (BEER et al., 2001). A ETR pode ser intimamente relacionada com a atividade fotossintética, quando comparada a produção de oxigênio ou captação de CO₂. Com isso, CRL é uma ferramenta que apresentam à capacidade de resposta instantaneas dos organismos fotossintéticos a variações rápidas de luz (10-20 segundos) (RALPH e GADEMANN, 2005). Apesar de a CRL ser semelhante a uma curva P_xI (fotossíntese - intensidade luminosa), elas não são a mesma coisa e não deve ser interpretada como tal (HAWES et al., 2003). Em situações onde a intensidade da luz é variável, uma CRL pode fornecer uma avaliação atual da atividade fotossintética indicando a capacidade que o organismo fotossintetizante tem de tolerar flutuações imediatas da intensidade luminosa. Enquanto que as curvas P_xI são comumente usadas para medir e descrever a aclimação do aparato fotossintético a diferentes intensidades de luminosas, usando medições de troca de gás O₂ ou CO₂, e fornece o estado ideal da fotossíntese (FALKOWSKI e RAVEN, 2007).

As duas curvas apresentam regiões distintas: limitada por luz (inclinação inicial das curvas - α) a fotossíntese é limitada pela intensidade luminosa, saturada por luz (I_k) e o declínio (fotoinibida por luz P_xI , e regulação dinâmica do PSII na CRL). Na CRL, o declínio da curva indica a ocorrência da presença de mecanismos dissipativos de energia na forma de calor e o fenômeno pode ser descrito como “down regulation”. Nos dois tipos de curva I_k corresponde a intensidade luminosa em que a fotossíntese é limitada por luz.

Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procariotos, autotróficos, fotossintetizantes e que possuem três formas de organização: unicelulares, coloniais ou filamentosos (REYNOLDS, 2006). O sucesso de dispersão desse grupo está relacionado a uma série de adaptações morfológicas, fisiológicas, ecológicas e bioquímicas que permitiram a colonização de diferentes tipos de ambiente (HOEK et al., 1995) e que proporcionam vantagens ecológicas e fisiológicas sobre outras algas (OLIVER e GANF, 2000). A luz tem grande influência no desenvolvimento das cianobactérias, isto porque em condições de baixas intensidade luminosas, as cianobactérias têm vantagem sobre os demais grupos do fitoplâncton. As cianobactérias possuem além de clorofila a, outros pigmentos fotossintéticos denominados genericamente de ficobilinas. Existem três tipos de ficobilinas: ficoeritina, ficocianina e aloficocianina. Esses pigmentos captam a energia luminosa em regiões do espectro luminoso não absorvido pelas clorofilas, fazendo com que a transmissão de energia luminosa tenha eficiência próxima a 100% (GROSSMAN, 2003). Possuem vesículas de gás (aerótopos) cuja principal função é controlar a flutuabilidade das colônias e filamentos na coluna d'água, em resposta às condições ambientais (WALSBY, 1994; OLIVER e GANF, 2000). As cianobactérias

variam sua posição na coluna d'água em resposta à intensidade luminosa: na baixa intensidade luminosa os aerótopos são formados favorecendo seu deslocamento para facilitar a absorção de luz e quando a intensidade luminosa é elevada ocorre à perda dos mesmos para evitar o fotodano (VISSER et al., 2005).

Muitas espécies são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ocasionar uma série de conseqüências para toda biota aquática (CARMICHAEL et al., 2001; PAERL et al., 2001; SANT'ANNA, 2008). Dentre esse metabólicos destacam-se as toxinas que também podem provocar prejuízos à saúde humana (AZEVEDO et al., 2002; JOCHIMSEN, 1998, BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003.). Em condições propícias, as cianobactérias podem formar florações ou “blooms” (CHORUS e BARTRAM, 1999), que se caracterizam proliferação excessiva de algas fitoplanctônicas (ZOHARY e ROBERTS, 1990). O aumento da ocorrência de florações em ecossistemas aquáticos está relacionado à aceleração da eutrofização artificial desses ambientes (TUNDISI, 2003). *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* estão entre os gêneros mais comuns responsáveis por florações no Brasil (HUSZAR e SILVA, 1999), sendo apontados como potencialmente produtores de toxinas (SANT'ANNA E AZEVEDO, 2000). Por isso estão entre as cianobactérias mais estudadas do ponto de vista ecológico e de saúde pública no Brasil e no mundo (TUCCI e SANT'ANNA, 2003). Florações tóxicas desses gêneros vêm sendo registradas em vários ecossistemas aquáticos brasileiros (BOUVY et al., 2000; MARINHO e HUSZAR, 2002; SOARES et al., 2009).

Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii

Microcystis aeruginosa é uma cianobactéria colonial pertencente à ordem Chroococcales, suas colônias flutuantes são recobertas por uma camada de mucilagem (KOMAREK et al., 2002). É amplamente distribuída em todo o mundo, frequentemente

forma florações e é potencialmente produtora de microcistinas (SANT'ANNA & AZEVEDO 2000; HOGGER, 2003). Florações de *M. aeruginosa* estão relacionadas, principalmente, a períodos de estabilidade da coluna d'água em sistemas com elevado aporte de nutrientes (KUWATA e MIYAZAKI, 2000). *M. aeruginosa* parece possuir um elevado requerimento por luz e florações desta espécie foram registradas em elevadas condições luminosas (KOHLENER, 1992; MARINHO e HUSZAR, 2002; SOARES, et al., 2009). Floração desta espécie foi registrada no reservatório do Funil/RJ no verão de 2003, quando a intensidade luminosa na superfície foi de cerca de 2000 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SOARES et al., 2009).

Cylindrospermopsis raciborskii (WOLOSZYNSKA) Seenayya et Subba Raju (SEENAYYA & SUBBA RAJU) é uma cianobactéria filamentosa da ordem Nostocales, potencialmente produtora de toxinas e que pode formar florações. Possui um grande potencial invasivo, relacionado a uma série de estratégias que possibilitam seu sucesso e sua rápida disseminação pelo mundo. Dentre elas, migração na coluna d'água utilizando aerótopos; tolerância à baixa luminosidade e capacidade de estocar fósforo (PADISÁK, 1997). Podem produzir dois tipos de células especializadas: heterócitos e acinetos. Os heterócitos fixam o nitrogênio atmosférico, compensando a falta de nitrogênio do ambiente; e os acinetos, são células de resistência que permitem a sobrevivência da espécie em situações desfavoráveis (PADISÁK, 1997; WIEDNER, 2007). Além desses fatores, sua rápida dispersão ao redor do mundo parece estar relacionada à sua habilidade em tolerar uma ampla variação de condições, relacionada ao aquecimento global (BRIAND et al., 2004, WIEDNER, 2007). *C. raciborskii* é descrita na literatura, como uma espécie que possui baixo requerimento por luz. O baixo requerimento por luz é relacionado aos baixos valores de saturação de luz (I_k) durante a fotossíntese (PADISÁK e REYNOLDS, 1998).

As características fisiológicas dos organismos fotossintetizantes podem ser afetadas pela alteração na distribuição da luz a qual estes organismos estão submetidos na natureza ou em laboratório, e com isto, influenciar na ocorrência de florações de cianobactérias em ambientes aquáticos. Parâmetros como o requerimento por luz, o crescimento, as variações morfológicas de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, e as interações entre estas espécies são de fundamental importância para entender a ocorrência e a dominância destas espécies em ambientes aquáticos continentais.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar os requerimentos por luz de duas cianobactérias formadoras de florações (*Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*) e as implicações para sua ocorrência e dominância em sistemas aquáticos.

Específicos

1. Avaliar o crescimento de *M.aeruginosa* e *C. raciborskii* através da turbidez e da taxa de crescimento em diferentes intensidades luminosas;
2. Caracterizar os parâmetros fisiológicos de *M. aeruginosa* e *C. raciborskii*: pigmentos totais, atividade fotossintética em diferentes intensidades luminosas;
3. Avaliar as alterações morfológicas de *M.aeruginosa* e *C.raciborskii* em diferentes intensidades luminosas;
4. Avaliar o efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosas.

MATERIAS E MÉTODOS

Foram realizados dois grupos de experimentos para atender os objetivos deste trabalho. O experimento de Ecofisiologia foi realizado no Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese da UFRJ (L.E.A.F.) e o experimento de interação no Laboratório de Ecologia Aquática da UFJF- LEA.

Experimento Ecofisiologia

Organismos

Foram utilizadas cepas das cianobactérias MIRF-01 *Microcystis aeruginosa* (MIRF) e CYRF-01 *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYRF), em culturas unialgais e não axênicas. Ambas foram isoladas do Reservatório do Funil/RJ 2005, e foram gentilmente cedidas pela professora Dr^a Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) da UFRJ. As cepas foram mantidas no banco de culturas do Laboratório de Ecologia Aquática (LEA), da UFJF em culturas tipo batch, em meio de cultivo ASM-1 (GORHAN et al., 1964), pH \approx 8.0, 25 (\pm 2) °C, 35 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em fotoperíodo 12 horas. (Fig.4).

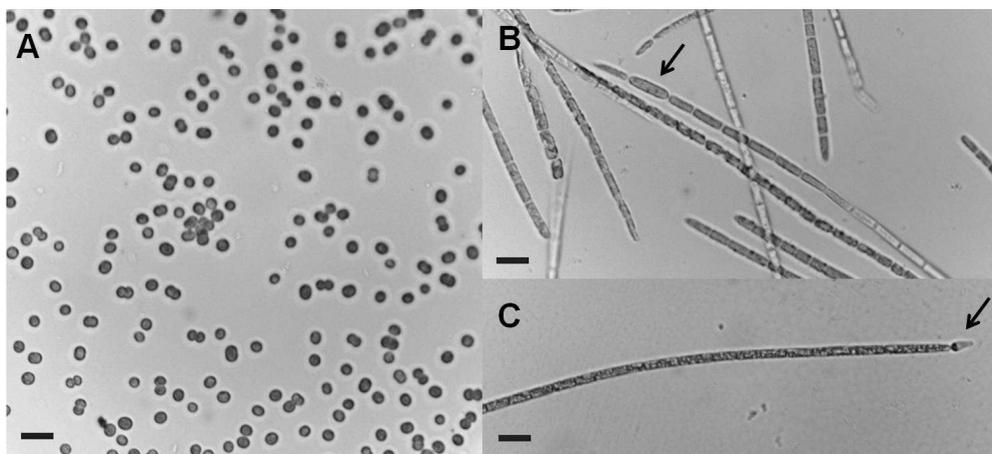


Figura 4: Cepas utilizadas nos experimentos: células isoladas de *M. aeruginosa*- MIRF (A) e tricomas de *C.raciborskii* – CYRF (B e C). Acineto (seta em B) e heterócito (seta em C) em destaque (barras = 10 μm).

Determinação da intensidade luminosa

A iluminação foi provida por lâmpadas fluorescentes dispostas lateralmente (Philips, de 15 W e 42 W, luz branca). Dependendo do número de lâmpadas e da distância entre elas e os frascos de cultivo, as culturas foram expostas às intensidades luminosas 25, 50, 300, 600, μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A densidade do fluxo de fótons (PPFD) da radiação fotossinteticamente ativa (PAR comprimento de onda de 400-700nm) foi estimada por meio de um sensor esférico (Modelo: US-SQS/L Heins Walz GmbH, 2008, Germany) acoplado a um integrador radiométrico Li-250A (Li-Cor Inc., USA). A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) das culturas foi medida no interior dos frascos. Devido à aproximação com as lâmpadas, a temperatura foi mantida a $25 (\pm 2)^\circ \text{C}$ (Fig. 5).

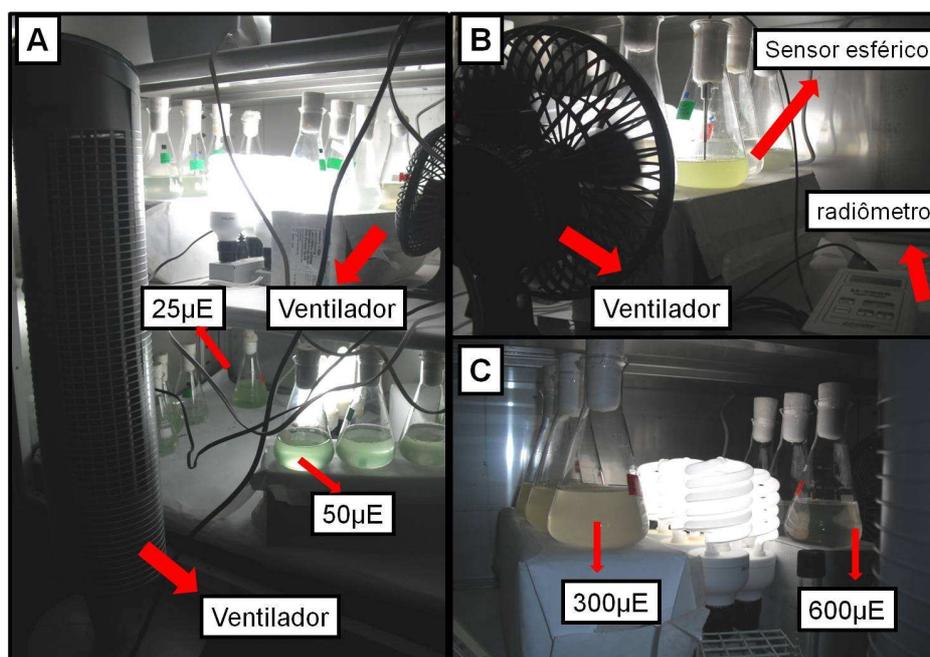


Figura 5: Bancadas onde foram realizados os experimentos. (A) Destaque para as intensidade luminosas 25 e 50 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e para os ventiladores que auxiliaram na manutenção da temperatura em $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. (B) PPFD das culturas sendo medida no interior dos frascos e o ventilador bem próximo das culturas de altas intensidade luminosas 300 e 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (C) Disposição das lâmpadas e das culturas para as altas intensidade luminosas.

Aclimação das células

As células foram aclimatadas e mantidas nos valores das intensidades luminosas utilizados neste estudo: 25, 50, 300, 600, $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A aclimação às menores intensidade luminosas (25 e 50 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi obtida em duas semanas através de repiques sucessivos das culturas no sétimo dia de crescimento. Para as intensidades maiores que 50 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, as culturas foram repicadas a cada 7 dias em uma intensidade luminosa maior até atingir a desejada (50→100→150→250→300→450→600). Após esta aclimação inicial, as células foram mantidas em fase exponencial de crescimento, sendo repicadas a cada sete dias de cultivo durante três semanas antes do experimento.

Culturas

Os cultivos em “batch” foram realizados em Erlenmeyers de 300 ml contendo 200 ml de meio de cultura, em sala climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e submetidos a um fotoperíodo de 12 horas durante 12 dias. Para cada cepa foram realizados quatro tratamentos, nas intensidades luminosas: 25, 50, 300, 600, $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, em triplicatas. Os tratamentos utilizando *M. aeruginosa* foram designados como MIRF-25, MIRF-50, MIRF-300 e MIRF-600 e os de *C. raciborskii* denominados CYRF-25, CYRF-50, CYRF-300 E CYRF-600. Os inóculos para os tratamentos foram realizados utilizando as culturas previamente aclimatadas, no sétimo dia de cultivo. Para cada replica foi utilizado uma cultura previamente aclimatada nas condições já apresentadas. A concentração inicial das culturas foi de aproximadamente 10^5 células/ml. Os cultivos foram homogeneizados manualmente (três vezes ao dia).

