

TATIANE VILELA FREITAS LEAL

**EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA, FONTES DE
NITROGÊNIO E NÍVEIS DE FERRO NO CRESCIMENTO DE
Cylindrospermopsis raciborskii (UFV-P01) (NOSTOCALES,
CYANOBACTERIA)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L435e
2006

Leal, Tatiane Vilela Freitas, 1978-

Efeitos da intensidade luminosa, fontes de nitrogênio e níveis de ferro no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* (UFV – P01) (Nostocales, Cyanobacteria) / Tatiane Vilela Freitas Leal. – Viçosa : UFV, 2006. xiv, 44f. : il. ; 29cm.

Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-44.

1. *Cylindrospermopsis raciborskii* - Crescimento.
 2. *Cylindrospermopsis raciborskii* - Efeito da luz.
 3. *Cylindrospermopsis raciborskii* - Efeito do ferro.
 4. *Cylindrospermopsis raciborskii* - Efeito do nitrogênio.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

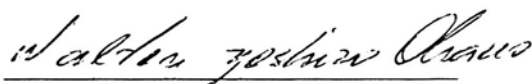
CDD 22.ed. 579.3913

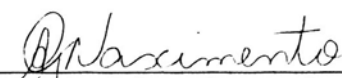
TATIANE VILELA FREITAS LEAL

EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA, FONTES DE
NITROGÊNIO E NÍVEIS DE FERRO NO CRESCIMENTO DE
Cylindrospermopsis raciborskii (UFV-P01) (NOSTOCALES,
CYANOBACTERIA)

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Magister Scientiae

APROVADA: 10 de março de 2006


Prof. Walter Yoshizo Okano


Prof. Antônio Galvão do Nascimento


Prof. José Cambraia


Prof. Ann Honor Mounteer


Prof. Rosane Maria de Aguiar Euclides
(Orientadora)

*Dedico este trabalho ao meu querido esposo Alex,
que não mediu esforços ao me apoiar neste sonho,
ao meu filho Victor pelo amor incondicional, e
aos meus pais pelo carinho e dedicação.*

*“É preferível arriscar coisas grandiosas,
alcançar triunfo e glória mesmo expondo-se à derrota
do que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito,
nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta dos que
não conhecem vitória nem derrota.”*

T. Roosevelt.

AGRADECIMENTOS

Neste momento de alegria, não poderia jamais esquecer de agradecer a todos aqueles que de diferentes formas me auxiliaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Agradeço, primeiramente a Deus, por me mostrar que nesta vida as coisas não acontecem por acaso. Ele sempre tem um plano traçado para nós. Pois, mesmo tudo parecendo tão difícil, até mesmo impossível, Ele com sua grandeza e misericórdia de Pai, nos conduz ao caminho certo, mostrando-nos que tudo é possível àquele que crê e confia.

Agradecimentos à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de concretizar um ideal, e também à CAPES pela concessão da bolsa de estudo e pelo incentivo a pesquisa no país.

Agradeço de coração a professora Rosane Aguiar, não somente pela orientação, mas também pela confiança em mim depositada, pelo carinho e compreensão recebidos, e por muitas vezes me acalmar quando precisei.

Aos professores Walter Okano e Marco Oliva Cano por serem meus conselheiros.

Ao professor Paulo de Marco Júnior, também meu conselheiro, por ser tão prestativo, assim como seus orientados, em especial o doutorando Francisco.

Ao prof. Antônio Galvão do Nascimento do Departamento de Microbiologia por sua atenção e apoio.

Agradecimentos aos professores da banca examinadora pelas avaliações e sugestões que aprimoraram este trabalho.

Agradeço, ainda, a Érika, Jacob e Letícia pela amizade e companhia. Aos amigos da UCP, Rogério, por sua presteza, Kacilda pela ajuda e amizade, Alan pela atenção, e ao Rogerinho e Eduardo pela convivência agradável no laboratório.

As minhas colegas, Camila pela receptividade e apoio prestado quando cheguei à UFV; a Adriana por sua alegria, consolo e apoio em todos os momentos que precisei. Te adoro amiga e também toda a sua família. Não

esquecerei os momentos agradáveis em que passamos em sua casa...; a Fernanda pela amizade, e a Eliane pelo carinho.

Agradeço ao Ivan, meu fiel estagiário, que mesmo sem bolsa, muito me auxiliou no desenvolvimento do trabalho.

A todos do laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial ao doutorando Roberto, por sua atenção e boa vontade em auxiliar as análises realizadas neste laboratório.

Ao Laboratório de Anatomia por disponibilizar o fotomicroscópio.

Ao Departamento de Solos, em especial ao Brás, ao Departamento de Agronomia em particular o Ronaldo e o Simão, ao laboratório de Tratamento de Água, do Departamento de Engenharia Civil através do Luiz Eduardo, pelas análises físico-químicas realizadas do tanque da piscicultura.

A Companhia de Saneamento de Minas Gerais – COPASA, em particular aos amigos Mônica e Paulo por me permitirem utilizar o laboratório de Hidrobiologia para realização das contagens de células.

Neste momento, também não poderia deixar de agradecer a todos os meus amigos e familiares, tanto por parte de mãe, de pai e do meu esposo, pelo carinho e torcida oferecidos. Em especial ao meu Tio Dica e toda sua família (Tia Lú, Júnior, Wagner, Jacqueline e ao Pedro) que com certeza foram peças importantes nesta etapa da minha vida. Também, a minha sogra pelo apoio e carinho, e a minha tia Zenilda pelas orações e palavras de conforto oferecidas.

Agradeço imensamente ao meu esposo Alex, pela cumplicidade, renúncia, apoio, dedicação e, principalmente pelo seu AMOR demonstrado, neste momento tão importante para mim. Deixo aqui registrado que você foi a peça fundamental para a realização deste sonho. TE AMO.

Ao meu filho Victor Alex, que mesmo sem saber, veio no momento certo, e muito me ajudou a enfrentar as dificuldades, me transmitindo alegria, confiança e amor.

À vocês meus pais, a minha eterna gratidão, nem preciso dizer o quanto vocês significam para mim, vocês, junto com o meu esposo e meu filho são a razão pelo qual consegui chegar até aqui. Amo muito vocês.

Enfim, a todos o meu eterno OBRIGADA !!!

BIOGRAFIA

Tatiane Vilela Freitas Leal, filha de Joaquim de Freitas Santos e Zilda Vilela Santos, casada com Alex Leal da Silva e mãe de Victor Alex Vilela Freitas Leal. Nasceu em Montes Claros, Minas Gerais, em 23 de Março de 1978. Concluiu sua graduação em Ciências Biológicas Licenciatura, em 2001, pela UNIMONTES, onde durante o ano de 2002 a 2004 participou do programa de Pós-Graduação latu sensu na área de “Saneamento e Meio Ambiente”. Em 2004, em busca da realização de um ideal, iniciou o Mestrado em Botânica, área de concentração “Ecologia e Sistemática”, na Universidade Federal de Viçosa/MG, concluído em março de 2006.

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. METODOLOGIA.....	5
2.1 Local de coleta.....	5
2.2 Enriquecimento e isolamento de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01).....	6
2.3 Manutenção das culturas estoques.....	7
2.4 Curva de crescimento	7
2.5 Efeitos da intensidade luminosa, fontes de N e níveis de Fe sobre o crescimento de <i>C. raciborskii</i> (UVF-P01)	7
2.5.1 Determinação de Clorofila a (Chl a) e Carotenóides Totais (CaT)	10
2.5.2 Análise de Proteína Total	10
2.5.3 Contagem de filamentos.....	10
2.5.4 Taxas específicas de crescimento	11
2.6 Registro fotográfico e caracterização morfológica.....	11
2.7 Delineamento experimental.....	11
2.8 Análise estatística	11
3. RESULTADOS	12
3.1 Curva de crescimento	12
3.2 Efeitos da luz, fontes de N e níveis de Fe sobre o crescimento de <i>C.</i> <i>raciborskii</i> (UVF-P01).....	13
3.2.1 Produção de Clorofila a (Chl a)	13
3.2.2 Concentração de proteína total	15
3.2.3 Contagem de filamentos.....	17
3.2.4 Produção de Carotenóides Totais (CaT).....	19
3.2.5 Relação Chl a : CaT	21

3.2.6 Curvas e taxas específicas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	23
3.3 Características morfológicas de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01).....	25
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