Cronograma de análises

Os experimentos de ecofisiologia aconteceram entre os meses de setembro e outubro de 2010. Nos dias correspondentes ao inóculo (t_0), 6° (t_6) e 12° (t_{12}) dia de crescimento foram medidos em cada tratamento: densidade de fluxo de fótons (PPFD), turbidez. A cada dois dias foram retiradas alíquotas para o cálculo da densidade celular. Nos dias t_6 e t_{12} , foram realizadas as análises de quantificações de pigmentos (clorofila-a e carotenóides), espectro de emissão e de excitação de fluorescência estacionária do PSII, curva rápida de luz (CRL) (Fig. 6).

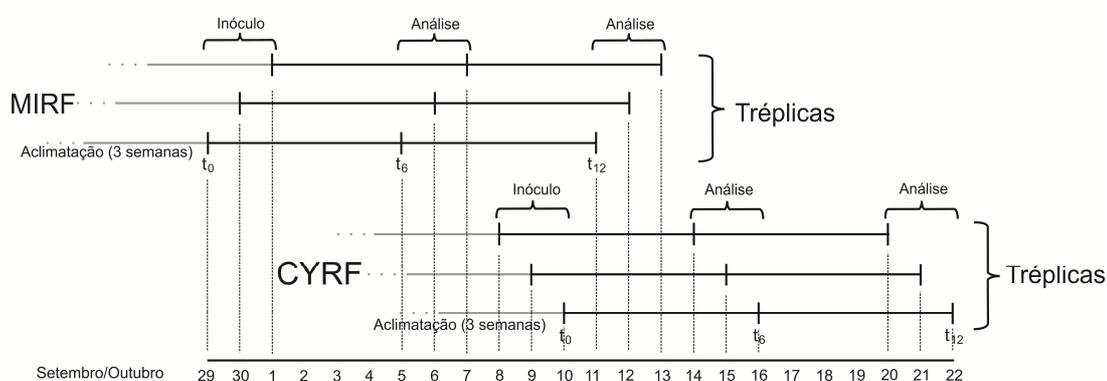


Figura 6: Esquema do experimento e das análises realizadas MIRF e CYRF de t_0 a t_{12} .

Crescimento de *M.aeruginosa* e *C.raciborskii*

- Turbidez - Turbidez foi estimada através da absorbância em 750 nm (A_{750}), devido ao espalhamento de luz, em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Japão).
- Densidade de fluxo fótons fotossintéticos - A medida da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) ao longo dos 12 dias de experimento foi realizada conforme descrito no item (determinação da intensidade luminosa). O sensor esférico foi posicionado no interior dos frascos de cultura (Fig.7).



Figura 7: Determinação de PPF: O sensor esférico foi posicionado encontra-se no interior dos frascos, dentro das culturas.

c. Densidade celular, biovolume e taxa de crescimento - Para a estimativa da densidade celular 1,5 ml de amostra foram retirados das culturas a cada dois dias e as células foram fixadas com solução de lugol (básico). A densidade celular foi estimada em câmara de Neubauer, em microscópio Olympus BX41, em aumento de 40X (SIPAUBA-TAVARES e ROCHA, 2003). O biovolume foi estimado pela multiplicação da abundância de cada espécie pelo volume médio de suas células, em cada tratamento. Para *M. aeruginosa* foi utilizado o volume da esfera e para *C. raciborskii* o volume do cilindro (HILLEBRAND et al., 1999). O diâmetro das células de *M. aeruginosa* e o tamanho e o comprimento das células *C. raciborskii* foram medidos com auxílio de ocular com escala micrométrica. A taxa de crescimento foi calculada através da regressão dos dados de densidade celular.

Parâmetros fisiológicos relacionados ao crescimento de *M.aeruginosa* e

C.raciborskii

a) Espectro de absorção de luz na região do visível - Os pigmentos (clorofila-a e carotenóides totais) foram extraídos com metanol 100% conforme descrito por PORRA et al., (1989). Para cada tratamento, 20 mL das culturas foram centrifugados (centrífuga Sorvall, modelo RC5B) a 10.000 rpm (rotor SS-34), a 21°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a cada tubo adicionou-se 3,0 mL de metanol 100%. Os tubos foram agitados em aparelho tipo “Vortex” por 30 segundos e permaneceram no escuro por 30 min, à temperatura ambiente. Após nova agitação em “Vortex”, o material foi centrifugado novamente a 8.000 rpm (rotor SS-34), a 21°C, durante 10 minutos. As absorbâncias dos sobrenadantes foram estimadas nos comprimentos de onda de 400 a 700 nm em espectrofotômetro UV-1800 (SHIMADZU, Japão). A quantificação da clorofila-a realizada de acordo MAC KINNEY (1941) (equação 1), considerando o valor da absorbância em 666 nm. Os carotenóides totais foram determinados segundo WELLBURN et al., (1994) (equação 2), considerando o valor da absorbância em 476 nm para MIRF e 473 nm para CYRF. Essa diferença na absorbância utilizada para calcular carotenóides totais para MIRF e CYRF foi devido aos os picos de absorção observado nos espectros de absorção de luz na região do visível.

$$(1) \text{ Chl a} = 13,8 \times A_{666}$$

$$(2) \text{ Car.} = (1000 \times A_{476} - 1,63 \times [\text{Chl-a}]) / 221$$

b) Fluorescência à temperatura ambiente - As análises de fluorescência do PSII foram realizadas com células (*in vivo*) provenientes dos cultivos de todos os tratamentos nos dias t_6 e t_{12} e foram detectadas em um espectro fluorímetro (modelo QM1; Photon

Technology International Inc.USA). Os espectros de emissão de fluorescência da clorofila-a do PSII foram detectados na região entre 600 e 750 nm, a partir da excitação da clorofila-a em comprimento de onda (λ) 438 nm ($\lambda_{exc.} = 438$ nm). Já os espectros de excitação foram registrados na faixa de 400 a 680 nm, a partir da detecção da emissão de fluorescência da clorofila-a a 682 nm ($\lambda_{em.} = 682$ nm).

c) Curvas rápidas de luz (CRL) - O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (PSII), ou seja, a eficiência real ou operacional do PSII (Φ_{PSII}) foi estimado através da técnica de Pulso e Amplitude Modulada (PAM), utilizando-se um Phytopam (Heins Walz GmbH, Alemanha) (equação 3). Os valores de fluorescência máxima ($F_{m\acute{a}x}$) e fluorescência estacionária (F) foram obtidos expondo as amostras a diferentes intensidades luminosas (WU, et al., 2008 – modificado). Foram utilizados 4 ml de amostras com células (*in vivo*) provenientes dos cultivos de MIRF e CYRF de todos os tratamentos no ultimo dia de experimento. Estas amostras foram expostas a ≈ 15 intensidades luminosas distintas cada uma delas por 20 segundos, findos os quais o material era submetido a um pulso de saturação luminosa ($8.000 \mu\text{mol de f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por 0,8 segundos para obtenção dos valores de $F_{m\acute{a}x}$ ($F_{m\acute{a}x}$ na presença de luz). As intensidades luminosas variaram de 16 a $1200 \mu\text{mol de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As curvas rápidas de luz foram estimadas através da taxa de transporte de elétrons (ETR), que é diretamente relacionada com a eficiência do fotossistema. O ETR foi calculado através da equação (4) (GENTY et al., 1989). Como são dois fotossistemas, o fator 0,5 representa a quantidade de energia luminosa (50%) que é distribuída ao PSII. Os dados experimentais foram exportados para o programa SigmaPlot (versão 11.0, 2008). O ajuste das curvas se deu pela equação (5) (RALPH e GADEMANN, 2005) substituindo o valor de fotossíntese máxima (Pm) pela taxa máxima de transferência de elétrons

($ETR_{M\acute{a}x}$). O I_k foi calculado dividindo $ETR_{M\acute{a}x}$ por α (equação 6), e corresponde ao ponto de saturação da fotossíntese (FALKOWSKI, 1994).

(3) $\Phi_{PSII} = (F_{m\acute{a}x} - F)/F_{m\acute{a}x}$	Φ_{PSII} = eficiência do PSII
(4) $ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times 0,5$	ETR = Taxa de transferência de elétrons PAR = Radiação entre (400-700 nm)
(5) $P = P_m(1 - e^{-(\alpha Ed/P_m)})$	Ed = Irradiância P = taxa fotossintética P _m = taxa fotossintética máxima
(6) $I_k = ETR_{m\acute{a}x}/\alpha$	α = inclinação inicial da curva

Avaliação das alterações morfológicas de *M.aeruginosa* e *C.raciborskii*

Para as análises de morfologia, tricomas e células de *C. raciborskii*, bem como células de *M. aeruginosa* foram medidas em microscópio Olympus BX41, em aumento de 40X e com auxílio de ocular com escala micrométrica. Foram medidos todos os tricomas de *C. raciborskii* quantificados durante a avaliação da densidade celular, observando comprimento e largura dos tricomas e comprimento das células. Para *M. aeruginosa*, foram medidos os diâmetros de 30 células de cada réplica, de cada tratamento. Como controle (MIRF-controle e CYRF-controle), foram medidos tricomas e células de *C. raciborskii* e células de *M. aeruginosa* de amostras de culturas mantidas na mesma intensidade luminosa do banco de cultivo ($35 \mu\text{mol de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

As micrografias foram obtidas em microscópio invertido Olympus BX71 em aumento de 64X, com máquina fotográfica acoplada ao microscópio e com o auxílio do programa Image Pro Plus 5.0 (2000). Para a realização das imagens, o material biológico contido em 2ml de amostra foi sedimentado durante 24 horas em câmaras de Utermöhl.

Experimento Interação

Efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosas

Além das cepas MIRF e CYRF, foi utilizada a cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolada do reservatório de Billings/SP, gentilmente cedida pela Dr^a Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) da UFRJ e mantida no banco de culturas do Laboratório de Ecologia Aquática (LEA), da UFJF em meio ASM-1 (GORHAN et al., 1964), pH \approx 8.0, 25°C, 35 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em fotoperíodo 12:12. T3 é descrita e como produtora de saxitoxinas (CARNEIRO et al., 2009).

Os experimentos foram realizados em triplicata: cultivos tipo “batch”, em Erlenmeyers de 300 ml contendo 150 ml de meio de cultura ASM-1, sala climatizada a 25°C \pm 2 e submetidos a um fotoperíodo de 12 horas durante 10 dias, em duas intensidades luminosas 50 e 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram utilizados os seguintes tratamentos:

- 1) monoculturas de *M. aeruginosa* (100% MIRF);
- 2) monoculturas de *C. raciborskii* T3 (100% T3);
- 3) monoculturas de *C. raciborskii* CYRF (100% CYRF);
- 4) culturas mistas (50% MIRF : 50% T3; 50%);
- 5) culturas mistas (50% MIRF : 50% CYRF) (Fig. 8).

Cada tratamento iniciou-se com biovolume inicial de ($10^7 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$). Amostras das culturas foram retiradas a cada 3-4 dias e as células foram fixadas com solução de lugol para determinação da densidade celular. A estimativa da densidade, biovolume e taxa de crescimento foram realizadas da mesma forma que descrita no experimento de ecofisiologia. As células não foram previamente aclimatadas.

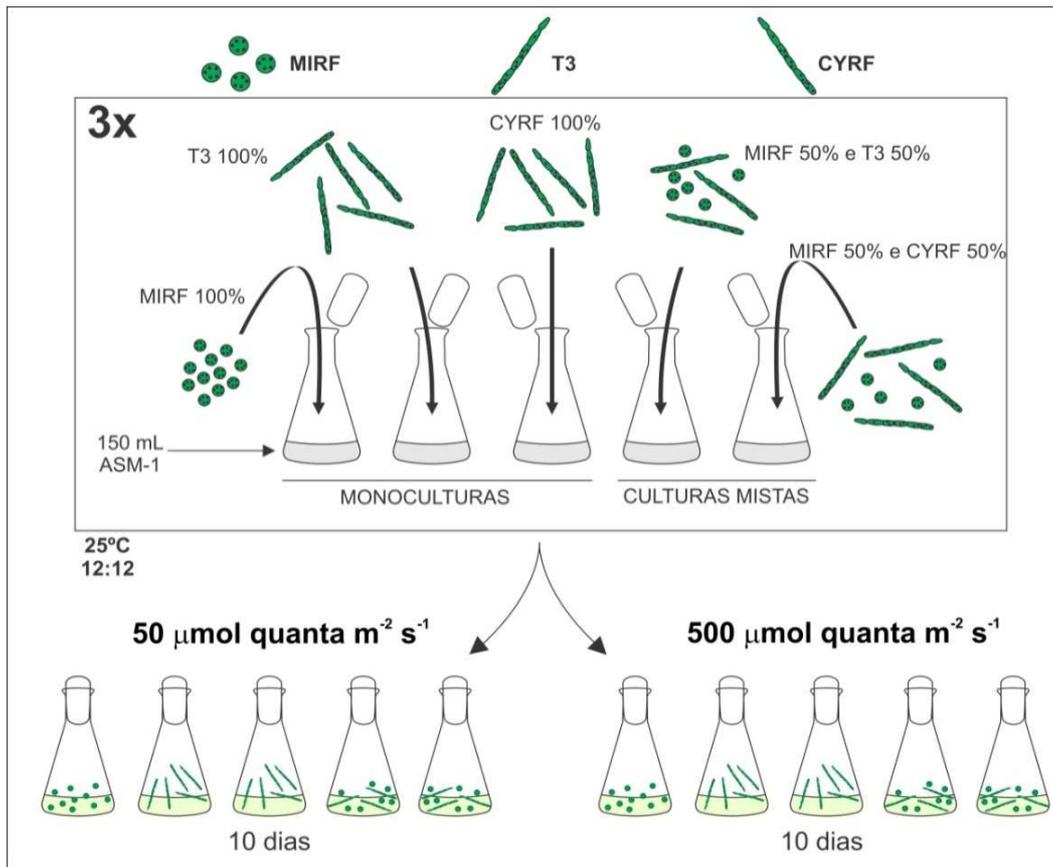


Figura 8: Esquema do desenho experimental utilizado para avaliar interação entre as espécies em diferentes intensidades luminosas.

Análise dos dados

Os tratamentos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) com espécies e temperaturas como fatores fixos. Na ausência de homogeneidade das variâncias ou normalidade dos resíduos, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis. Diferenças entre as médias foram avaliadas através do teste de Tukey ($p < 0.05$) através do software SPSS® 13.0.