Símbolos ou Abreviatura	Definição	Unidade
Chl a	Clorofila a	$\mu\text{g mL}^{-1}$
CaT	Carotenóides Totais	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Luz baixa	Intensidade Luminosa de 26	$\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Luz alta	Intensidade Luminosa de 128	$\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crescimento de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	13
Figura 2a: Efeito de fontes de N, níveis de Fe e tempo sobre a produção de Chl a em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01).....	14
Figura 2b: Efeito da Luz, em função do tempo, sobre a produção de Chl a em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	15
Figura 3a: Efeito dos níveis de Fe, em função do tempo, sobre a concentração de proteína total em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01).....	16
Figura 3b: Efeito da luz, em função do tempo, sobre a concentração de proteína total em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	17
Figura 4a: Efeito de fontes de N, níveis de Fe e tempo sobre o número de filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	18
Figura 4b: Efeito da luz, níveis de Fe e tempo sobre o número de filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	19
Figura 5a: Efeito do Fe, em função do tempo, sobre o teor de CaT em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	20
Figura 5b: Efeito da luz e do tempo sobre o teor de CaT em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	21
Figura 6a: Efeito de N, Fe e tempo sobre a relação Chl a: CaT, em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	22
Figura 6b: Efeito da luz e do tempo sobre a relação Chl a: CaT, em filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01)	23
Figura 7a: Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01), sob luz baixa, associada aos diferentes tratamentos de N e Fe.	24

Figura 7b: Curvas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01), sob luz alta, associada aos diferentes tratamentos de N e Fe	24
Figura 8: Médias das taxas de crescimento de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01), submetido a diferentes tratamentos de luz, N e Fe.....	25
Figura 9 (a-f): Características morfológicas dos filamentos de <i>C. raciborskii</i> (UFV-P01).....	26

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Identificação dos tratamentos aplicados no experimento.....	23
--	----

RESUMO

LEAL, Tatiane Vilela Freitas, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006. **Efeitos da intensidade luminosa, fontes de nitrogênio e níveis de ferro no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* (UFV-P01) (Nostocales, Cyanobacteria).** Orientadora: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Conselheiros: Marco Antônio Oliva Cano e Juraci Alves de Oliveira.

Foram investigados os efeitos das interações entre diferentes intensidades luminosas, fontes de nitrogênio (N) e níveis de ferro (Fe) em culturas unialgais, de *Cylindrospermopsis raciborskii*, uma cianobactéria potencialmente tóxica, sob cultivo em laboratório. Os isolados foram obtidos em um tanque de piscicultura do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O crescimento da cianobactéria foi monitorado através da produção de biomassa avaliado pelo conteúdo de clorofila **a** (Chl **a**), proteínas totais e contagem de filamentos. Para respaldar a avaliação dos efeitos dos tratamentos aplicados, determinou-se, também, o teor de carotenóides totais (CaT), a relação dos pigmentos Chl **a**: CaT e as taxas de crescimento específicas do organismo. Respostas diferenciadas de crescimento foram apresentadas pelo *C. raciborskii* (UFV-P01) quando submetido a diferentes intensidades luminosas, fontes de N e níveis de Fe. Neste estudo, observou-se um aumento significativo do crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01), em todas as variáveis dependentes avaliadas (Chl **a**, proteína total e contagem de filamentos) independentemente da fonte de N e dos tratamentos de Fe aplicados, quando submetidos a intensidade luminosa de $128 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (luz alta). Nestas condições de crescimento foi observado uma maior concentração de CaT nas células da cianobactéria, sugerindo uma estratégia adaptativa e de proteção contra o processo fotooxidativo, o que permitiu o crescimento do organismo sob alta intensidade luminosa. Reduções significativas em vários parâmetros de crescimento do *C. raciborskii* (UFV-P01)

foram registrados quando a fonte primária de N foi o $\text{NH}_4 - \text{N}$, associado ao tratamento de Fe na concentração de $900 \mu\text{g L}^{-1}$, destacando-se a produção de Chl **a**, a contagem de filamentos, a relação Chl **a**: CaT e as taxas de crescimento. Quando o suplemento de N fornecido foi o $\text{NO}_3 - \text{N}$, o aumento da concentração de Fe no meio não resultou em respostas diferenciadas de crescimento quando estes parâmetros foram avaliados. A variação na produção de carotenóides e de proteínas totais também foi influenciada pelas concentrações de Fe empregadas no meio de cultura, em função do tempo. Desta forma, nos tratamentos de maior concentração de Fe foram registrados menor teor de carotenóides e de proteínas totais nos filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01).

ABSTRACT

LEAL, Tatiane Vilela Freitas, M.S., Universidade Federal de Viçosa, march of 2006. **Effects of luminous intensity, source of nitrogen and level of iron in the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* (UFV-P01) (Nostocales, Cyanobacteria).** Advisor: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Committee members: Marco Antônio Oliva Cano and Juraci Alves de Oliveira.

The effects of the interactions among different light intensities, sources of nitrogen (N) and concentration of iron (Fe) were investigated in isolated *Cylindrospermopsis raciborskii* (UFV-P01) in laboratory, a potentially toxic cyanobacteria obtained from a fish ponds belonging to the Zoology Department of Federal University of Viçosa (UFV), Brazil. The cyanobacteria growth was monitored through the production of biomass contents of chlorophyll **a** (Chl **a**), total protein and filament numbers. To support the evaluation, in this study, on the effects of the applied treatments, it was also determined the content of total carotenoid (CaT), the proportion of the pigments Chl **a**: CaT and the specific growth rates of the organism. Differentiated growth responses were presented by *C. raciborskii* when exposed to different light intensities, sources of N and concentration of Fe. It was observed, in this research, a significant increase in the *C. raciborskii* growth in all analysed dependent variable (Chl **a**, total protein and filament number) independently of the N source and Fe levels applied, under light intensities of $128 \mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (high light). In these growth conditions, a large concentration of CaT was observed in the cells of *C. raciborskii*, suggesting an adaptive strategy and a protection against photooxidation, making it possible for the organism to grow under high light intensity. Significant reduction in several parameters used to evaluate the growth of *C. raciborskii* were registered when the primary N source was the $\text{NH}_4 - \text{N}$ associated to $900 \mu\text{g L}^{-1}$ of Fe (production of Chl **a**, number of filaments, proportion of Chl **a**: CaT and growth rates, stood up in this treatment). When the supplement of N was $\text{NO}_3 - \text{N}$, the increase of the concentration of Fe in the medium did not result in any differentiated responses of growth when the same

parameters were evaluated. The variation in the production of CaTs and total protein was also influenced by the treatments of Fe in the function of the time. Therefore, in treatments of larger concentrations of Fe, smaller was the production of carotenoids and total proteins found in the filaments of *C. raciborskii* (UFV – P01).

1. INTRODUÇÃO

Empresas gerenciadoras de água têm revelado interesse particular no conhecimento dos fatores que estimulam as florações de cianobactérias (Yunes *et al.*, 1998; Bouvy *et al.*, 2000; Havens *et al.*, 2003; Mischke, 2003; Tucci & Sant'anna, 2003). Isto porque, o crescimento excessivo desses organismos impede a penetração de luz, altera o gosto, o odor, a química e a turbidez da água, além de ocasionar um desequilíbrio ecológico no ambiente aquático (Branco, 1986; Kaur *et al.*, 1994; Carmichael, 1996; Falconer *et al.*, 1999). Florações de cianobactérias também podem acarretar graves conseqüências para a saúde humana, em virtude da capacidade de muitas espécies de produzirem toxinas. Tais metabólitos secundários podem afetar a saúde humana devido ao seu efeito neurotóxico ou hepatotóxico (Lagos *et al.*, 1999; Codd, 2000; Li *et al.*, 2001; Agujaro & Isaac, 2003; Lorenzi, 2004), tanto através da ingestão de água, quanto pelo contato direto durante atividades de recreação, ou pelo consumo de pescado contaminado. Entretanto, a principal via de intoxicação é o consumo, via oral, de água contendo toxinas, sem tratamento adequado para remoção das mesmas (Funasa, 2003).

A contagem de registros que descrevem a ocorrência de gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas tem aumentado consideravelmente (Chorus & Bartram, 1999; Saker *et al.*, 2003; Chonudomkul *et al.*, 2004; Molica *et al.*, 2004). Em várias partes do mundo, já foram constatadas as presenças de florações de cianobactérias tóxicas responsáveis por sérios prejuízos ao ecossistema e danos à saúde humana, além de outros animais (Elder *et al.*, 1993; Falconer, 1994; Matthiensen, *et al.*, 1999; Carmichael *et al.*, 2001; Fastner *et al.*, 2003). Os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix*, geralmente, estão envolvidos em florações, as quais, liberam toxinas, após a lise celular (Bittencourt-Oliveira & Molica 2003). No Brasil, nos últimos anos, as florações que têm despertado maior interesse dos pesquisadores são as do gênero *Cylindrospermopsis*, as quais têm sido cada vez mais freqüentes nos

reservatórios de águas brasileiras (Branco & Senna 1994, Bazza *et al.* 1999, Komárkova *et al.* 1999, Bouvy *et al.* 2000, Huszar *et al.* 2000, Jardim *et al.* 2001, Fernandes 2003, Mendes *et al.* 2003). Estes organismos tornaram-se componentes importantes das comunidades fitoplanctônicas, devido à sua alta competitividade em ambientes eutrofizados, aliada à sua capacidade de formar florações e produzir toxinas, fazendo desta espécie, uma das cianobactérias de grande interesse, tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública (Tucci & Sant'anna 2003).