RESULTADOS

Relações entre crescimento celular e disponibilidade de luz

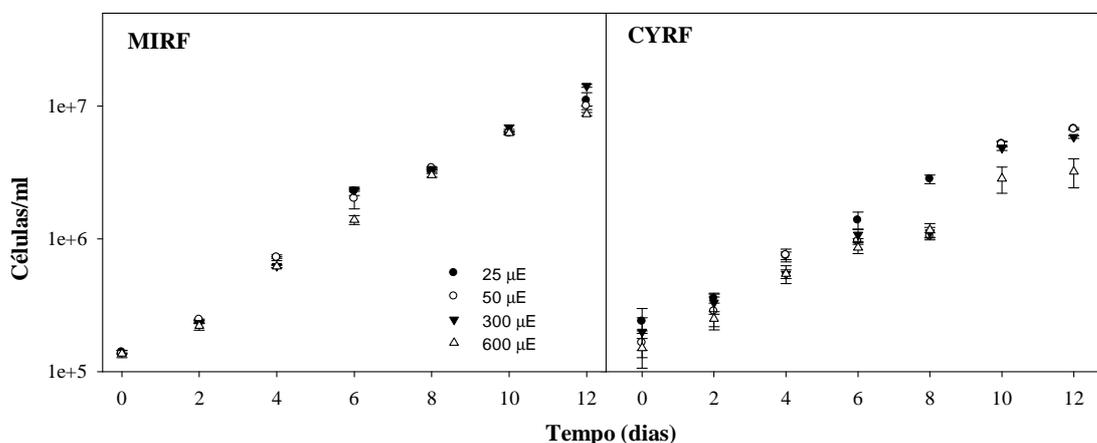


Figura 9: Curva de crescimento *Microcystis aeruginosa* MIRF e de *Cylindrospermopsis raciborskii* CYRF cultivadas nas intensidades luminosas 25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O aumento da densidade celular longo do tempo foi avaliado através densidade celular pelas contagens do número células (células/mL) Fig. 9. E através da densidade óptica das culturas, estimada a pela absorvância a 750nm (A_{750}),. Pode se observar um aumento da absorvância com o da densidade celular em todos os tratamentos de MIRF e CYRF ao longo do tempo (t_0 a t_{12}), (Figs. 10A e 11A). Concomitantemente observou-se um decréscimo da disponibilidade da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) ao longo do tempo (Figs. 10B e 11B). A relação inversa entre a densidade celular e a quantidade de luz capaz de penetrar na cultura (PPFD) pôde ser observada tanto em relação à absorvância (Figs. 10C e 11C) como em número de células (Figs. 12 e 13).

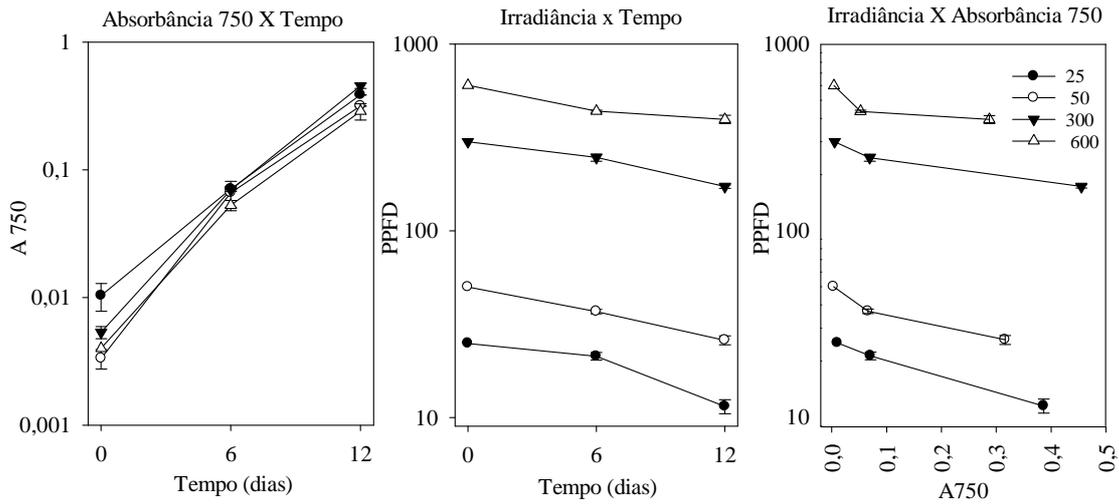


Figura 11: Crescimento de MIRF em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (A) varia\u00e7\u00e3o da densidade celular (expresso pela absorb\u00e2ncia a 750nm); (B) varia\u00e7\u00e3o da PPFD durante o crescimento da cultura (escala logar\u00edtmica em unidades de $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ao longo do tempo; (C) rela\u00e7\u00e3o inversa entre PPFD e a densidade celular.

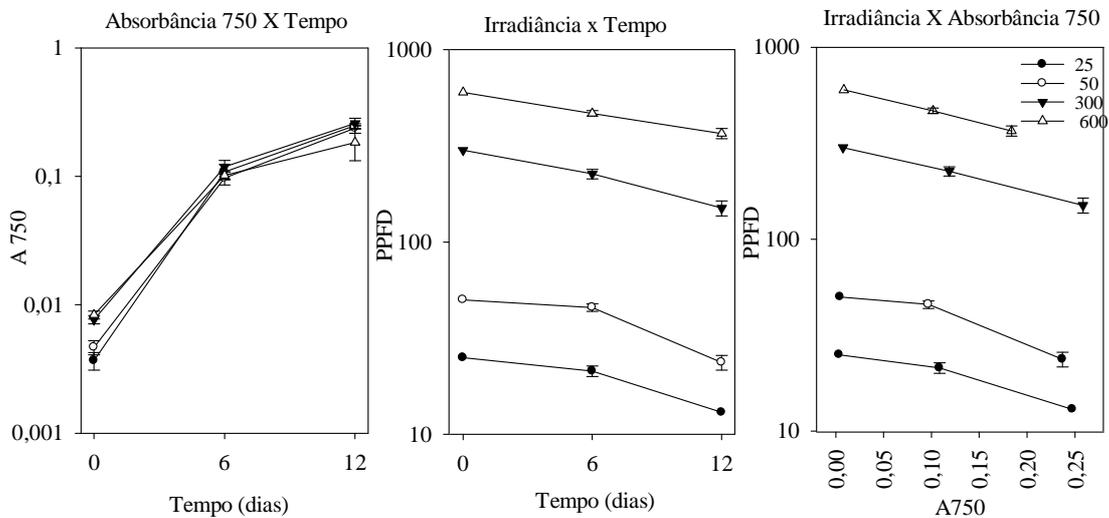


Figura 11: Crescimento de CYRF em diferentes intensidades luminosas (25 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (A) varia\u00e7\u00e3o da densidade celular (expresso pela absorb\u00e2ncia a 750nm) ao longo do tempo; (B) varia\u00e7\u00e3o da PPFD durante o crescimento da cultura (escala logar\u00edtmica em unidades de $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ao longo do tempo; (C) rela\u00e7\u00e3o inversa entre PPFD e a densidade celular.

\u00c0 medida que a densidade celular aumentou, ocorreu o aumento da turbidez devido ao espalhamento de luz promovido pelas part\u00edculas em suspens\u00e3o, diminuindo

desta forma, a intensidade de luz recebida pelas células em cada tratamento ao longo do tempo. Com isso, após 12 dias de cultivo (t_{12}), a quantidade de luz nos tratamentos de MIRF e CYRF reduziu cerca de 50 % quando comparada ao início dos tratamentos (t_0). A Figura 12 mostra que a redução da PPDF ao longo dos 12 dias foi de 66% em MIRF-25 (25 para 11 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 48% em MIRF-50 (50 para 26 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 43% em MIRF-300 (300 para 173 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de 34% em MIRF-600 (600 para 395 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A figura 13 mostra a redução da PPDF nos tratamentos de CYRF ao longo dos 12 dias de cultivo foi de 48% em CYRF-25 (25 para 13 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 53% em CYRF-50 (50 para 24 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 50% em CYRF-300 (300 para 150 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em 39% em CYRF-600 (600 para 366 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

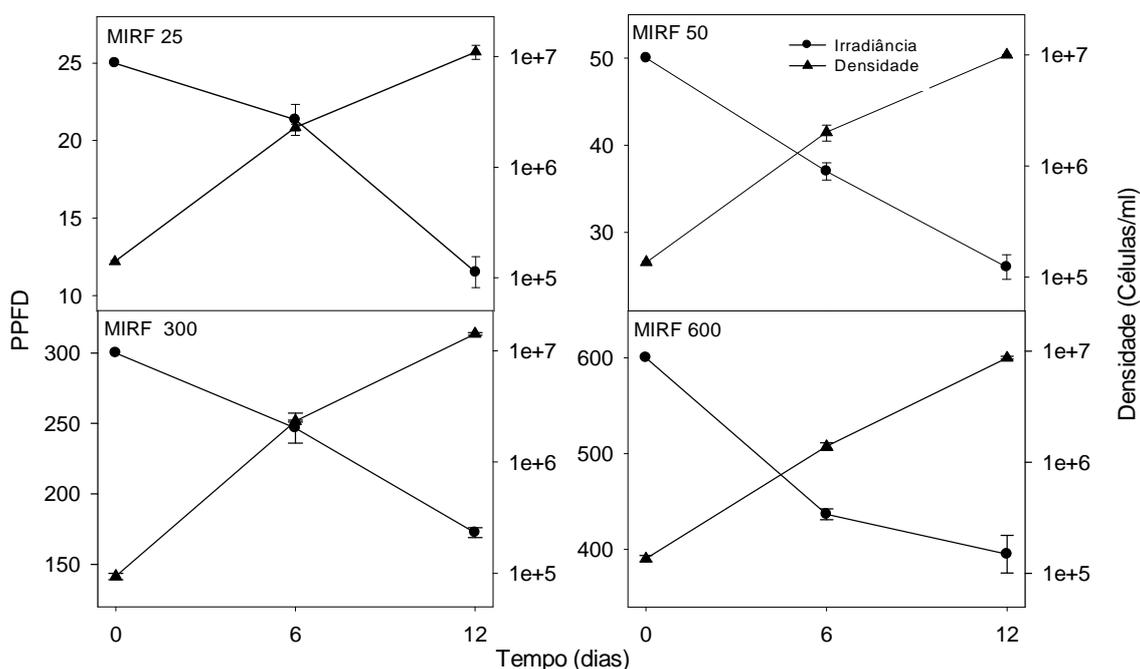


Figura 12: Relação entre PPDF (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a densidade celular (células/ml) ao longo do crescimento de MIRF.

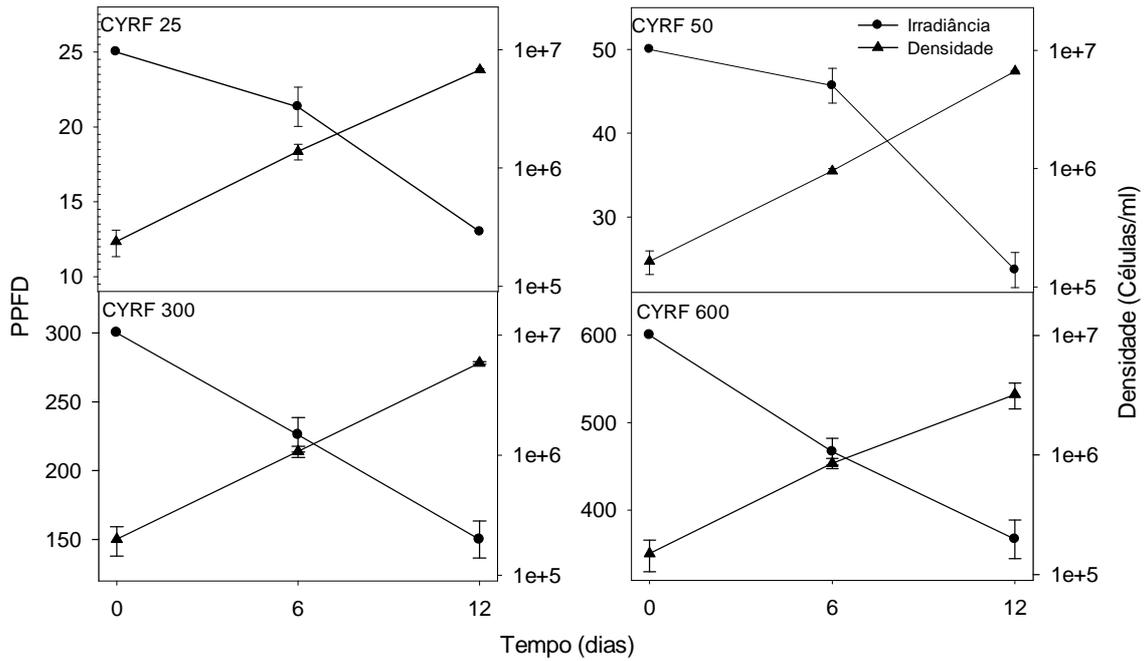


Figura 13: Relação entre PPFD (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a densidade celular (c\u00e9lulas/ml) ao longo do crescimento de CYRF.

As taxas de crescimento ao longo dos tratamentos (entre t_0 e t_{12}) de MIRF e de CYRF foram calculadas atrav\u00e9s da regress\u00e3o simples da curva de crescimento. N\u00e3o houve diferen\u00e7a significativa entre os tratamentos de MIRF (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e entre os tratamentos de CYRF (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($F = 58,511$; $p < 0,001$). As taxas de crescimento de MIRF foram de $0,38 \pm 0,015$ e as taxas de crescimento de CYRF foram de $0,29 \pm 0,019$ (Fig.14).

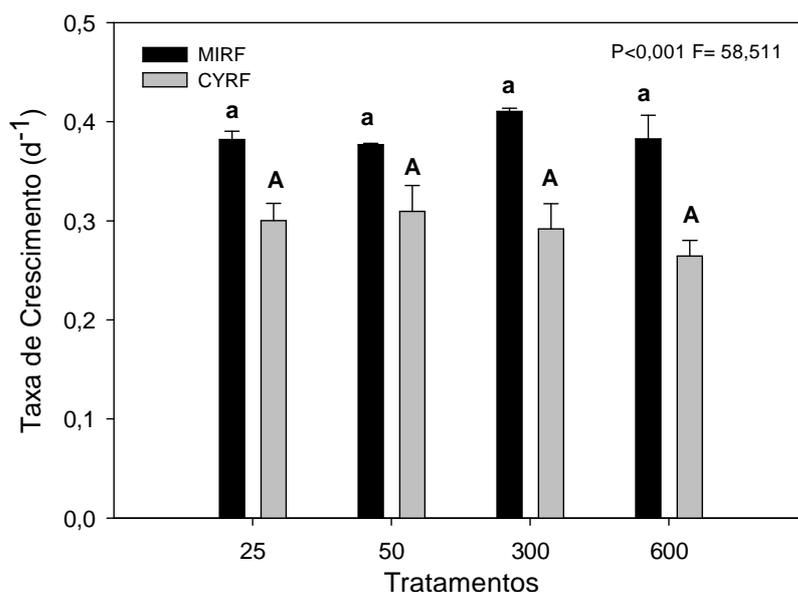


Figura 14: Taxas de crescimento de MIRF e CYRF baseadas na densidade celular ao longo dos dias de cultivo (t_0 a t_{12}) em diferentes intensidades luminosas.

Caracterização dos parâmetros fisiológicos relacionados à assimilação de luz por

M.aeruginosa e *C.raciborskii*.

Espectro de absorção de luz na região do visível

Os espectros de luz na região do visível (400 a 700 nm) de MIRF e CYRF mostraram um aumento do conteúdo de pigmentos ao longo do tempo de cultivo e uma diminuição dos pigmentos com o aumento da intensidade luminosa (25, 50, 300 e 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tanto em t_6 quanto em t_{12} . Os picos observados nos espectros na região dos comprimentos de onda de 440 e 660 (nm) são relacionados à concentração de clorofila-a, e os picos observados na região de 470 a 510 nm são relacionados à concentração dos carotenóides (Figs. 15 e 16).