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska Seenayya & Raju, 1972), pertencente a ordem Nostocales, foi descrita, originalmente, em região tropical, mas, atualmente, vem sendo registradas ocorrências de florações também em regiões temperadas. Isto demonstra sua alta capacidade de adaptação e vantagem competitiva, possibilitando sua rápida dispersão em diferentes zonas do globo terrestre e, por esta razão, tem sido considerada uma espécie extremamente invasiva (Briand *et al.* 2004). É uma espécie potencialmente tóxica, podendo produzir hepatotoxina do tipo cilindrospermopsina e neurotoxina do tipo saxitoxina (Chorus & Bartram 1999).

Os primeiros registros de florações do gênero *Cylindrospermopsis*, no Brasil, datam de 1969, no Lago Paranoá, Distrito Federal, Brasília. Porém, a grande expansão da distribuição de *C. raciborskii* se deu a partir da década de 90, coincidindo com o aumento da eutrofização dos sistemas aquáticos nas mais diversas regiões do Brasil. Há indícios de que o evento El Niño tenha favorecido a dispersão desta espécie para as diferentes regiões do país (Bouvy *et al.* 1999). No nordeste do Brasil, o gênero já foi identificado nos estados de Alagoas e Pernambuco (Bouvy *et al.* 2000). Na região sudeste e sul, há registros da ocorrência de florações e/ou dominância de *Cylindrospermopsis* nos estados do Rio de Janeiro (Pedrosa & Resende 1999), Minas Gerais (Jardim 1999) e São Paulo (Souza *et al.* 1998) e no Rio Grande do Sul (Proença *et al.* 2002).

Embora o gênero *Cylindrospermopsis* possa ser dominante durante o ano todo, estes microorganismos são mais comumente

encontrados em períodos, geralmente secos, com baixas pluviosidades e temperaturas elevadas (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003). Pesquisas têm sido realizadas no sentido de determinar os fatores que estimulam o crescimento deste grupo de cianofíceas nos ecossistemas aquáticos continentais (Padisák 1997, Souza *et al.* 1998, Bouvy *et al.* 1999, Briand *et al.*, 2002, Istvánovics *et al.*, 2002, Tucci & Sant'anna, 2003).

Tucci & Sant'anna (2003), relataram que as condições propícias para o desenvolvimento de florações de *C. raciborskii*, no Lago das Garças, um reservatório eutrófico de São Paulo, foram observadas quando as condições ambientais registraram médias elevadas de temperatura da água, turbidez, pH e oxigênio dissolvido, além de alta disponibilidade de N, na forma do íon amônio (NH_4^+) e da ausência de macrófitas.

O sucesso ecológico de *C. raciborskii* está diretamente relacionado à sua capacidade de migração na coluna d'água, presença de aerótopos, tolerância à baixa luminosidade, alta capacidade de dispersão (acinetos), resistência à herbivoria (zooplâncton), sobrevivência em condições levemente salinas, e alta afinidade pelo fósforo (P) e presença de NH_4^+ (Padisák 1997).

O íon amônio (NH_4^+) é a forma mais reduzida de N inorgânico disponível para assimilação, porém, normalmente, são as formas oxidadas de N que são encontradas na natureza, principalmente nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), N molecular. Em geral, todas estas formas de N requerem redução para amônio, um processo que requer gasto de energia. Por esta razão, a maioria dos microorganismos fotossintetizantes prefere o NH_4^+ como fonte de N (Von Ruckert & Giani 2004, Muro-Pastor & Florencio 2003).

O N é um dos elementos minerais mais importantes para a produção de matéria orgânica, requerido em grandes quantidades pelos diferentes organismos (Taiz & Zeiger, 2004, Horne & Goldman, 1994) e, que pode limitar a produção do fitoplâncton em águas naturais. É um elemento necessário para a síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, coenzimas, clorofilas e outros pigmentos

acessórios da fotossíntese, como as ficobiliproteínas, em cianobactéria (Saha *et al.*, 2003).

A deficiência de N e a baixa concentração de fósforo (P) no meio pode ser fator seletivo para o aparecimento de *C. raciborskii* (Briand *et al.*, 2002). Esta espécie, por ser um organismo diazotrófico, possui capacidade de fixar N atmosférico (N_2) convertendo-o a amônia (NH_3), pela ação do complexo nitrogenase (Watkinson, 1999), em células especializadas denominadas heterocitos (Lee 1999). Outra estratégia adaptativa apresentada por este organismo é a utilização de fontes internas de P como os grânulos de polifosfato, armazenados intracelularmente e, utilizados quando a concentração externa não é suficiente para a manutenção do metabolismo celular (Istvánovics *et al.*, 2002).

A fixação de N é um processo induzido e regulado pelos níveis de amônio, ou em menor extensão, de nitrato na célula. Esse processo, o qual demanda gasto de energia, será inibido se o nível de N fixado for significativamente alto. O processo, geralmente, ocorre mais rapidamente na presença de luz, quando a fotossíntese gera as moléculas de ATP (Graham & Wilcox, 2000).

Estudos realizados por Havens *et al.* (2003) evidenciaram uma relação entre intensidade luminosa e heterocitos. Os autores observaram que períodos com menor disponibilidade de luz subaquática, apresentaram menor contribuição para as espécies heterocitadas. Somente 20-40% do total das cianobactérias analisadas apresentavam heterocitos, quando sob menor disponibilidade de luz. Portanto, a luz é um dos principais fatores que determinam o crescimento desses organismos (Watkinson 1999).

Outro fator que pode estar associado ao favorecimento do crescimento e dominância de *C. raciborskii*, segundo Souza *et al.* (1998) é o alto nível Fe na água. O Fe é um dos mais importantes metais traços para o metabolismo dos vegetais, porque é requerido e associado a reações de síntese de enzimas e de muitas proteínas. A biossíntese de pigmentos como clorofila e ficobilinas é dependente da nutrição de Fe e,

portanto, algas com limitação de Fe no meio apresentam menor concentração de pigmentos (Kudo *et al.*, 2000). O Fe está diretamente envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, fixação e assimilação de N e síntese de DNA (Marschner, 1995; Kudo & Harrison, 1997. Becana *et al.*, 1998; Sunda & Huntsman, 2003). O Fe não é somente requerido para a fotossíntese, mas também para o transporte de elétrons na respiração e assimilação do nitrato, visto que a nitrato e a nitrito redutase requerem a presença do Fe (Geider & La Roche, 1993).

Desta forma, a compreensão dos fatores ambientais que interferem no crescimento das cianobactérias potencialmente tóxicas associado ao conhecimento de suas respostas fisiológicas, torna-se uma ferramenta importante e útil na prevenção, no monitoramento, e no gerenciamento eficiente de florações de organismos potencialmente produtores de toxinas, particularmente de *C. raciborski*, em ecossistemas aquáticos dulcícolas. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da intensidade luminosa, fontes de N combinado e níveis de Fe no crescimento de *C. raciborskii*.

2. METODOLOGIA

2.1 Local de coleta

As células de *C. raciborskii* designadas como UFV-P01 foram obtidas a partir de amostras de água coletadas em um tanque de piscicultura (20° 46' 36"S e 42° 51' 60"W), pertencente ao Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. O tanque selecionado apresenta as seguintes características: 10m x 20m de comprimento, 1,5m de profundidade, laterais de cimento e fundo de terra. Na ocasião, o tanque estava sendo utilizado para o cultivo de peixes da espécie *Oligossarcus argenteus*. As amostras de fitoplâncton foram coletadas na superfície da água (0-20 cm) em junho de 2004.

Aproximadamente, 500 mL de amostras compostas foram obtidas através de arrasto horizontal utilizando-se um frasco de boca larga. As

amostras foram acondicionadas em frascos de vidro transparentes com tampa hermeticamente vedada, sendo transportadas para o Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), da UFV, para o enriquecimento e, posteriormente o isolamento dos organismos.

2.2 Enriquecimento e isolamento de *C. raciborskii* (UFV-P01)

O isolamento de *C. raciborskii* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Aguiar (1992), utilizando-se o meio de cultura ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964).

As culturas, em placas de Petri, foram colocadas em sala de crescimento, sob iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes ($26 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8h de luz-escuro (crescimento fotoautotrófico). Após um período de 15 dias, as amostras foram examinadas sob microscópio estereoscópio (modelo VMT, Olympus) e microscópio óptico (modelo CX 40, Olympus), a fim de verificar o aparecimento das células de *C. raciborskii*. Filamentos de *C. raciborskii* foram isolados com o auxílio de uma micropipeta Pasteur e, transferidos para novos meios de cultura ASM-1, quantas vezes fossem necessários, até a obtenção de culturas unialgais (Aguiar 1992). Para o controle dos contaminantes eucarióticos utilizou-se, no meio de cultura, o antibiótico ciclohexamida (Sigma-Aldrich), cuja concentração final foi equivalente a $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Sant'anna & Azevedo 2000). Associada à técnica de micropipetagem, foi utilizada também a técnica de plaqueamento em meio sólido (15 g L^{-1} de agar purificado) (agar-Merck). Após a obtenção dos isolados, estes foram mantidos no banco de culturas de cianobactérias do laboratório de Ficologia da UFV.

Para a identificação taxonômica do gênero, utilizou-se literatura específica e, posteriormente, os organismos foram enviados para o Instituto de Botânica de São Paulo, SP, para identificação em nível específico.

2.3 Manutenção das culturas estoques

As culturas estoques, unialgais, de *C. raciborskii* (UFV-P01), foram mantidas em 18 frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido ASM-1 suplementado com 2,8 mg de N L⁻¹ na forma de NaNO₃. Estes frascos foram mantidos em sala de crescimento, sob condições fotoautotróficas. As culturas estoques foram checadas, periodicamente, através de análise microscópica para o controle de contaminantes.

2.4 Curva de crescimento

O padrão de crescimento do *C. raciborskii* (UVF-P01) foi determinado por intermédio da curva de crescimento. Inóculos iniciais (500 µL), obtidos através da centrifugação das culturas estoques, foram crescidos em 25 mL de meio líquido ASM-1, suplementado com 2,8 mg de N L⁻¹ na forma de NaNO₃, em laboratório, sob condições fotoautotróficas e agitação constante (110 rpm).

A produção de biomassa de *C. raciborskii* (UVF-P01) foi avaliada por intermédio da concentração de clorofila **a** (Chl **a** mL⁻¹), em função do tempo, segundo metodologia descrita por Aguiar (1992). As determinações de Chl **a** foram realizadas em intervalos de 48 horas, durante um período amostral de 26 dias, sendo utilizadas cinco réplicas por ponto. A absorvância do extrato metanólico foi lida a 665nm(A665), utilizando-se espectrofotômetro (modelo U2000, Hitachi). A concentração de Chl **a** foi calculada segundo a equação proposta por Meeks & Castenholz (1971).

2.5 Efeitos da intensidade luminosa, fontes de N e níveis de Fe sobre o crescimento de *C. raciborskii* (UVF-P01)

O estudo foi realizado no período de abril a outubro de 2005 no laboratório de Ficologia da UFV, utilizando-se células de *C. raciborskii* (UVF-P01), em fase exponencial de crescimento (fase log), obtidas a partir de culturas estoque com idade de 15 dias.

As células de *C. raciborskii* (UVF-P01) foram expostas a duas intensidades luminosas (26 e $128 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) baseando-se na metodologia proposta por Kudo & Harrison (1997), duas fontes de N (NaNO_3 ou NH_4Cl) na concentração de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de acordo Spróber *et al.* (2003) e, duas concentrações de Fe (300 e $900 \mu\text{g L}^{-1}$) segundo Souza *et al.* (1998), cuja forma utilizada foi o $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os experimentos tiveram duração de 8 dias. Para cada concentração de Fe utilizada, uma concentração proporcional de EDTA-Na (ácido etilenodiaminotetraacético) foi adicionado ao meio ASM-1 modificado (10 e 30 mg de EDTA-Na para 300 e $900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, respectivamente)

O trabalho foi dividido em duas etapas: na primeira etapa foram feitas avaliações utilizando-se duas fontes de N (NaNO_3 e NH_4Cl), associadas a dois níveis de Fe (300 e $900 \mu\text{g L}^{-1}$), sob intensidade luminosa igual a $26 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz baixa). Na segunda etapa, foram realizados experimentos iguais de N e Fe, porém, utilizando-se a intensidade luminosa equivalente a $128 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz alta). Para a montagem de cada etapa dos experimentos foram preparadas 5 repetições por tratamento, para cada tempo avaliado (0 , 2 , 4 , 6 , 8 dias) somando um total de 100 frascos Erlenmeyers (125mL), contendo 25 mL de meio líquido ASM-1 modificado, conforme os tratamentos apresentados na Tabela 1. O pH $7,2$ foi mantido em todos os tratamentos. Nos frascos foram acrescentados $500 \mu\text{L}$ de concentrado de células de *C. raciborskii*, (UVF-P01), em fase exponencial, provenientes das culturas estoques. Os frascos foram identificados e colocados aleatoriamente em uma mesa agitadora (modelo TE-145, Tecnal), sendo submetidos a uma agitação constante de 110 rpm .

Os experimentos foram mantidos sob condições fotoautotróficas de crescimento, fotoperíodo de $16/8\text{h}$ de luz e escuro (Aguiar 1992). O período experimental de cada etapa teve a duração de 8 dias.

Tabela 1. Identificação dos tratamentos aplicados em cada etapa do experimento para avaliação dos efeitos da intensidade luminosa, fontes de N e níveis de Fe sobre o crescimento de *C. raciborskii* (UVF-P01).

Identificação das amostras (Etiquetas)	NO ₃ -N (µg L ⁻¹ de N)	NH ₄ -N (µg L ⁻¹ de N)	FeCl ₃ (µg L ⁻¹ de Fe)	Luz Baixa (µmol m ² s ⁻¹) 1ª etapa	Luz Alta (µmol m ² s ⁻¹) 2ª etapa
N _(I) Fe _(A) 1	300	0	300	26	128
N _(I) Fe _(A) 2	300	0	300	26	128
N _(I) Fe _(A) 3	300	0	300	26	128
N _(I) Fe _(A) 4	300	0	300	26	128
N _(I) Fe _(A) 5	300	0	300	26	128
N _(II) Fe _(A) 1	0	300	300	26	128
N _(II) Fe _(A) 2	0	300	300	26	128
N _(II) Fe _(A) 3	0	300	300	26	128
N _(II) Fe _(A) 4	0	300	300	26	128
N _(II) Fe _(A) 5	0	300	300	26	128
N _(I) Fe _(B) 1	300	0	900	26	128
N _(I) Fe _(B) 2	300	0	900	26	128
N _(I) Fe _(B) 3	300	0	900	26	128
N _(I) Fe _(B) 4	300	0	900	26	128
N _(I) Fe _(B) 5	300	0	900	26	128
N _(II) Fe _(B) 1	0	300	900	26	128
N _(II) Fe _(B) 2	0	300	900	26	128
N _(II) Fe _(B) 3	0	300	900	26	128
N _(II) Fe _(B) 4	0	300	900	26	128
N _(II) Fe _(B) 5	0	300	900	26	128

O crescimento de *C. raciborskii* (UVF-P01) foi monitorado por meio da produção de biomassa, avaliada através da produção de Chl **a**, proteínas totais e contagem do número de filamentos.

Determinou-se, também, para respaldar a avaliação dos efeitos dos tratamentos aplicados no experimento, o teor de carotenóides totais (CaT), a relação dos pigmentos Chl **a**: CaT e a taxa de crescimento dos organismos durante fase exponencial de crescimento.

2.5.1 Determinação de Clorofila a (Chl a) e Carotenóides Totais (CaT)

A extração de Chl **a** e de CaT foi feita em metanol 100%, segundo metodologia descrita por Aguiar (1992) e, quantificado de acordo Wellburn (1994). A absorvância do extrato metanólico foi determinada nos comprimentos de onda 665,2 nm ($A_{665,2}$), 652,4 nm ($A_{652,4}$) e 470 nm (A_{470}) utilizando-se um espectrofotômetro (modelo UV mini-1240, Shimadzu). As determinações de Chl **a** e CaT foram realizadas em intervalos de 48 horas, durante todo o período amostral, sendo que, em cada dia de extração, cinco réplicas foram utilizadas.

2.5.2 Análise de Proteína Total

O volume de 600 µL de concentrado de células de *C. raciborskii* (UFV-P01) foi utilizado e submetido a centrifugação à 13.000 (xg) durante 5 minutos, sendo o “pellet” utilizado para determinação da concentração de proteína, segundo metodologia descrita por Bradford (1976).

As concentrações de proteínas totais foram mensuradas no início e ao final do experimento, utilizando-se 3 réplicas para cada leitura no comprimento de onda 595 nm, em espectrofotômetro com acessório para microplacas (Elisa).