Ao longo dos 12 dias de experimento observou-se uma alteração visual na coloração das culturas de MIRF e CYRF, com o aumento da intensidade luminosa (Fig. 17). Porém nas culturas de CYRF essas alterações foram mais evidentes, sendo que no fim do experimento (t_{12}), os tratamentos de baixa intensidade luminosas (CYRF-25 e

CYRF-50) as culturas permaneceram “verdes”, enquanto que nas altas intensidade luminosas (CYRF-300 e CYRF-600) as culturas tornaram-se “verde-amareladas”

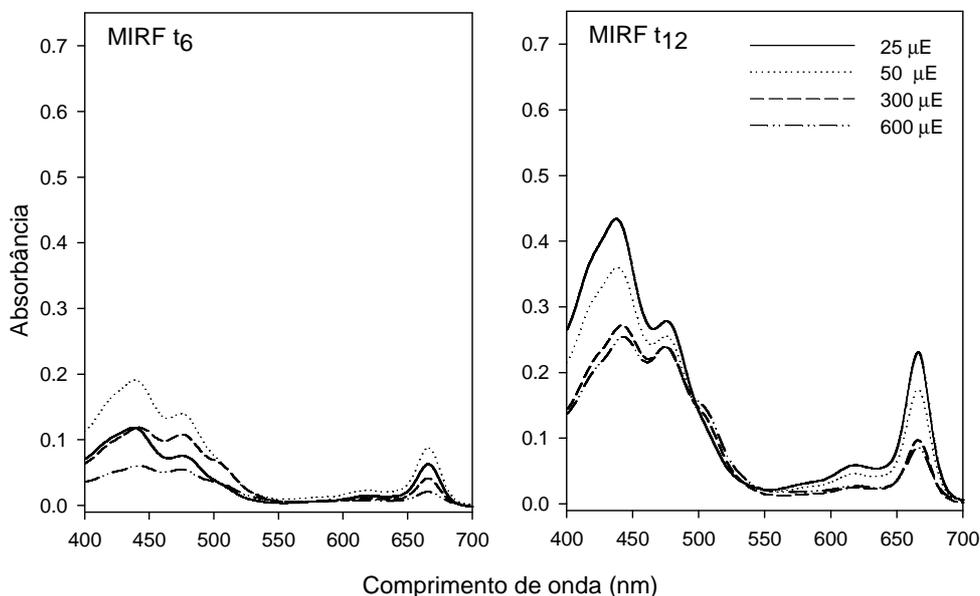


Figura 14: Espectro de absorção na luz visível (400 a 700 nm) por extração em Metanol de MIRF em cultivadas em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 6^o e 12^o dia de cultivo. Cada curva corresponde a um espectro representativo em cada condi\u00e7\u00e3o de crescimento.

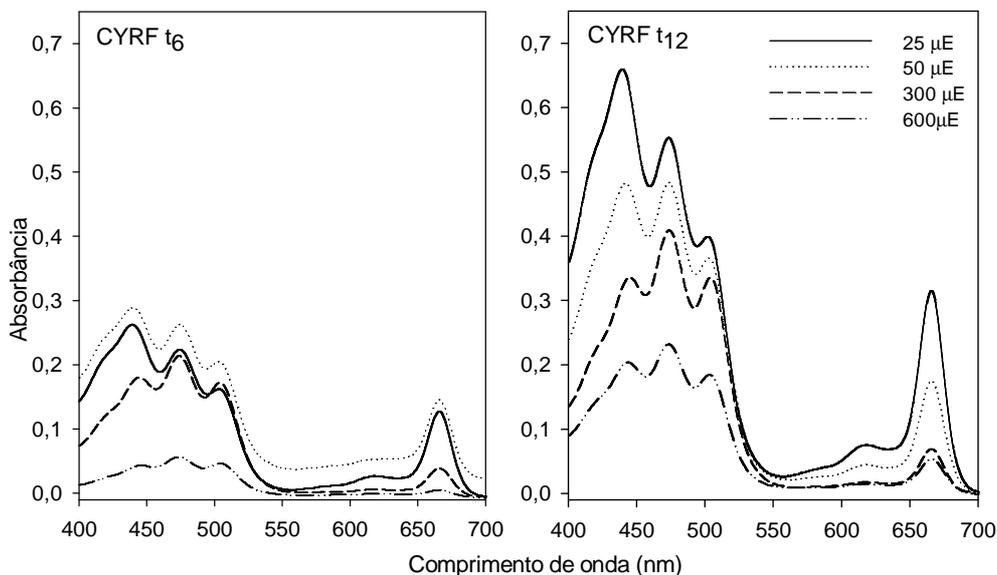


Figura 15: Espectro de absor\u00e7\u00e3o na luz vis\u00edvel (400 a 700 nm) por extra\u00e7\u00e3o em Metanol de CYRF cultivada em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 6^o e 12^o dia de cultivo. Cada curva corresponde a um espectro representativo em cada condi\u00e7\u00e3o de crescimento

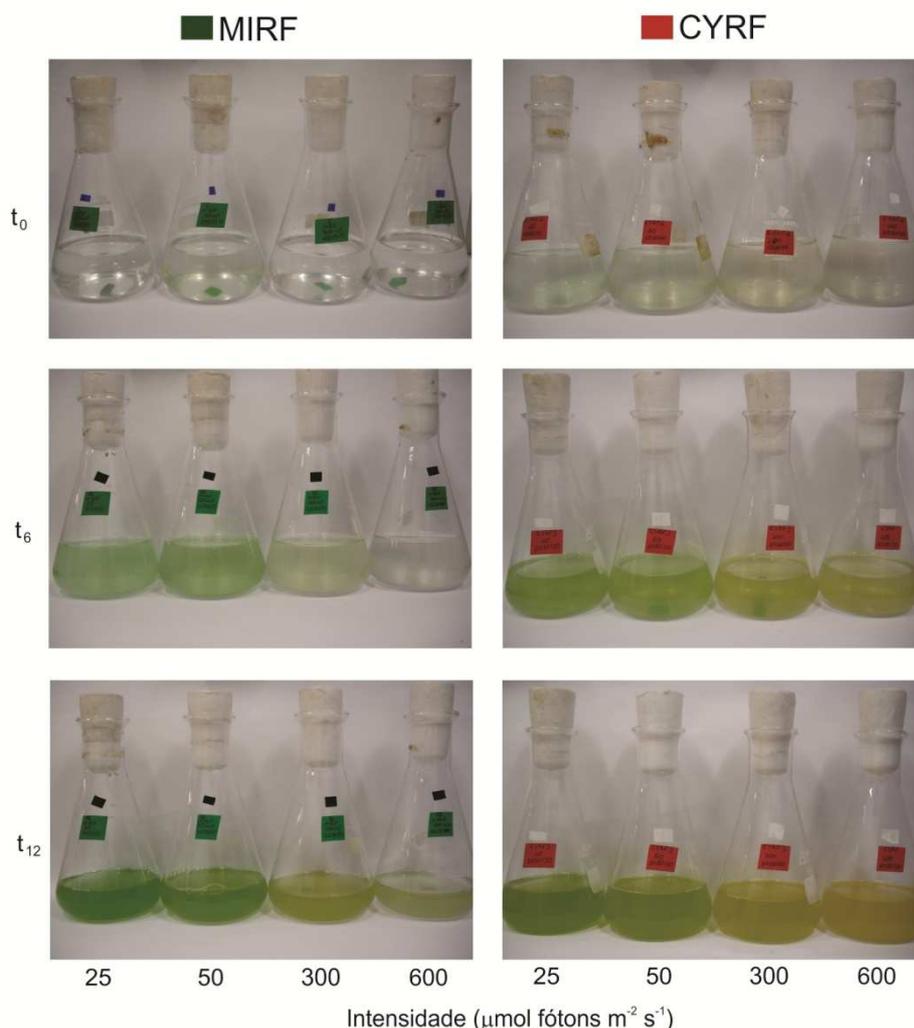


Figura 17: Culturas de MIRF e CYRF ao longo de 12 dias de experimento (t_0 , t_6 e t_{12}), nas intensidades luminosas: 25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Fluoresc\u00eancia Estacion\u00e1ria do PSII

\u00c0 temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$) a fluoresc\u00eancia emitida pelos fotossintetizantes \u00e9 do fotossistema II. A excita\u00e7\u00e3o com luz azul ($\lambda_{\text{exc.}} = 438 \text{ nm}$) das c\u00e9lulas cultivadas em diferentes intensidade luminosas, resultou numa emiss\u00e3o da fluoresc\u00eancia da clorofila-a que apresentou um m\u00e1ximo em 682 nm (Figs. 18 e 19). A emiss\u00e3o da fluoresc\u00eancia foi inversamente proporcional \u00e0s intensidade luminosas utilizadas, ou seja, maior fluoresc\u00eancia foi observada nas c\u00e9lulas cultivadas em menores valores de intensidade luminosa (25 e 50 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e menor fluoresc\u00eancia das c\u00e9lulas cultivadas

em intensidade luminosas mais elevadas (300 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), reflexo da diminui\u00e7\u00e3o da clorofila-a. Em MIRF t_{12} foi observado um “ombro” na regi\u00e3o e 650 nm, sugerindo que houve um aumento relativo de emiss\u00e3o de ficocianina.

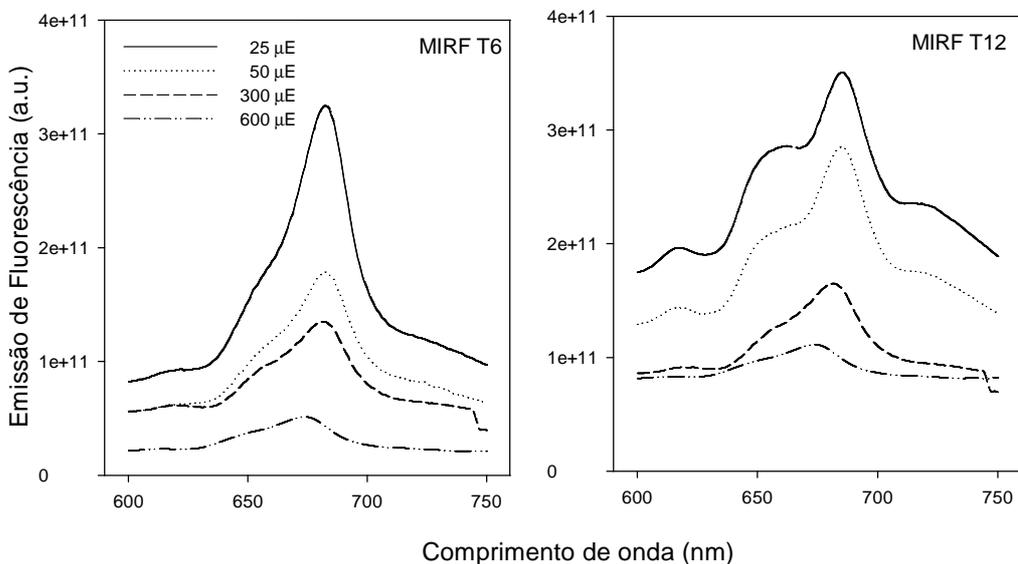


Figura 18: Emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia de MIRF cultivada em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 6\u00b0 e 12\u00b0 dia de cultiv . Excita\u00e7\u00e3o com luz em comprimento de onda de 438 nm. Cada curva corresponde a um espectro representativo em cada condi\u00e7\u00e3o de crescimento.

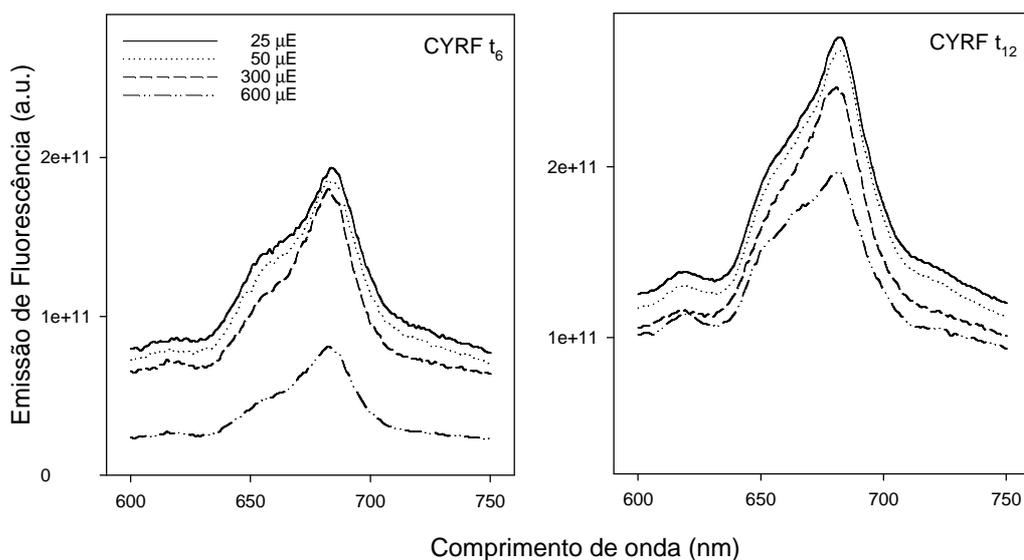


Figura 19: Emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia de CIRF-01 cultivada em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 6\u00b0 e 12\u00b0 dia de cultivo . Excita\u00e7\u00e3o com luz em comprimento de onda de 438 nm. Cada curva corresponde a um espectro representativo em cada condi\u00e7\u00e3o de crescimento.

Quando os dois tipos de células foram excitados na região espectral de 400-670 nm e a fluorescência da clorofila-a detectada em 682 nm, observou-se que a energia absorvida pelos carotenóides (região do azul) e pelas ficobilinas (região do laranja) foi transferida para a clorofila a do PSII (Figs. 20 e 21), evidenciando um acoplamento energético entre as antenas do PSII. De um modo geral, houve um aumento da fluorescência com o tempo de cultivo (t_6 para t_{12}), devido ao auto-sombreamento e uma diminuição da fluorescência com o aumento da intensidade luminosa de 25 para 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de cultivo.

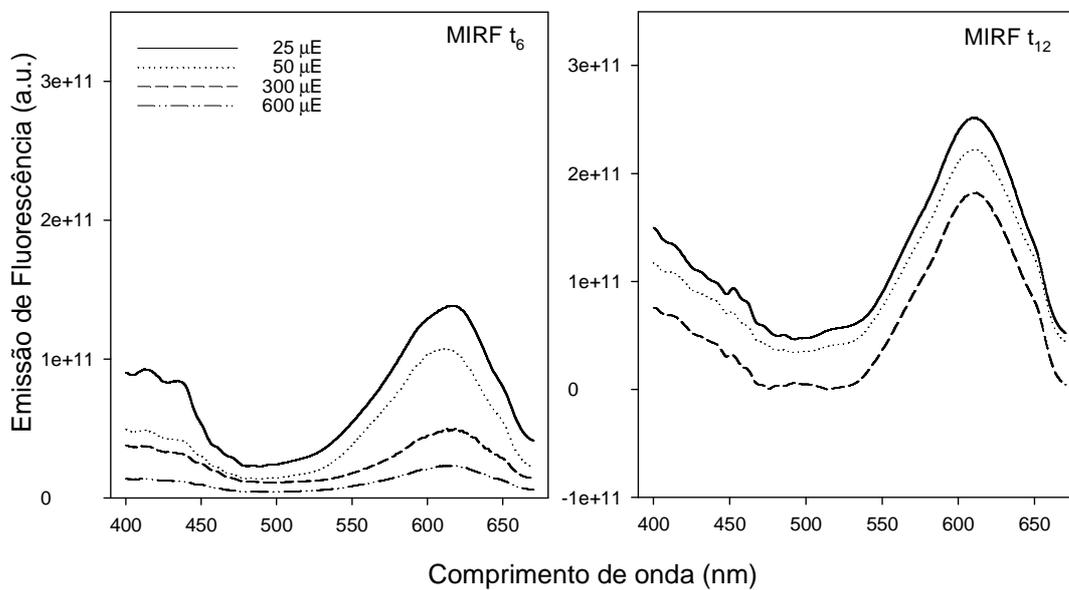


Figura 20: Espectro de emissão de fluorescência de MIRF cultivada em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 6^o e 12^o dia de cultivo. A emissão de fluorescência detectada a 682nm. Cada curva corresponde a um espectro representativo em cada condição de crescimento.