2.5.3 Contagem de filamentos

As contagens dos filamentos foram realizadas segundo metodologia descrita por Sant’anna & Azevedo (2000). Utilizou-se uma câmara do tipo Fuchs Rosenthal, onde foram lidos 4 quadros maiores, no sentido diagonal, de cada lado da câmara. Devido a dificuldade de visualização de células individuais dos filamentos, padronizou-se as contagens da seguinte forma: 1 filamento é igual a 1 célula ou CFU (Unidade Formadora de Colônia). Na contagem, para cada tratamento estudado, utilizou-se 3 réplicas de amostras de 1000 µL, fixadas em lugol 2%, obtidas no início, no meio e ao final de cada etapa do experimento (0, 4 e 8 dias).

2.5.4 Taxas específicas de crescimento

Em todos os experimentos realizados as taxas de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01) foram calculadas utilizando-se os valores do logaritmo neperiano (ln) da Chl **a** durante a fase log, compreendida entre 0 a 4 dias de experimento, segundo metodologia descrita por Nascimento (1999). Estes dados, embora complementares, auxiliaram na avaliação dos efeitos apresentados pelos tratamentos de luz, fontes de N e níveis de Fe no crescimento da cianobactéria.

2.6 Registro fotográfico e caracterização morfológica

O registro fotográfico e a caracterização morfológica de *C. raciborskii* (UFV-P01) foram realizados com o auxílio de um fotomicroscópio (modelo AX-70, Olympus), acoplado a um sistema para captura de imagem utilizando-se o software Spot Basic, pertencente ao setor de Anatomia Vegetal do DBV. Foram registrados, detalhes, das características morfológicas dos filamentos, a diferenciação de heterocitos e de acinetos em células de *C. raciborskii* (UFV-P01).

2.7 Delineamento experimental

Cada etapa do experimento foi realizada com um esquema fatorial (1x2x2x1x5) correspondendo, respectivamente, a espécie selecionada, níveis de Fe, fontes de N, intensidade luminosa, e cinco repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

2.8 Análise estatística

Para testar os efeitos da intensidade luminosa, fontes de N e níveis de Fe sobre o crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01) utilizou-se a análise de variância, a partir de modelos lineares generalizados (Aitkin *et al.*, 1989; Crawley, 1993). Sendo utilizada a análise de resíduo para avaliar se as decisões da forma de distribuição e da transformação adotada foram apropriadas. Para todas as análises assumiu-se a

linearidade dos dados, o que mostrou ser adequado baseado na análise de resíduo.

Em todas as variáveis respostas, com exceção do contagem de filamentos, utilizou-se a análise homogênea, distribuição gama e função identidade. Para a variável contagem de filamentos utilizou-se a distribuição normal, função identidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Software Statistica, versão 6.0.

3. RESULTADOS

3.1 Curva de crescimento

As fases do crescimento de *C. raciborskii* (UVF-P01), foram definidas a partir da figura 1. A fase lag, pôde ser identificada no intervalo de 0 a 144 horas, equivalente a 6 dias. A fase *log*, ou de crescimento exponencial, foi proeminente, apresentando um tempo de duração de 240 horas (10 dias). Logo após este período, as células entraram na fase estacionária, a qual se tornou evidente 18 dias após o início do experimento. *C. raciborskii* (UFV-P01), nesse experimento, apresentou taxa de crescimento média igual a $0,87 \text{ dia}^{-1}$.

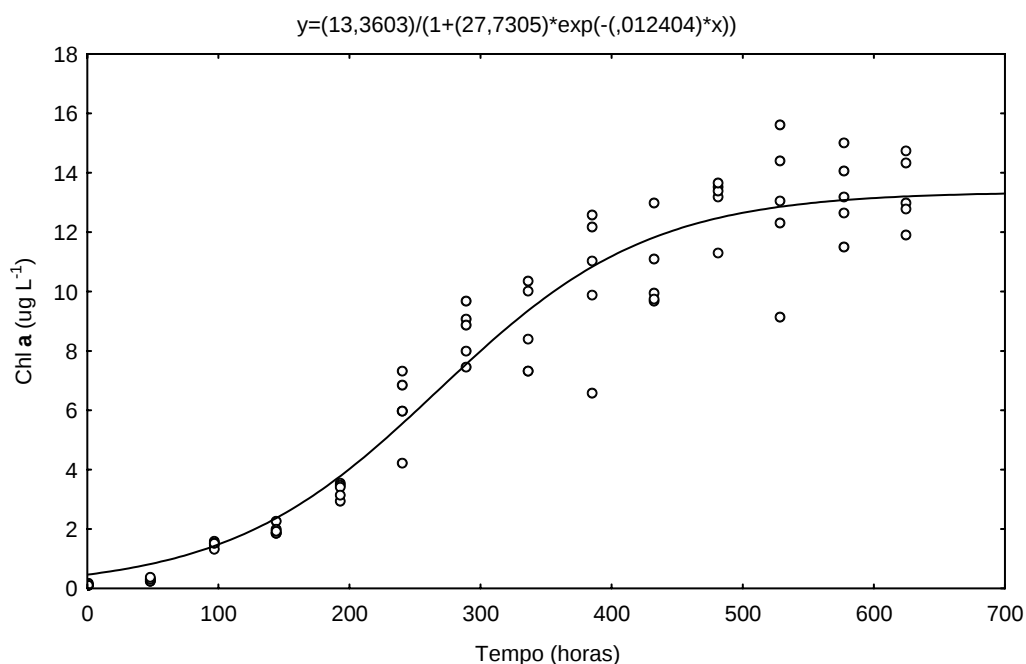


Figura 1: Curva de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01) cultivado sob condições fotoautotróficas e intensidade luminosa de $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em meio ASM-1, suplementado com $2,8 \text{ mg L}^{-1}$ de NaNO_3 , durante 26 dias. (n=5)

3.2 Efeitos da luz, fontes de N e níveis de Fe sobre o crescimento de *C. raciborskii* (UVF-P01)

3.2.1 Produção de Clorofila a (Chl a)

Houve um aumento linear na produção de Chl **a** para os tratamentos submetidos a diferentes fontes de N, níveis de Fe e intensidade luminosa (Figura 2a-b). Quando associou-se o N, sob a forma de $\text{NH}_4 - \text{N}$, com a concentração de $900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe no meio, o aumento linear observado na produção de Chl **a** foi menor do que com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, ao longo do experimento. Valores médios de 7,5 e $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Chl **a** para os tratamentos com 300 e $900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, foram obtidos, respectivamente, ao final do experimento (Figura 2a) (Interação $\text{N} \cdot \text{Fe} \cdot \text{Tempo}$, $p < 0,01$).

Resultado diferente foi obtido para a fonte $\text{NO}_3 - \text{N}$. Neste caso, não se observou diferença significativa na produção de Chl **a** quando esta fonte de N foi associada aos diferentes níveis de Fe. As amostras

avaliadas apresentaram, ao final do experimento, valores médios de 6,2 e 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Chl **a**, para os tratamentos com 300 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, respectivamente (Figura 2a) (Interação N*Fe*Tempo, $p < 0,01$).

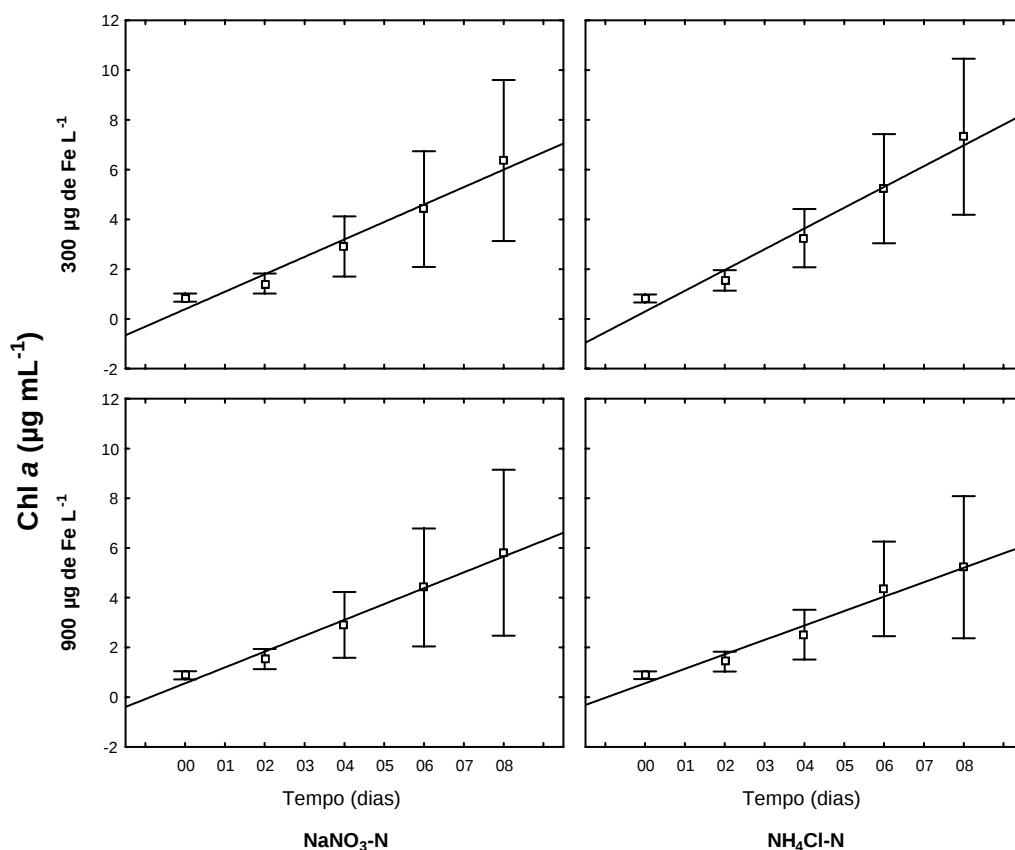


Figura 2a: Efeito de fontes de N, níveis de Fe e tempo sobre a produção de Chl **a** nos filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01), independente da intensidade luminosa aplicada (Interação N*Fe*Tempo, $p < 0,01$; $n=5$).

A maior produção de Chl **a**, de um modo geral, foi obtida sob luz alta (Figura 2b). O parâmetro tempo foi considerado um fator importante na resposta de crescimento de *C. raciborskii* (UVF-P01) para todas as variáveis analisadas (Chl **a**, proteína total, contagem de filamentos, CaT e relação Chl **a**: CaT). A concentração média de Chl **a** na presença de luz alta, ao final do experimento, foi 4 vezes superior ($10,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Chl **a**) àquela observada em luz baixa ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Chl **a**) (Fig 2b) (Interação Luz*Tempo, $p < 0,001$).

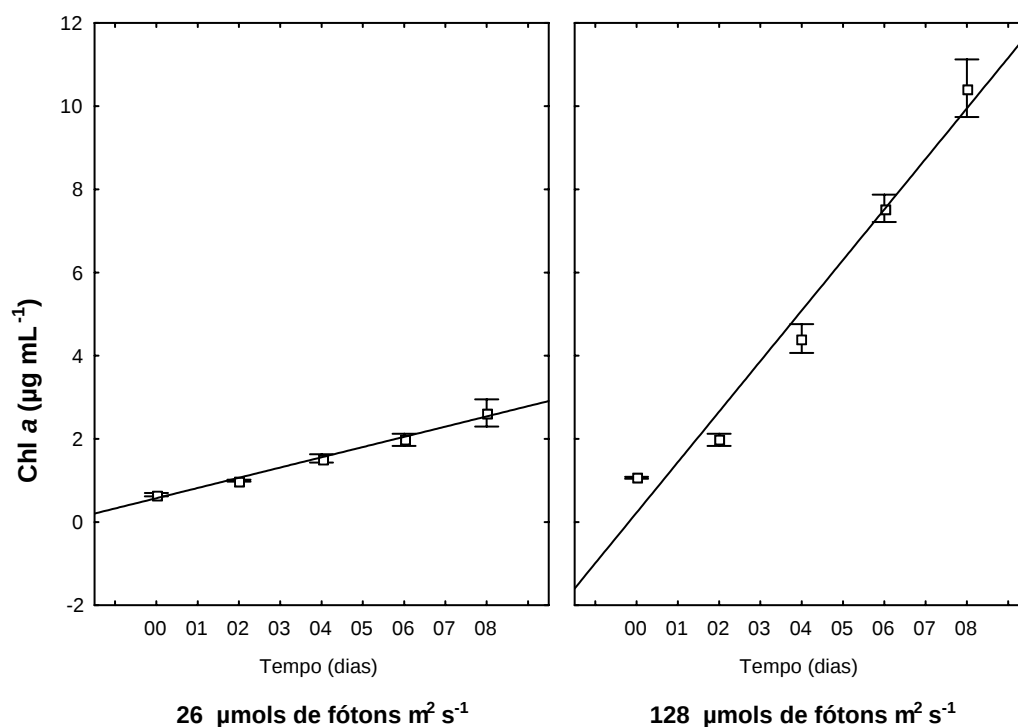


Figura 2b: Efeito da Luz, em função do tempo, sobre a produção de Chl a nos filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01) (Interação Luz*Tempo, $p < 0,001$; $n=5$).

3.2.2 Concentração de proteína total

A concentração de proteína total em células de *C. raciborskii* (UFV-P01) mostrou-se ser influenciada pelos diferentes níveis de Fe aplicados no meio, em função do tempo experimental (Figura 3a) (Interação Fe*Tempo, $p < 0,001$). A média da concentração final de proteína total avaliada nas amostras foi menor nos tratamentos contendo 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, do que nas amostras contendo 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Fe (5,9 e 8,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína total, respectivamente) (Figura 3a).

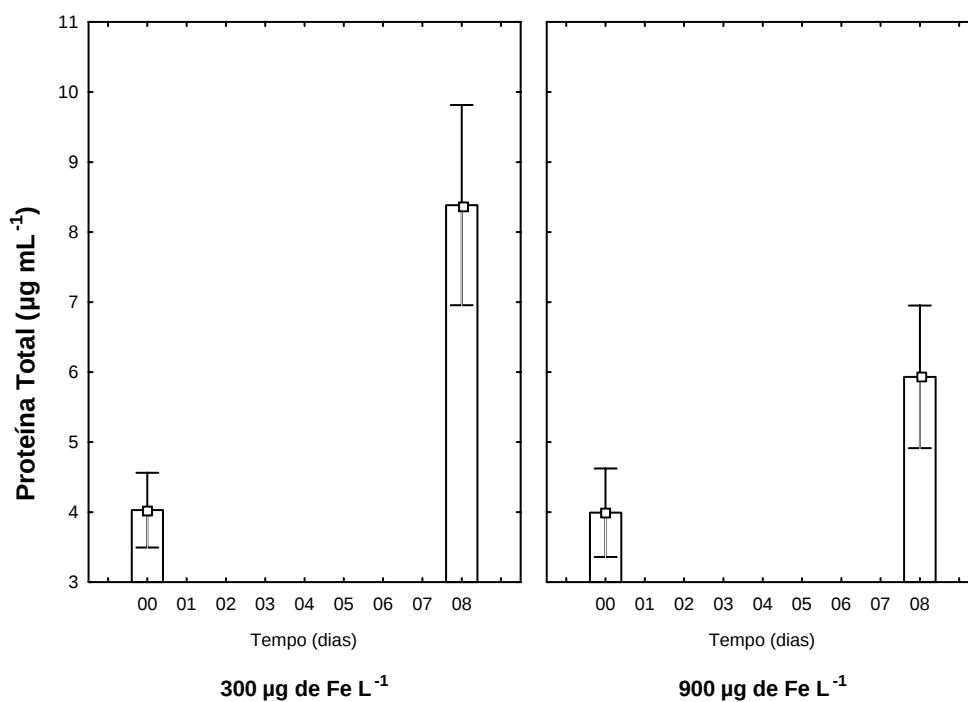


Figura 3a: Efeito dos níveis de Fe, em função do tempo, sobre a concentração de proteína total em filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01), independente das fontes de N e intensidades luminosas fornecidas (Interação Fe*Tempo, $p < 0,001$; $n = 3$).

Estatisticamente, a concentração de proteína total apresentou um efeito marginalmente significativo na interação intensidade luminosa versus tempo (Figura 3b) (Interação Fe*Tempo, $p = 0,056$). Este resultado mostrou que, independente da fonte de N e níveis de Fe empregados, *C. raciborskii* (UVF-P01) apresentou maior concentração final de proteína total, sob luz alta, do que luz baixa (Figura 3b).