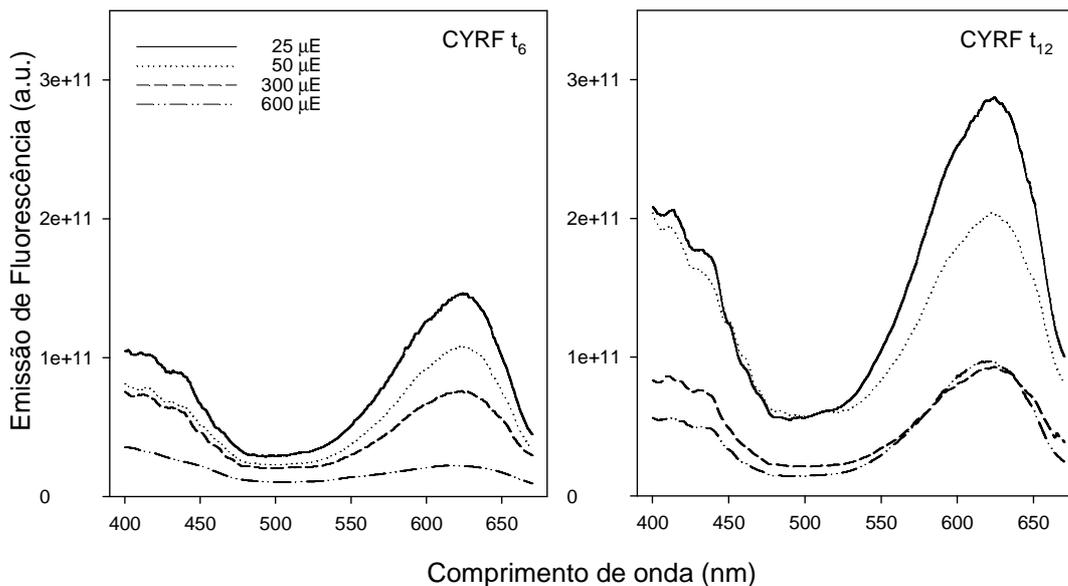


Figura 21: Espectro de excitação de fluorescência de CYRF cultivada em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 6^o e 12^o dia de cultivo. A emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia detectada a 682nm. Cada curva corresponde a um espectro representativo em cada condi\u00e7\u00e3o de crescimento.

Curva R\u00e1pida de Luz

Os par\u00e2metros das curvas r\u00e1pidas de luz (CRL) em MIRF, avaliados em t_{12} , foram semelhantes para todos os tratamentos ($\text{ETR}_{\text{m\u00e1x}} = F = 1,77; p = 0,9; \alpha = F = 1,21; p = 0,37$ e $\text{Ik} = F = 0,135; p = 0,93$) (Fig. 22). A efici\u00eancia fotossint\u00e9tica dada pelo valor de α (coeficiente angular) foi de $0,3 \pm 0,1$, houve uma tend\u00eancia de diminuir α com o aumento da intensidade luminosa. A taxa m\u00e1xima de transfer\u00eancia de el\u00e9trons ($\text{ETR}_{\text{m\u00e1x}}$) foi de $\approx 70 \mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para todos os tratamentos. Os valores de $\text{ETR}_{\text{m\u00e1x}}$ apresentaram um plat\u00f4 nas intensidade luminosas compreendidas entre 600 e 1200 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem que fosse observado a ocorr\u00eancia de fotoinibi\u00e7\u00e3o din\u00e2mica (down regulation). Os par\u00e2metros α , $\text{ETR}_{\text{m\u00e1x}}$ e IK para as CRLs de MIRF est\u00e3o representados na Tabela 1.

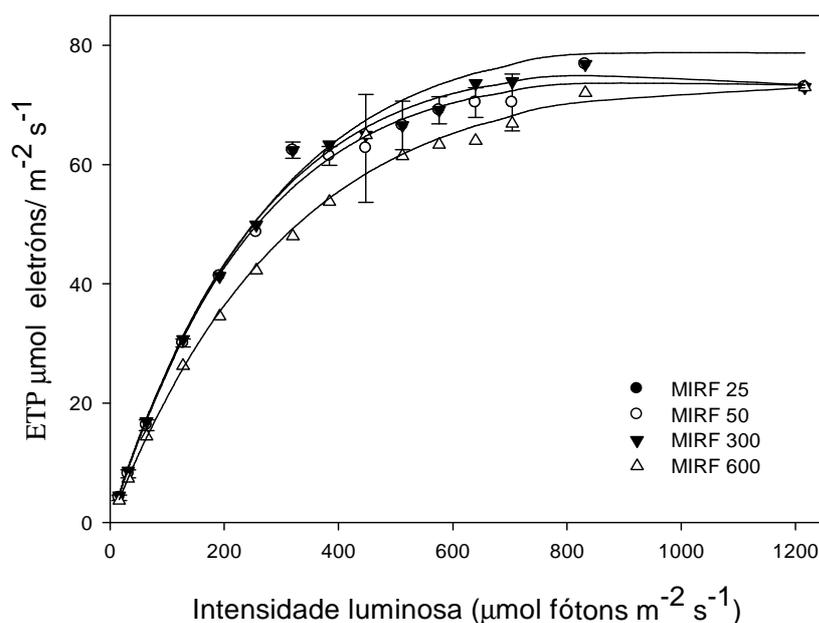


Figura 22: Curva rápida de luz de MIRF, no 12º dia de crescimento (t_{12}), cultivadas em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tabela 1: Parâmetros das curvas rápidas de luz (CRL) para MIRF em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). α = eficiência fotossintética ($\mu\text{mol elétrons}/\mu\text{mol fótons}$); $\text{ETR}_{\text{máx}}$ = taxa máxima de transferência elétrons ($\mu\text{mol elétrons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); I_k = intensidade luminosa de saturação da fotossíntese ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Curva rápida de Luz - MIRF				
12º dia de cultivo				
Parâmetro	25	50	300	600
	($\mu\text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)			
α	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0$
$\text{ETR}_{\text{máx}}$	$73,5 \pm 0,1$	$79,5 \pm 4,5$	$69,2 \pm 20,5$	$62,7 \pm 0$
I_k	$255,6 \pm 0$	$256,7 \pm 33,4$	$286,3 \pm 37,3$	$261,9 \pm 0$

As CRL de CYRF foram semelhantes entre todos os tratamentos (Fig.23). A taxa máxima de transferência de elétrons ($\text{ETR}_{\text{máx}}$) foi cerca de $\approx 70 \mu\text{mol elétrons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($F = 2,1$; $p = 0,105$), a eficiência fotossintética (α) foi 0,3. O índice de saturação por luz (I_k) aumentou também foi semelhante $230 \pm 8,6$ em todos os tratamentos, sugerindo uma aclimação das células nas intensidades luminosas utilizadas. (Tab. 2). Os valores

de ETR_{Max} , assim como nas CRL de MIRF, apresentaram um platô nas intensidade luminosas compreendidas entre 600 e 1200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem que fosse observado a ocorrência de fotoinibição dinâmica (down regulation. As CRLs demonstram que MIRF e CYRF se comportaram de forma semelhante às mudanças rápidas da intensidade luminosa incidente sobre as células.

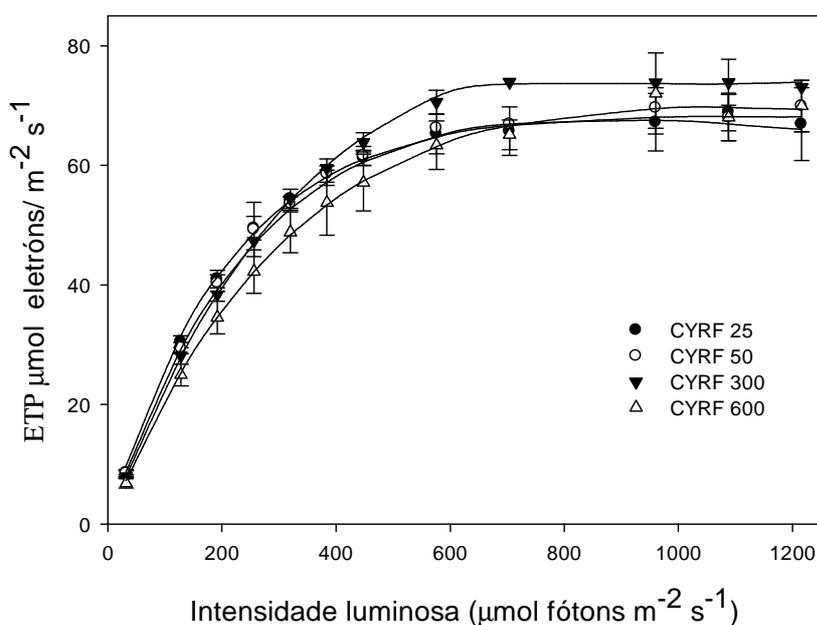


Figura 23: Curva rápida de luz de CYRF, no 12º dia de crescimento (t_{12}), cultivadas em diferentes intensidade luminosas (25, 50, 300, 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tabela 2: Parâmetros das curvas rápidas de luz (CRL) para CYRF em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300, 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). α = eficiência fotossintética (μmol elétrons/ μmol fótons); $ETR_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de transferência elétrons (μmol de elétrons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); I_k = intensidade luminosa de saturação da fotossíntese (μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Curva rápida de Luz - CYRF				
12º dia de cultivo				
Parâmetro	25 ($\mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	50 ($\mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	300 ($\mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	600 ($\mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
α	$0,30 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,08$	$0,30 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,07$
$ETR_{m\acute{a}x}$	$66,65 \pm 6,37$	$69,0 \pm 7,43$	$73,1 \pm 10,64$	$69,6 \pm 0,74$
I_k	$222 \pm 24,2$	$230,5 \pm 26,8$	$243,6 \pm 16,8$	$232 \pm 38,1$

Efeito da luz na morfologia

Variações na morfologia de MIRF

Para a verificação da alteração do diâmetro das células de *M. aeruginosa*, foram incluídas medidas referentes ao período de pré aclimação das culturas MIRF-controle ($35 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O diâmetro das células de *M. aeruginosa* variou em função das intensidades luminosas utilizadas ($X^2 = 133,8$; $p < 001$), mas não apresentou diferenças significativas ao longo dos dias do experimento ($F = 0,27$; $p = 0,8$), indicando o efeito da aclimação prévia das culturas. O diâmetro das células de MIRF variou de $3,8 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (MIRF-25 e MIRF-controle) a $5,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$ em MIRF-600. Desta forma, foram observados três grupos homogêneos: 1) MIRF-controle, MIRF-25 e MIRF-50; 2) MIRF-controle, MIRF-50 e MIRF-300 e 3). MIRF-600 (Fig. 24). Além da variação no diâmetro das células, observou-se também agregações das células, muito parecida com colônias, em MIRF-25 e MIRF-50 (Fig.27, A-E).

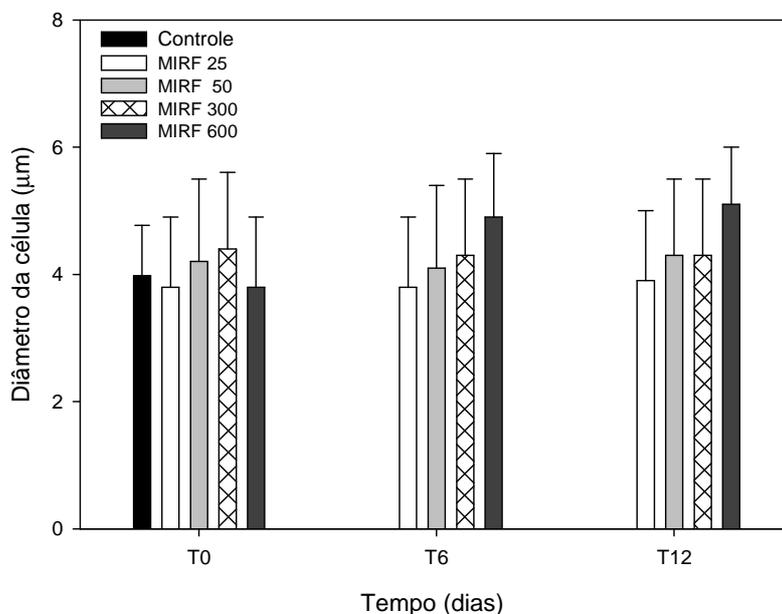


Figura 24. Variação no diâmetro das células de MIRF-01 no controle (período pré aclimação) e em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300 e 600 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ao longo de 12 dias.

Variações na morfologia de CYRF

As características morfológicas analisadas em *C. raciborskii* variaram de acordo com as diferentes intensidades luminosas e ao longo do tempo. De maneira geral, houve um aumento no comprimento dos tricomas nas intensidades mais elevadas ($X^2 = 342,7$; $p < 001$). Assim, o teste de Tukey separou três grupos homogêneos: 1). CYRF-25 ($60,1 \pm 32,8 \mu\text{m}$); 2). CYRF-50 ($41,3 \pm 31,1 \mu\text{m}$) e 3) CYRF-300 ($86,1 \pm 39,1 \mu\text{m}$) e CYRF-600 ($80,7 \pm 42,4 \mu\text{m}$). Ao longo do tempo, o comprimento médio dos tricomas para todos os tratamentos foi igual entre t_0 e t_{12} , mas sofreu um leve aumento em t_6 ($X^2 = 112,1$; $p < 001$) (Fig. 25).

Para as análises do tamanho das células (comprimento e largura), foram incluídas medidas referentes ao período de pré aclimação das culturas CYRF-controle ($35 \mu\text{mol fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com o objetivo de avaliar se o efeito pôde ser observado ao longo do período de aclimação. O comprimento das células variou de cerca de $8,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$ em CYRF-controle e em CYRF-25 a $9,7 \pm 1,8$ em CYRF-600 ($F = 3,9$; $p = 0,06$), formando dois grupos homogêneos: 1). CYRF-controle, CYRF-25, CYRF-50 e CYRF-300 e 2). CYRF-300 e CYRF-600 (Fig. 26, A). A largura das células também variou ao longo dos tratamentos ($F = 14,6$; $p < 0,01$). O teste de Tukey apresentou dois grupos homogêneos: 1) CYRF-controle, CYRF-25 e CYRF-50; 2) CYRF-300 e CYRF-600 (Fig. 26, B). Os tricomas de CYRF-50 apresentaram um estreitamento nas extremidades. As alterações morfológicas foram mais evidentes nos tratamentos de CYRF-300 e CYRF-600 onde também foram observados tricomas levemente curvados com diferenciação nas extremidades. Em CYRF-600 houve ocorrência de filamentos bifurcados (Fig.27, J).

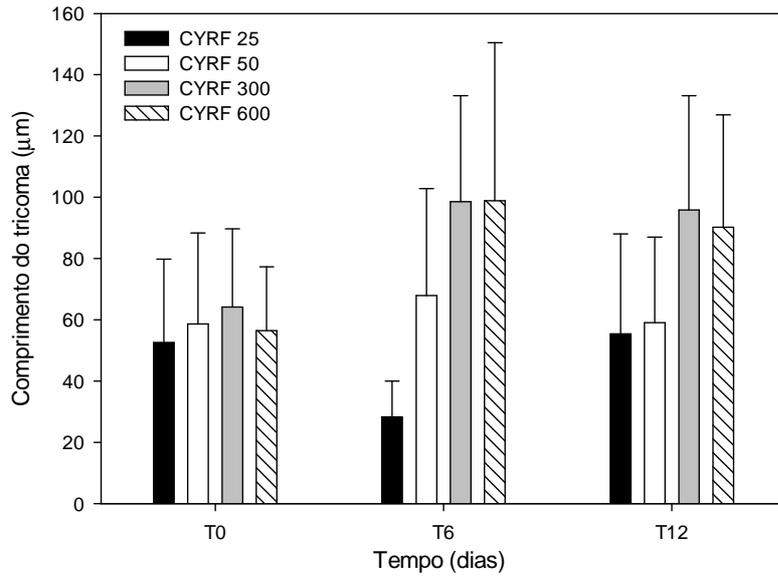


Figura 25 : Variação no comprimento dos tricomas de CYRF-01 em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ao longo de 12 dias.

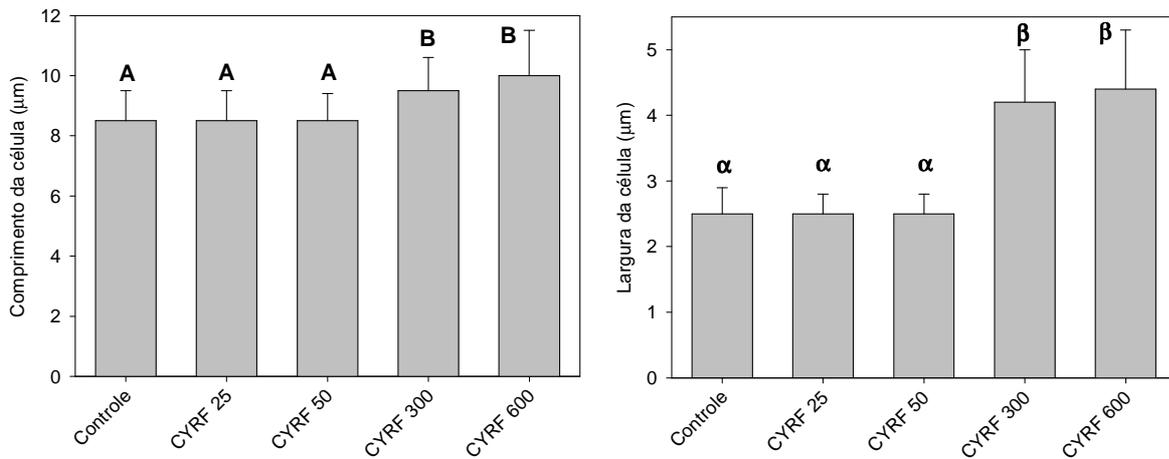


Figura 26. Variação no comprimento (A) e largura (B) das células de CYRF-01 no controle (período pré aclimação) e em diferentes intensidades luminosas (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ao longo de 12 dias.

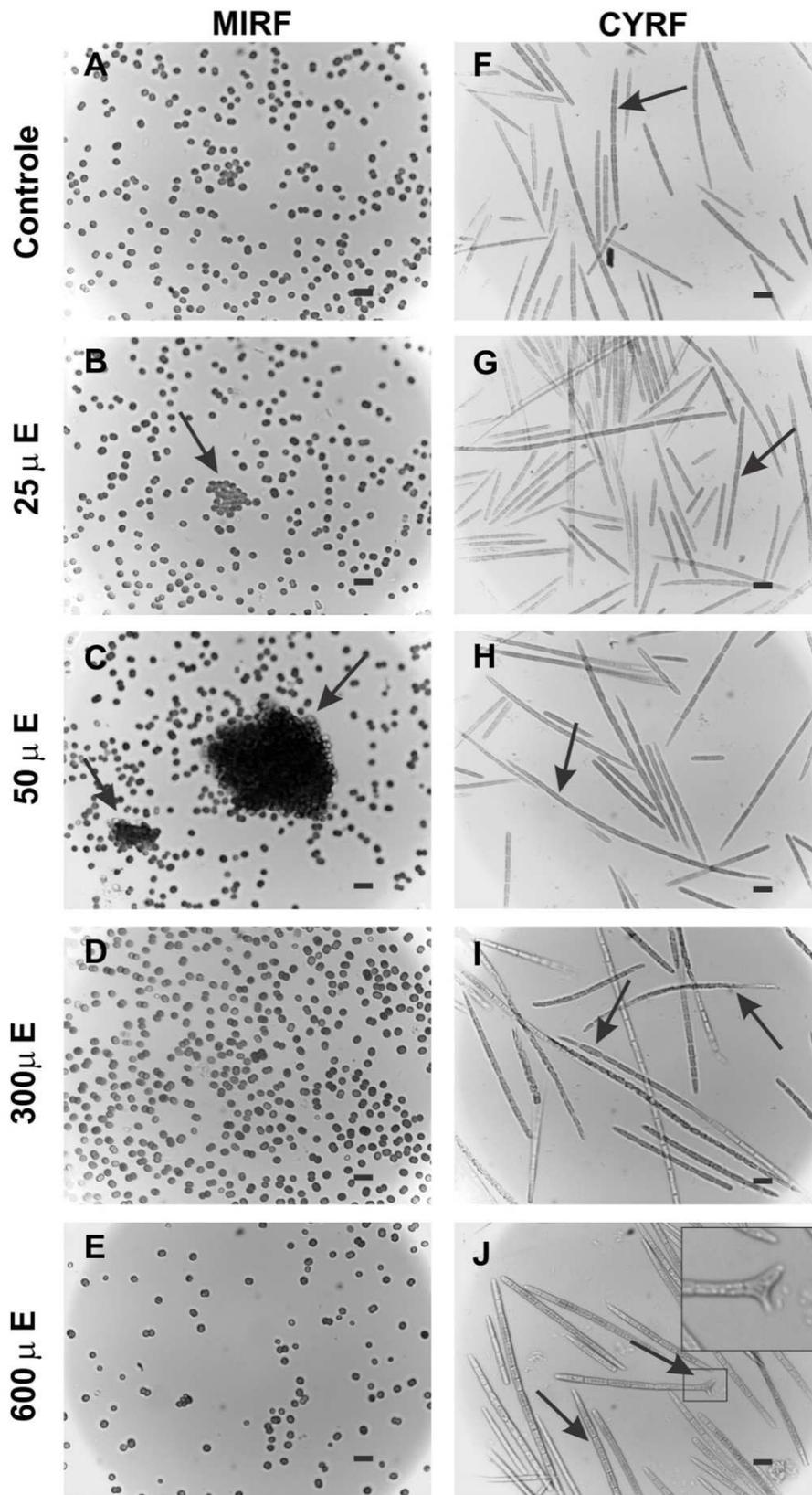


Figura 27. Micrografia da aparência das cepas submetidas a diferentes intensidade luminosas (25, 50, 300 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). C\u00e9lulas de MIRF (A-E), destaque para as agrega\u00e7\u00f5es das c\u00e9lulas (B) e (C). Diferen\u00e7as no tamanho e morfologia dos tricomas de CYRF de (F-J), constri\u00e7\u00e3o dos tricomas (F e G), tricomas com extremidade afinadas (H), acineto tricomas finos (I),) Tricomas bifurcados (J).

Efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosa

Quando em monocultura, MIRF não apresentou variação nas taxas de crescimento com o aumento da intensidade luminosa (50 para 500 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($F = 0,81$; $p = 0,69$). Entretanto, as duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3 e CYRF) apresentaram maiores taxas de crescimentos em baixa intensidade luminosa (50 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (T3, $F = 3,7$; $p = 0,12$) (CYRF, $F = 193,6$; $p = <0,01$) (Fig.28).

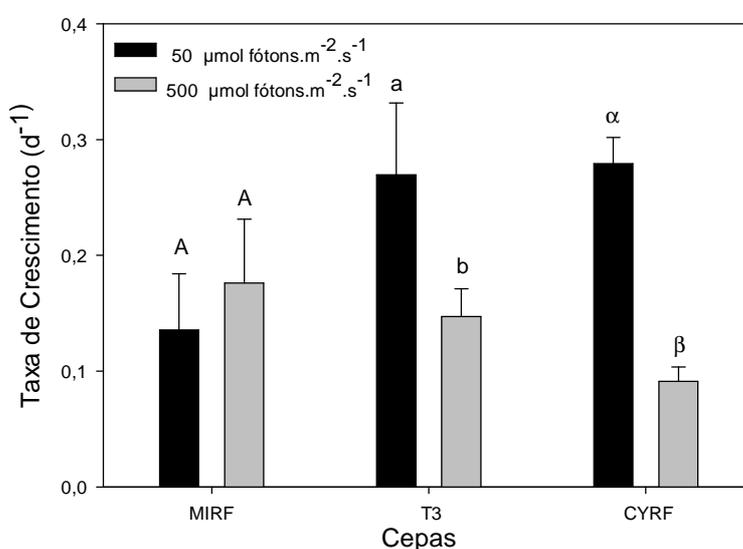


Figura 28. Taxas de crescimento baseadas no volume das monoculturas de MIRF, T3 e CYRF em diferentes intensidade luminosas, ao longo de 10 dias.

Quando em culturas mistas, as cepas MIRF e T3 apresentaram taxas de crescimento semelhantes aos valores encontrados em monoculturas, para ambas as intensidades luminosas estudadas (MIRF, $F = 0,81$; $p = 0,41$ e T3, $F = 3,7$; $p = 0,69$). Entretanto, as culturas mistas com MIRF e CYRF apresentaram resultados antagônicos quando em baixa e alta luz. Em 50 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CYRF apresentou menores taxas de crescimento quando na presença de MIRF do que quando em monoculturas ($0,28 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ e $0,24 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$, respectivamente). Já em 500 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, MIRF parece ter sido favorecido pela presença de CYRF, pois apresentou maiores taxas

de crescimento na presença de CYRF do que em monocultura ($0,31 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ e $0,18 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$, respectivamente). (Fig. 29)

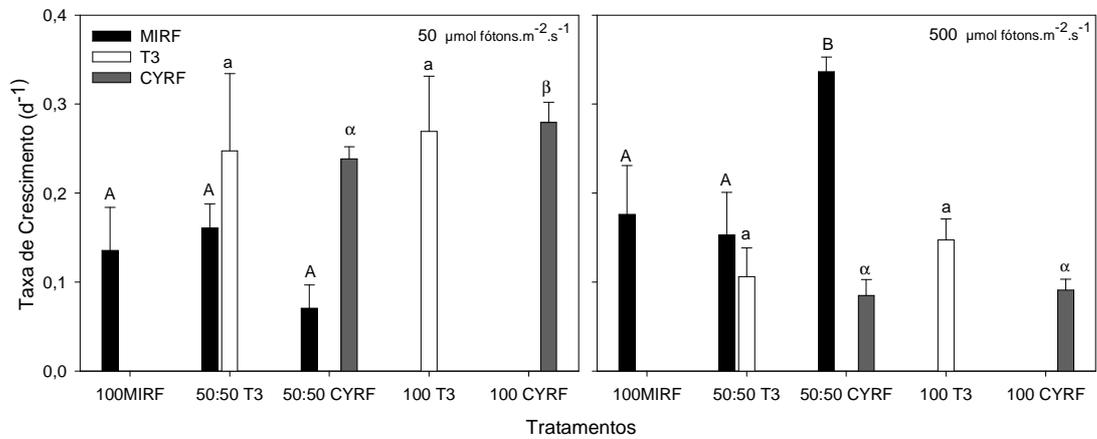


Figura 29. Taxas de crescimentos baseada no volume de MIRF, T3 e CYRF (A) em baixa intensidade luminosa $50 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (B) em alta intensidade luminosa $500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ monoculturas e culturas mistas ao longo de 10 dias

DISCUSSÃO

Relações entre crescimento celular e disponibilidade de luz

O aumento da densidade celular ao longo do tempo nas culturas de *Microcystis aeruginosa* - MIRF e *Cylindrospermopsis raciborskii*- CYRF promoveu uma elevação na turbidez (A750) e uma diminuição na quantidade de luz (PPFD) disponível para as células. As culturas de MIRF e CYRF submetidas menores intensidades luminosas (25 e 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) apresentaram maior diminuição da PPFD e maior aumento da turbidez, comprovando a necessidade de maior concentração de pigmentos para aumentar a eficiência na captação de luz para realização da fotossíntese em baixa luz. A quantidade de luz capaz de penetrar em uma cultura depende da intensidade luminosa a qual as culturas são submetidas e do aumento da densidade celular (SCHAEFER e GOLDEN 1989). Vários experimentos têm sido realizados em diferentes laboratórios com a finalidade de conhecer o comportamento de *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* submetidas a diferentes intensidades luminosas (KOHLE, 1992; SAKER, et al., 1999; SAFIK, et al., 2001; CARNEIRO, 2005; MELGAÇO, 2007; SOARES, 2008; CARNEIRO, 2009; MIRANDA, 2009; BUCH, 2009; RIOS, 2010; MELLO, 2011). Entretanto, conforme aponta GOLDEN (2004), o efeito de diferentes intensidade luminosas (principalmente as altas) na fisiologia, crescimento e morfologia de organismos fotossintetizantes aquáticos é extremamente dependente do aumento da densidade e conseqüente redução da quantidade de luz disponível para células ao longo do tempo. Assim, poucos trabalhos indicam essa diminuição, fato este que pode influenciar em uma diferença de valores acima de 50% (este trabalho) na real quantidade de luz que está sendo utilizada pelas células. O aumento da densidade celular promove o aumento turbidez das culturas e a rápida redução nos valores PPFD.

Como é mostrado neste estudo, a PPFDF inicial de 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sofreu redução para $\approx 380 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tanto em MIRF quanto em CYRF.

As taxas de crescimento de MIRF, foram semelhantes entre os tratamentos ($0,38 \text{ d}^{-1} \pm 0,15$) $F= 58,511$, $p<0,001$, valor semelhante para a taxa de crescimento para a mesma cepa (MIRF), foi encontrado por SOARES (2008), $\approx 0,3 \text{ d}^{-1}$, submetida a um gradiente de luz de 35 a 350 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. CARNEIRO (2005) também encontrou valor semelhante ($0,37 \text{ d}^{-1}$) para outra cepa de *M.aeruginosa* (NPJB-1) expostas a 100 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. MIRANDA (2009) encontrou taxa de crescimento relacionada ao biovolume de $0,18 \text{ d}^{-1}$ quando MIRF foi cultivada a 25 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Resultado semelhante foi encontrado para outra cepa de *M. aeruginosa* NPJB-1, quando submetida à intensidade luminosas menores que 40 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (MOLICA, 1996; CARNEIRO, 2005).