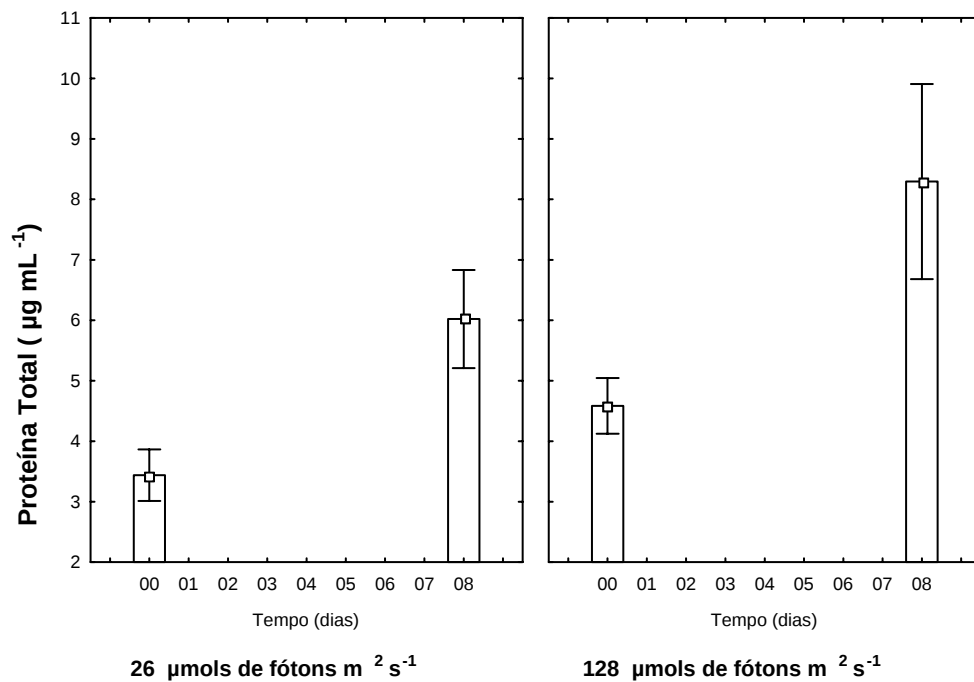


Figura 3b: Efeito da luz, em função do tempo, sobre a concentração de proteína total em filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01), independente das fontes de N e níveis de Fe empregados (Interação Fe*Tempo, $p = 0,056$; $n=3$).

3.2.3 Contagem de filamentos

O número de filamentos de *C. raciborskii* (UVF-P01) foi influenciado pela interação entre fontes de N, níveis de Fe e tempo, empregados neste estudo (Interação N*Fe*Tempo, $p < 0,001$) (Figura 4a). Observou-se, no tratamento de $\text{NH}_4 - \text{N}$ associado a maior concentração de Fe ($900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe) que, a medida que o tempo avançava, o número de filamentos presentes diminuíram no meio de cultura. No tratamento com $\text{NO}_3 - \text{N}$, entretanto, nenhuma diferença foi observada na produção de filamentos pela aplicação de diferentes níveis de Fe (Interação N*Fe*tempo, $p < 0,001$) (Figura 4a).

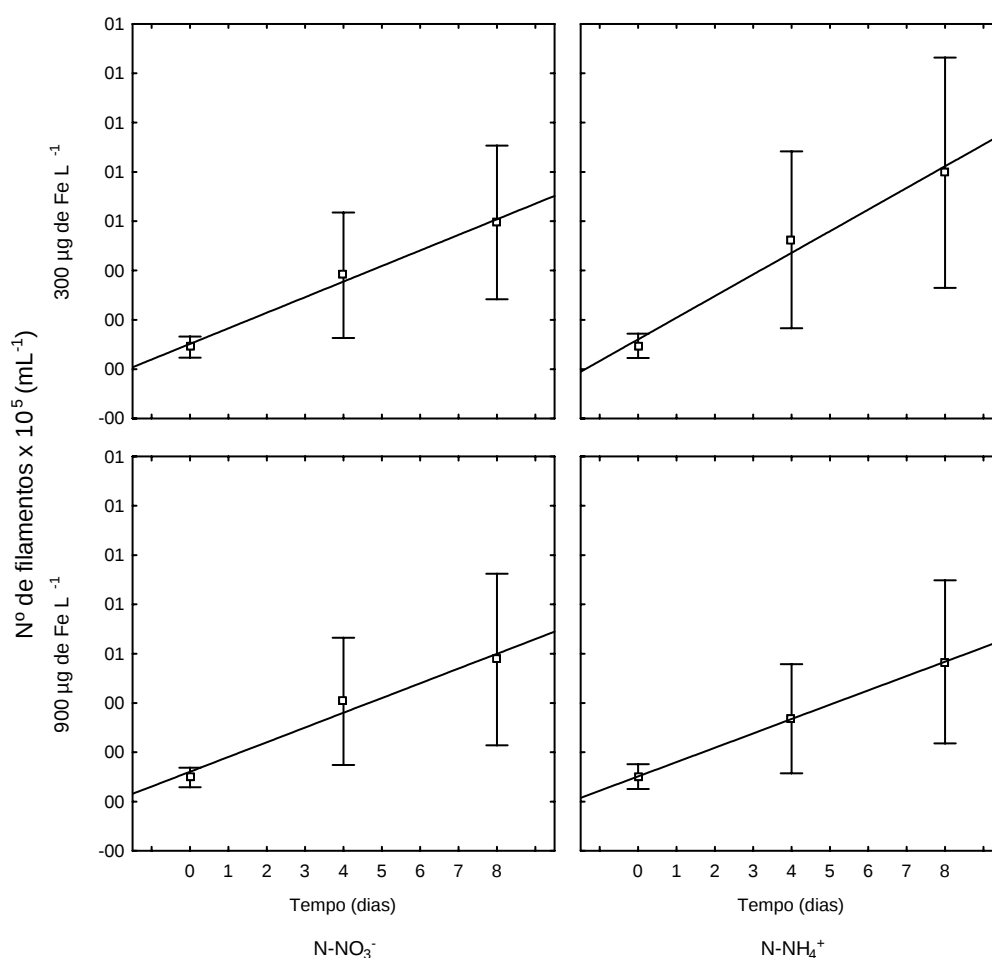


Figura 4a: Efeito de fontes de N, níveis de Fe e tempo sobre o número de filamentos de *C. raciborskii* (UVF-P01) (Interação N*Fe*tempo, $p < 0,001$; $n=3$).

O número de filamentos de *C. raciborskii* (UVF-P01) também sofreu interferência da interação entre níveis de Fe, luz e tempo (Interação Fe*luz*Tempo, $p = 0,04$) (Figura 4b). A produção de filamentos foi maior sob luz alta. Resultado esse, compatível com a produção de Chl **a**, e proteína total.

Entretanto, independente da intensidade luminosa fornecida, a produção de filamentos de *C. raciborskii* (UVF-P01) foi menor nos tratamentos com níveis de 900 µg de Fe L⁻¹ (0,11 e 1,1 filamentos mL⁻¹) do que com 300 µg de Fe L⁻¹ (0,19 e 1,21 filamentos mL⁻¹) (Figura 4b).