Os tratamentos de CYRF (CYRF-25, CYRF-50, CYRF-300 e CYRF-600) apresentaram taxa de crescimento $0,29 \text{ d}^{-1} \pm 0,19$ $F= 58,511$, $p<0,001$. Diferente dos resultados apresentado neste trabalho, SOARES (2008) observou um aumento da taxa de crescimento (de $0,35$ para $0,5 \text{ d}^{-1}$) para CYRF ao aumentar a intensidade luminosa de 35 para 280 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Porém, observou-se uma diminuição da taxa de crescimento ($0,4 \text{ d}^{-1}$) quando a intensidade luminosa foi aumentada para 350 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. CARNEIRO (2005) também observou um aumento da taxa de crescimento com aumento da intensidade luminosa também para outra cepa de *C. raciborskii* CYP 011K ($0,35 \text{ d}^{-1} \pm 0,06$ a $0,5 \text{ d}^{-1} \pm 0,04$) nas intensidades luminosas 40 a 100 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. BRIAND et al., (2004) relataram taxas de crescimento variando de 0,4 a 0,8 (d^{-1}) em culturas de *C. raciborskii* crescendo sob intensidade luminosas de 50 a 125 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com maiores valores sendo obtidos em culturas mantidas sob as maiores intensidades luminosas. MIRANDA (2009), para a

cepa NPC-1 de *C. raciborskii*, encontrou diferentes taxas de crescimentos para baixa e alta intensidade luminosa (25 e 250 de $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), sendo a menor taxa de crescimento encontrada para alta intensidade luminosa ($0,1 \pm 0,02$). Nos dados apresentados anteriormente sobre a taxa de crescimento de *C. raciborskii* n\u00e3o fica claro o baixo requerimento por luz desta esp\u00e9cie. Neste trabalho, por exemplo, n\u00e3o foi observado diferen\u00e7a na taxa de crescimento de CYRF nas diferentes intensidades luminosa utilizadas, sendo um ind\u00edcio da aclima\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas as intensidades luminosas utilizadas neste estudo.

Na literatura, diversas intensidades luminosas s\u00e3o utilizadas em experimentos a fim de tentar entender o comportamento e a produ\u00e7\u00e3o de compostos das cianobact\u00e9rias sob um gradiente de luz. *M. aeruginosa* foi encontrada formando flora\u00e7\u00e3o na superf\u00edcie de um sistema tropical a 2000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto *C. raciborskii* apresentou elevada biomassa a 4m, onde a intensidade luminosa foi de 400 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SOARES, et al., 2009). Por\u00e9m n\u00e3o h\u00e1 um consenso para a realiza\u00e7\u00e3o de experimentos em laborat\u00f3rios de qual intensidade luminosa \u00e9 considerada alta ou baixa. CARNEIRO et al. (2009) consideraram 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como intensidade luminosa alta e 50 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como intensidade luminosa baixa. Neste mesmo trabalho, CARNEIRO et al. 2009, mostrou maiores concentra\u00e7\u00f5es de saxitoxinas e neosaxitoxinas foram encontradas em c\u00e9lulas de *C. raciborskii* cultivadas a 100 $\mu\text{mol de f\u00f3ton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. BRIAND et al. 2004 consideraram 125 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como intensidade luminosa mais alta e 30 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como intensidade luminosa mais baixa, enquanto MIRANDA (2009) considerou 250 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como intensidade luminosa alta e 25 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, como intensidade luminosa baixa. MELLO (2011) considerou 500 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como intensidade luminosa alta e 25 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, como intensidade luminosa baixa, e sugere

que altas intensidades (250 e 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) parecem promover em CYRF a produção de moléculas sinalizadoras de comunicação celular (*quorum sensing*).

Caracterização dos parâmetros fisiológicos relacionados à assimilação de luz por *M.aeruginosa* e *C.raciborskii*.

As respostas fisiológicas dos organismos fotossintéticos podem ser influenciadas pela alteração no padrão de distribuição da luz a qual estes organismos estão submetidos na natureza ou em laboratório. Para conseguirem conviver com essas alterações diárias e ao longo do tempo, vários desses organismos fotossintetizantes desenvolveram mecanismos de fotoaclimação. Os indivíduos aclimatados a altas intensidades luminosas apresentam baixo conteúdo de clorofila, altos teores de pigmentos acessórios (carotenóides), altas taxas de fotossíntese máxima (P_m), baixa eficiência fotossintética (α) e altos valores de I_k (intensidade luminosa na qual a fotossíntese é saturada por luz). Por outro lado, os indivíduos aclimatados à baixa intensidade luminosa apresentam altas concentrações de clorofila por biomassa, baixo conteúdo em carotenóides, altas taxas de fotossíntese máxima (P_m), altos valores de eficiência fotossintética (α) e baixos valores para I_k , (GROBBELAAR e KURANO, 2003; SILVA, 2008). A dominância de cianobactérias em ambientes aquáticos pode se explicada devido as vantagens ecológicas e fisiológicas deste grupo sobre outras algas (OLIVER e GANF, 2000).

Neste estudo, alteração na quantidade de pigmentos foi observado para as duas espécies. Nos tratamentos com MIRF diferença significativa em relação aos carotenóides totais, e para os tratamentos com CYRF foi observado uma diminuição na quantidade de clorofila-a e um aumento dos carotenóides totais com o aumento da intensidade luminosa (25, 50, 300 e 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Quanto maior a intensidade luminosa, menor a quantidade de pigmentos necessários para fazer a

captação de luz e maior à quantidade de pigmentos que podem atuar na fotoproteção, carotenóides totais. Durante a realização deste experimento, observou-se um aumento dos pigmentos totais de t_6 para t_{12} , tanto para MIRF quanto para CYRF. Este fato pode estar relacionado à diminuição da PPDF nas culturas como foi verificado anteriormente, causado pelo auto-sombreamento. Quando um fotoautotrófico é exposto à baixas intensidades luminosas, é observada uma maior concentração de clorofila-a, que atua na captação de luz para a realização da fotossíntese. Já quando são expostos à altas intensidade luminosas, há uma diminuição na concentração dos pigmentos que atuam na coleta de luz e um aumento nas concentrações de carotenóides que podem atuar na fotoproteção (FAIKOWSKI e RAVEN, 2007). Sugere-se que a relação carotenóide/clorofila-a para CYRF explica a alteração na coloração para os tratamentos com alta intensidade luminosa (CYRF-30 e CYRF-600) de “verde” para “verde-amareladas”. WU et al., (2009) verificaram um aumento na relação carotenóide/clorofila-a para *C. raciborskii* em relação as culturas de *M. aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*, mas a concentração de clorofila-a foi menor em *C. raciborskii* do que nas outras espécies depois de 4 dias de cultivo.

As curvas rápidas de luz (CRLs) de MIRF não apresentaram uma diminuição da taxa de transferência de elétrons (ETR), demonstrado pelo declínio da curva na região saturada por luz e indicando a ocorrência da presença de mecanismos dissipativos de energia “down regulation”, como sugerido por RALPH e GADEMANN (2005). Isto pode ter ocorrido devido a maior intensidade luminosa utilizada para a obtenção das CRLs de MIRF ter sido de $1200 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nossos dados estão de acordo com WU et al (2009), que demonstraram que a região de reparação do fotossistema para *Microcystis* foi encontrada em intensidade luminosa acima de $1200 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Diferentemente as CRLs de CYRF apresentaram uma região de “down regulation”

em intensidade luminosas acima de 1200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os resultados das CRL indicaram que as cepas estão aclimatadas as intensidades luminosas utilizadas neste trabalho. As CRLs demonstram o comportamento dos fotossintetizantes em uma mudança rápida na incidência luminosa, por exemplo, se uma nuvem entra na frente do sol momentaneamente RALPH e GADEMANN (2005). Os parâmetros fisiológicos observados neste estudo indicam que ambas as cepas estiveram aclimatadas às intensidades luminosas utilizadas e variação na intensidade luminosa não geraram respostas fisiológicas diferentes.

Efeito da luz na morfologia

Em condições naturais o sinergismo de vários fatores dificulta a afirmação de quais fatores interferem no desenvolvimento de uma determinada população. Entretanto experimentos em laboratório permitem selecionar e controlar as variáveis que atuam sobre o desenvolvimento de uma população e deste modo, inferir nos parâmetros que afetam o desenvolvimento populacional do organismo analisado. *M. aeruginosa* é encontrada na natureza na forma de colônias envolvida por mucilagem, porém quando cultivada em laboratório mantêm-se em células soltas. Neste estudo MIRF apresentou aumento do diâmetro celular quando cultivada em intensidade luminosa mais alta (MIRF-600). Além disso, agregações celulares como o início de formação de colônias foi observado e MIRF-50. Formação de colônias em culturas de *M. aeruginosa* foi relacionada a sinais químicos liberados por predadores (YANG, et al., 2009; BECKER, 2010), e por competição interespecífica com *C. raciborskii* (MELLO 2011). Deste modo, mecanismos de comunicação celular para induzir a formação de colônias parecem ser dependentes de moléculas sinalizadoras produzidas em situações de estresse. Como *M. aeruginosa* é uma espécie que parece possuir um alto requerimento

por luz, sugerimos que as agregações observadas nos tratamentos de baixa intensidade luminosa (MIRF-25, MIRF-50), tenham sido desencadeadas por alguma molécula produzida por esta espécie em situação de estresse.

C. raciborskii é uma cianobactéria filamentosa que possui uma ampla plasticidade fenotípica, como já foi observado por diversos autores (BOUVY, 1999; KOMARKOVA, et al., 1999; SHAFIK, et al., 2003; FERREIRA, 2007; BUCH, 2009), tanto em condições controladas de cultivo quanto na natureza. A razão para as alterações na morfologia desta espécie parece estar relacionada tanto a fatores bióticos quanto abióticos. No presente estudo, houve um aumento no comprimento dos tricomas conforme o aumento da intensidade luminosa. Apesar das variações observadas, a largura média das células dos tricomas de CYRF em todos os tratamentos esteve de acordo com o intervalo proposto na descrição original da espécie (2,5-4,0 μm) (KOMÁREK, 2003). Em baixas intensidades luminosas (CYRF-controle, CYRF-25 e CYRF50), a largura das células foi de 2,5 μm . E em alta intensidade luminosas (CYRF-300 e CYRF600) foi de 4,0 μm . As alterações morfológicas nos tricomas de *C. raciborskii* também já foram descritas por diversos autores. SHAFIK, et al.; (2003) e FERREIRA (2007) relataram que em baixas concentrações de nutrientes, os tricomas começam a apresentar anomalias morfológicas para continuar utilizando de forma eficiente os nutrientes disponíveis. KOMÁRKOVÁ et al., (1999) também constataram que tricomas de *C. raciborskii* apresentaram anomalias em baixas concentrações de nutrientes, e voltaram a apresentar morfologia normal (células cilíndricas, tricomas curtos e retos, sem constrição, heterócitos em ambas as extremidades e presença de acinetos) após serem inoculados em meio de cultivo com concentrações ótimas de nutrientes. SOARES (2008) verificou alteração na morfologia dos tricomas de *C. raciborskii* (CYRF) em um gradiente de temperatura (12 a 32 °C). Neste estudo,

observamos alterações na morfologia dos tricomas de CYRF, nos tratamentos com altas intensidades luminosas (CYRF-300, CYRF-600), extremidade afilada, presença de acineto, tricomas contorcidos e bifurcados foram observados no tratamento CYRF-600. Tricomas bifurcados também foram observados por BUCH (2009) quando testada a variação de temperatura e intensidade luminosa. Sendo assim, as alterações morfológicas observadas em MIRF e CYRF, neste estudo pode estar relacionadas com estratégias populacionais destas espécies a variações das intensidades luminosas do ambiente natural.

Efeito da interação entre as duas espécies em diferentes intensidades luminosa

M. aeruginosa e *C. raciborskii* são comumente encontradas ocorrendo em populações naturais (BORGES, 2008; CROSSETTI e BICUDO, 2008; FIGUEREDO e GIANI, 2009; SOARES et al., 2009). Neste trabalho foi comparado o efeito de duas intensidades luminosas (50 e 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na interação entre uma cepa de *M. aeruginosa* (MIRF) e duas cepas de *C. raciborskii* (CYRF e T3). Quando em monocultura MIRF não apresentou diferença entre as taxas de crescimentos em 50 e 500 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Contudo, as duas cepas de *C. raciborskii* (CYRF e T3) cresceram melhor em 50 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estes resultados corroboram com a hipótese de *C. raciborskii* ser uma espécie com baixo requerimento por luz (PADISÁK, 1997; BOUVY et al., 2000; SOARES et al., 2009).

Quando em culturas mistas (MIRF e T3, MIRF e CYRF), MIRF apresentou taxa de crescimento semelhante à monocultura quando na presença das T3 e CYRF a 50 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O mesmo foi observado para T3. Entretanto CYRF apresentou taxa de crescimento menor quando na presença de MIRF. Em 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, T3 e CYRF apresentaram taxas de crescimento semelhantes às monoculturas, quando na

presença de MIRF. Porém, MIRF na presença de CYRF apresentou maiores taxas de crescimento quando comparada à monocultura. Nossos resultados sugerem que cepas co-existentes isoladas de um mesmo ambiente, como MIRF e CYRF que foram isoladas do reservatório do Funil-RJ em 2005, apresentaram resultados de interações diferentes de cepas provenientes de diferentes locais. MELLO (2011) apontou a existência de interações químicas como a produção de compostos alelopáticos, comunicação celular (*quorum sensing*) entre as cepas MIRF e CYRF, indicando um possível efeito de co-evolução entre essas cepas. Tais interações foram muito mais evidentes entre MIRF e CYRF do que destas com outras cepas. Além disso, tais interações parecem ser estimuladas por situações de estresse como competição e variações nas intensidades luminosas.

FIGUEREDO et al., (2007) e MELLO (2011), encontraram redução do crescimento de *M. aeruginosa* exposta a produtos celulares de *C. raciborskii*, e esta por sua vez apresentou vantagem competitiva para culturas mantidas a intensidade luminosa de $110 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Neste trabalho em baixa intensidade luminosa ($50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) CYRF apresentou menor taxa de crescimento em interação com MIRF, e em alta intensidade luminosa ($500 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) MIRF parece se beneficiar de algum composto liberado por CYRF, diferente dos resultados apresentados por FIGUEREDO et al., (2007) e MELLO (2011). Essa diferença pode ter sido devido as intensidades luminosas utilizadas manutenção das culturas durante o experimento 50 e $500 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ou devido as interações ser entre células vivas, que podem secretar de forma contínua e direta bioativos extracelulares. Já existe evidência que os produtos extracelulares de *C.raciborskii* inibem o desenvolvimento e a atividade fotossintética de *M.aeruginosa* (FIGUEREDO, 2007). Além disso, é importante ressaltar que o efeito de compostos alelopáticos também é dependente da dose da

substância alvo-produzida e do estresse ao qual a espécie alvo foi submetida (GROSS, 2003). Por isso torna-se fundamental conhecer e entender a forma a como a interação entre as espécies e entre as cepas (linhagens) modificam a síntese de toxinas e de compostos relacionados, assim como, a reação destas espécies a mecanismos de estresse. Devido ao sinergismo de vários fatores em populações naturais, experimentos em laboratórios são fundamentais para estes estudos. O conhecimento da ecofisiologia destas espécies de cianobactérias é uma poderosa ferramenta investigativa para os diagnósticos e prevenções de florações tóxicas,

CONCLUSÕES

Os parâmetros ecofisiológicos analisados neste trabalho não confirmaram a hipótese de *M.aeruginosa* ser uma espécie com alto requerimento por luz e *C. raciborskii* uma espécie com baixo requerimento por luz, quando cultivadas em diferentes intensidades luminosas. Esta resposta pode estar relacionada com a aclimação das células às intensidades luminosas utilizadas.

As agregações celulares em *M.aeruginosa* cultivada em baixa irradiância podem estar relacionadas a uma estratégia populacional, para aumentar a superfície para uma melhor captação de luz para realização da fotossíntese.

A interação entre *M.aeruginosa* e *C. raciborskii* quando em cultivo misto em diferentes intensidades luminosas apresetaram foi evidente para cepas isoladas de um mesmo ambiente (MIRF e CYRF).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIR, N., ZER, H., SCHOCHAT, S. & OHAD, I. 2003 Photoinhibition – a historical perspective. **Photosynth. Res.** 76: 343-370.

ARAÚJO, S. A. C. E DEMINICIS, B. B. 2009. Fotoinibição da Fotossíntese **Revista Brasileira de Biociências.** v. 7, n. 4, p. 463-472.

AZEVEDO, S. M. F. O., CARMICHAEL, W.W , JOCKIMSEN, E. M., RINEHART, K. L. 2002 Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446.

BABAR, M. A. et al. The potential of using spectral reflectance indices to estimate yield in wheat grown under reduced irrigation. **Euphytica**, v. 150, n. 1-2, pp. 155-172, 2006.

BECKER, S. Biotic factors in induced defence revisited: cell aggregate formation in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is triggered by spent *Daphnia medium* and disrupted cells. **Hydrobiologia**, v. 644, n. 1, pp. 159-168, 2010.

BEER, S., BJO" RK, M., GADEMANN, R., RALPH, P.J., 2001. Measurement of photosynthesis in seagrasses. In: Short, F.T., Coles, R. (Eds.), *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Publishers, The Netherlands, pp. 183–198.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. & MOLICA, R. 2003. Cianobctéria invasora: Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil. *Revista biotecnologica ciência e desenvolvimento* 30:82-90

BORGES, P.A.F., TRAIN, S. & RODRIGUES L. C. Spatial and temporal variation of phytoplankton in two subtropical Brazilian reservoirs. **Hydrobiologia** v. 607, n 1, pp. 63-74, 2008.

BOUVY, M., FALCAO, D., MARINHO, M., PAGANO, M., MOURA, A., 2000, "Occurrence of *Cylindropermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought". **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 1, pp. 13-27.

BUCH , B. **Ecofisiologia de Morfotipos ret e expiralado de de *Cylindropermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA) em condições controladas.** 2009. 53. f. (Mestrado

em Ciências Biológicas - Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro

BRIAND, J. F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F. 2004 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance or global warming? **Journal of Phycology**, v. 40, p. 231-38.

CARMICHAEL, W. W., AZEVEDO, S. M. F. O., AN, J. S., MOLICA, R. J. R., JOCHIMSEN, E. M., LAU, S., RINEHART, K. L., SHAW, G. R., EAGLESHAM, G. K., 2001, "Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins". **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, pp. 663-668.

CARNEIRO, R. L. **Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin (Cianobacteria) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cianobacteria) para produção de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina.** 2005. 113 f. (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

CARNEIRO, R. L., SANTOS, M. E.V., PACHECO, A. B. F., & AZEVEDO, S. M. F. O. 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton research* 31(5)481-488.

CHORUS I.; & BARTRAM J. **Toxic Cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management.** London: Taylor & Francis, 1999. 416 p.

CROSSETTI, LUCIANE O.; & BICUDO, C. E. M. 2008. Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. **Hydrobiologia** (The Hague), v. 614, p. 91-105.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** 2ª edição, Rio de Janeiro, Interciência, 1998, 602 p.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** 3ª edição, Rio de Janeiro, Interciência, 2011, 826 p.

FALKOWSKI, P. G. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical. **Photosynthesis Research** v. 39, n. pp. 235-258, 1994.

FALKOWSKI, P.G. & RAVEN, J.A. **Aquatic Photosynthesis**. 2rd ed., Princeton University Press, United Kingdom. 2007, 484p.

FABBRO, L. D& DUIVENVOORDEN, L. J. Profile of a bloom of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical central Queensland. **Marine and Freshwater Research**, v. 47, p. 685- 694, 1996.

FERREIRA, R. M.. **Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética, na morfologia e no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii*** 2007. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007.

FIGUEREDO, C. C., GIANI, & A., BIRD, D. F. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, pp. 256-265, 2007.

FIGUEREDO, C. C., & GIANI, A. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* **Limnologia** v.39p.p 264–272, 2009.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. 1989 The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, p. 87–92.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T., KIM, W. K., 1964, "Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. INTERNATIONAL 54 ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY, PROCEEDINGS, v. 15, n. pp. 796-804

SUSAN S. GOLDEN 2004 Light-Responsive Gene Expression and the Biochemistry of the Photosystem II Reaction Center. **The Molecular Biology of Cyanobacteria**, pp. Kluwer Academic Publishers. Printed in The Netherlands 1994, 693–714.

GROBBELAAR, J.U. & KURANO, N., 2003. Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *J. Appl. Phycol.* 15:121-126..

GROSSMAN, A. R. 2003. A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. **Photosynthesis Research**. n. 1-3. 76: 207-215.

CROSSETTI, L. O.; & BICUDO, C.M. Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. **Hydrobiologia** (The Hague), v. 614, p. 91-105, 2008.

HAWES, I., SUTHERLAND, D., HANELT, D., 2003. The use of pulse amplitude modulated fluorometry to determine finescale temporal and spatial variation of in situ photosynthetic activity within an Isoetes-dominated canopy. *Aquat. Bot.* 77 (1), 115.

HILLEBRAND H.; DURSELEN, C. D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T., 1999. "Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae". *Journal of Phycology*, v. 35, pp. 408-424

HOEK, C. V. D., MANN, D. G. A., H.M. J. **Algae**. Syndicate of the University of Cambridge, 1995, 621p.

HÖGER, S. J. 2003. Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health. Dissertation of Doctorate, Universität Konstanz.

HUSZAR, V. L. M.; & SILVA, L. H. S. 1999. Cinco décadas de estudos sobre a ecologia do fitoplâncton no Brasil. Rio de Janeiro, SBL. **Limnotemas**, v. 2, p. 1-22.

JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., AN, J.S, CARDO, D.M, COOKSON, S.T., HOLMES, C.E.M., ANTUNES, M.B.C., MELO-FILHO, D. A, LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T, AZEVEDO, S.M.F.O & JARVIS, W.R. 1998. Liver failure and death following exposure to microcystins toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.* 338: 873-888.

JUNEAU, P., DEWEZ, D., MATSUI, S., KIM, S. G. & POPOVIC, R. 2001 Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. **Chemosphere**, v. 45: 589-598, 2001.

KIRK, J. T. O. **Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems**. 2^oed. Cambridge university press, New York. 1994, 509 p.

KOHLER, J. 1992 Influence of turbulent mixing on growth and primary production of *Microcystis aeruginosa* in the hypereutrophic Buätzen Reservoir. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 123, p. 413-429.

KOMÁRKOVÁ, J., LAUDARES-SILVA, R. & 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* 94:207-222.

KOMÁREK, J., KOMARKOVA-LEGNEROVA, J., SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. D., SENNA, P. A. C., 2002, "Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp nov." *Cryptogamie Algologie*, v. 23, n. 2, pp. 159-177.

KOMÁREK, J. & KOMÁRKOVÁ, J. 2003. Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales); review 2002. *Czech Phycology*, 3: 1-30.

KUWATA, A. & MIYAZAKI, T. 2000 Effects of ammonium supply rates on competition between *Microcystis novacekii* (Cyanobacteria) and *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta): simulation study. *Ecological Modelling*, v. 135, n. 1, pp. 81-87.

LEECH, D. M. & S. JOHNSEN, 2009. Light, biological receptors. In Likens, G. E. (ed.), **Encyclopedia of Inland Waters**, Vol. 2. Elsevier, Oxford: 671–681.

LITCHMAN, E. 1998. "Population and community responses of phytoplankton to fluctuating" light. *Oecologia*, v. 117, p. 247-257,

MAC KINNEY, Y. G. G. 1941. Absorption of light of chlorophyll solutions". *Journal of Biological Chemistry*, v. 140, n. pp. 315-322.

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). *Archiv für Hydrobiologie*, v. 153, p. 443-468.

MELGAÇO, M. J. **Efeitos da disponibilidade de luz e limitação de nutrientes sobre a competição entre cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa***. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007.

MELLO, M. M. **Alelopatia como alternativa para vantagem competitiva na formação de florações de cianobactérias no Reservatório do Funil (Rj)**. 2009. 39 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

MELLO, M. M. **O papel das interações químicas na ocorrência e dominância de cianobactérias formadoras de florações.** 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011.

MIRANDA, M. A. C. N. **Efeito de diferentes intensidades luminosas no crescimento de duas cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* (Kützing) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju.**2009. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

MOLICA R.J.R. **Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz. EMEND. Elenkin (Cyanophyceae).** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

MÜLLER, M. C., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., LOURENÇO, S. O. 2003 Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação de nutrientes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 39, n. 4, out./dez.

O'BRIEN K. R., M. A. BURFORD AND J. D. BROOKES; 2009. "Effects of light history on primary productivity in aphytoplankton community dominated by the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*" **Freshwater Biology** v 54, 272–282.

ODUM, E. P. e BARRETT, G. W. **Ecologia** Editora Guanabara-Koogan. São Paulo: 623p. 2007.

OLIVER, R. L. AND GANF, G. G. Freshwater Blooms. In: B. A., WHITTON; M. POTTS (eds.). **The ecology of Cyanobacteria.** The diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer, 2000. pp. 149-194.

PADISÁK, J. 1997 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, na expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 107, p. 563-593.

PAERL, H. W., FULTON, R. S., MOISANDER, P. H., DYBLE, J., 2001, "Harmful freshwater algal blooms, with emphasis on cyanobacteria". **Scientific World Journal**, v. 4, n. 1, pp. 76-113.

PORRA, R.J., THOMPSON, W.A. AND KRIEDEMANA, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta.** 975: 384-394.

RALPH, P. J. AND. GADEMANN., R. 2005. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity". **Aquatic Botany**, v. 82, n. 3, pp. 222-237.

RAGNI, M., AIRS, R.L., LEONARDOS, N. & GEIDER, R.J. 2008. Photoinhibition of PSII in *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) under high light stress: the roles of photoacclimation, photoprotection, and photorepair. **J. Phycol.** 44: 670-683.

RAPS, S., WIMAN, K., SIEGELMAN, H. W. & FALKOWSKI, P.G. 1983. Adaptation of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. **Plant Physiology**, v. 72, p. 829-832.

RAVEN, H.P, EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal** 6ª edição, Rio de Janeiro – RJ. Editora Guanabara. 2001. 906p.

REYNOLDS, C. S. 1994 "The role of fluid motion in the dynamics of phytoplankton in lakes and rivers". In: GILLER, P. S; HILDREW, A. G. RAFFAELLI, D. G. (eds.) **Aquatic ecology: scale, pattern and process**. Oxford: Blackwell. pp 141-188.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Phytoplankton: Ecology, Biodiversity and Conservation**. Cambridge : Cambridge University Press,. 2006 535 p.

RIOS, FERNANDA, J. **Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777 – *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanobacteria)**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente São Paulo, 2010.

SANT'ANNA, C.L. & AZEVEDO, M.T.P. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia** 71:359-385.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M. T. P., WERNER, V. R., DOGO., C. R., RIOS, F. R. ; CARVALHO, L. R. 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies** 126: 249-263.

SANTOS, P.V.. **Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implantação no crescimento de culturas e na reprodução de microcistinas.**2009. 94 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos Universidade Federal de . São Carlos. 2009

SAKER, M. L.; NEILAN, B.; GRIFFITHS, D. J. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm, Island, Queensland. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 599-606.

SHAFIK H.M., HERODEK S., PRÉSING M., VÖRÖS L 2001 Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju. **Algological Studies**, v. 140, p. 75-93.

SCHAEFER M R E GOLDEN SS 1989 Light availability influencethe ratio of two forms of D1 in cyanobacterial thylakoids. **J Biol Chem** 264: 7412–7417.

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.

SIPAUBA-TAVARES, L. H. & ROCHA, O., **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de Organismos Aquáticos.**São Carlos 2003. 74p. Rima/FAPESP.São Paulo.

SOARES, M. C 2008. **Cianobactérias tóxicas no reservatório do funil:uma batalha pelágica.**2008. 154 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) Programa de Pós Graduação em ciências biológicas (botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOARES, M. C. S. 2009 Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, pp. 137-149,.

SILVA, A. F. DA 2008. **Respostas fisiológicas e fotossintéticas da microalga marinha *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) a variações de luz e fontes de carbono.** Tese (Doutorado Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** 3ª edição, Porto Alegre –RS. Artmed 2004, 722p.

TUCCI, A., & SANT'ANNA, C. L. 2003 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil". **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. pp. 97-112.

TUNDISI, J. G. **Água no Século XXI: Enfrentando a Escassez**, São Carlos: RiMa, Instituto Internacional de Ecologia. 2003.

TUNDISI, J.G. & MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. São Carlos Oficina de textos. 2008, 632p.

VISSER, P.M., IBELINGS, B.W., MUR, L.R. & WALSBY, A. E. 2005. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. In: J. Huisman, H.C.P. Matthijs and P.M. Visser (eds.), **Harmful Cyanobacteria**, 109-142.

WALSBY, A.E. Gas vesicles. **Microbiological Reviews** 144 (58): 1994 .94-144.

WELLBURN, A. R., PAUL, N. D., MEHLHORN, H., 1994. The Relative Implications of Ozone Formation Both in the Stratosphere and the Troposphere". **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B-Biological Sciences**, v. 102, n. pp. 33-47.

WIEDNER, C., VISSER, P.M., FASTNER, J., MTCALF, J.S., CODD, G.A. & MUR, L.C. Effect of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC7806. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 1475-1481. 2003.

WIEDNER, C.; RÜCKER, J.; BRÜGGEMANN, R.; NIXDORF, B. 2007 Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. **Oecologia**; v152, n. 3, p. 473-484.

WU, Z., SONG, L., LI, L. S. Different tolerances and responses to low temperature and darkness between waterbloom forming cyanobacterium *Microcystis* and a green alga *Scenedesmus*. **Hydrobiologia**, v. 596, n. pp. 47-55. 2008.

WU, Z. X., SHI, J. Q., LI, R. H 2009 Comparative studies on photosynthesis and phosphate metabolism of *Cylindrospermopsis raciborskii* with *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos-aquae*. **Harmful Algae**, v. 8, n. 6, pp. 910-915.

YANG, Z., KONG, F., ZHANG, M., YANG, Z., YU, Y., QIAN, S., 2009, "Effect of Filtered Cultures of Flagellate *Ochromonas* sp. on Colony Formation in *Microcystis aeruginosa*". *Internat. Rev. Hydrobiol.*, v. 94, n. 2, pp. 143-152.

ZOHARY, T., ROBERTS., E. R. D. 1990. Hyperscums and the population dynamics of *Microcystis aeruginosa*. **J. Plankton Res**, v. 12, n. pp. 443.

ZOHARY T., PADISÁK J., NASELLI-FLORES L., 2010 Phytoplankton in the physical environment: beyond nutrients, at the end, there is some light. **Hydrobiologia** v. 639 p. 261–269.