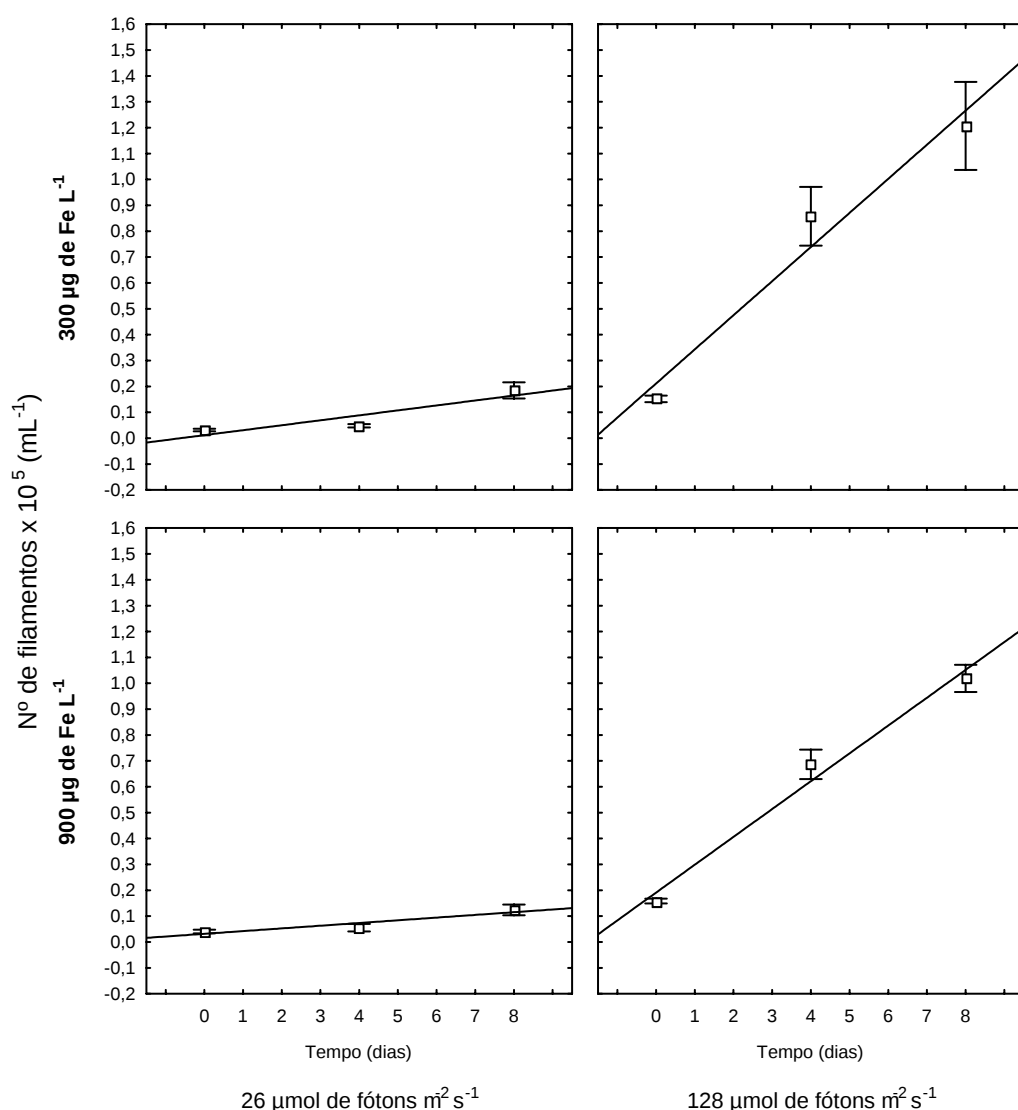


Figura 4b: Efeito da luz, níveis de Fe e tempo sobre o número de filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01) (Interação Fe*luz*Tempo, $p = 0,04$; $n=3$).

3.2.4 Produção de Carotenóides Totais (CaT)

Os teores de CaT apresentaram variações decorrentes dos diferentes tratamentos de Fe aplicados, no meio, em função do tempo (Interação Fe*Tempo, $p < 0,05$). Este resultado representado na figura 5a mostrou que, a medida que o tempo aumentava, os teores de CaT nos tratamentos contendo 900 µg L⁻¹ de Fe foram menores em relação aos tratamentos contendo 300 µg L⁻¹ de Fe (4,8 e 5,6 µg mL⁻¹ de CaT, respectivamente).

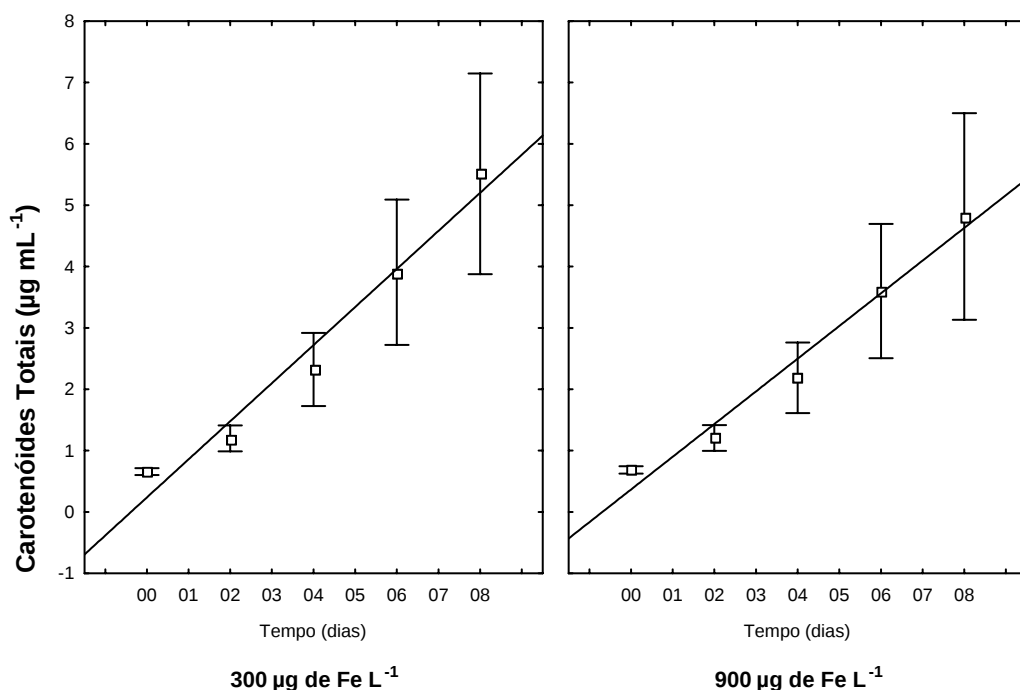


Figura 5a: Efeito do Fe, em função do tempo, sobre o teor de CaT em filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01), independente da fonte de N e da intensidade luminosa aplicada. (Interação Fe*Tempo, $p < 0,05$; $n=5$)

Os teores de CaT também apresentaram variações influenciadas pelas diferentes intensidades luminosas, em função do tempo (Interação Luz*Tempo, $p < 0,001$). Os resultados apresentaram superioridade nos teores de CaT nos tratamentos submetidos a maior intensidade luminosa, sendo suas médias finais equivalentes a 2,0 e 8,4 µg mL⁻¹ de CaT, para 26 e 128 µmol de fótons m² s⁻¹, respectivamente (Figura 5b).

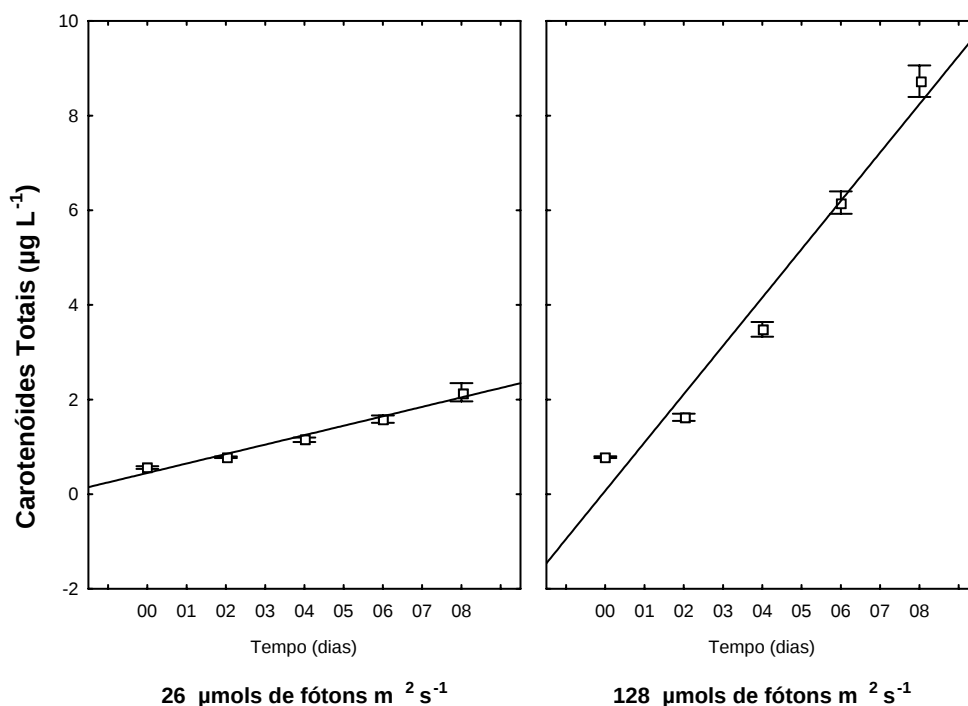


Figura 5b: Efeito da luz, em função do tempo, sobre o teor de CaT, em filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01), independente das fontes de N e níveis de Fe aplicados. (Interação Luz*Tempo, $p < 0,001$; $n=5$).

3.2.5 Relação Chl a: CaT

A relação dos pigmentos Chl a: CaT foi influenciada pela interação entre as variáveis N x Fe x tempo (Interação N*Fe*Tempo $p = 0,01$) (Figura 6a). Em meio contendo $\text{NO}_3 - \text{N}$, independente da concentração de Fe adicionado, ao final do experimento, a relação Chl a: CaT foi menor do que no início do experimento. Esta diminuição ocorreu a partir do 6º dia para $\text{NO}_3 - \text{N}$ com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe e, no 8º dia, para $\text{NO}_3 - \text{N}$ com $900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe. Em meio contendo $\text{NH}_4 - \text{N}$, dependendo da concentração de Fe aplicado, a resposta da relação Chl a: CaT, foi diferente. Na presença de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, a relação Chl a: CaT apresentou tendência a aumentar, até o 4º dia, estabilizando-se ao final do experimento. Na presença de $900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, a relação Chl a: CaT diminuiu, ao longo do período amostral, iniciando no 2º dia, e mais intensamente no 8º dia do experimento (Figura 6a).

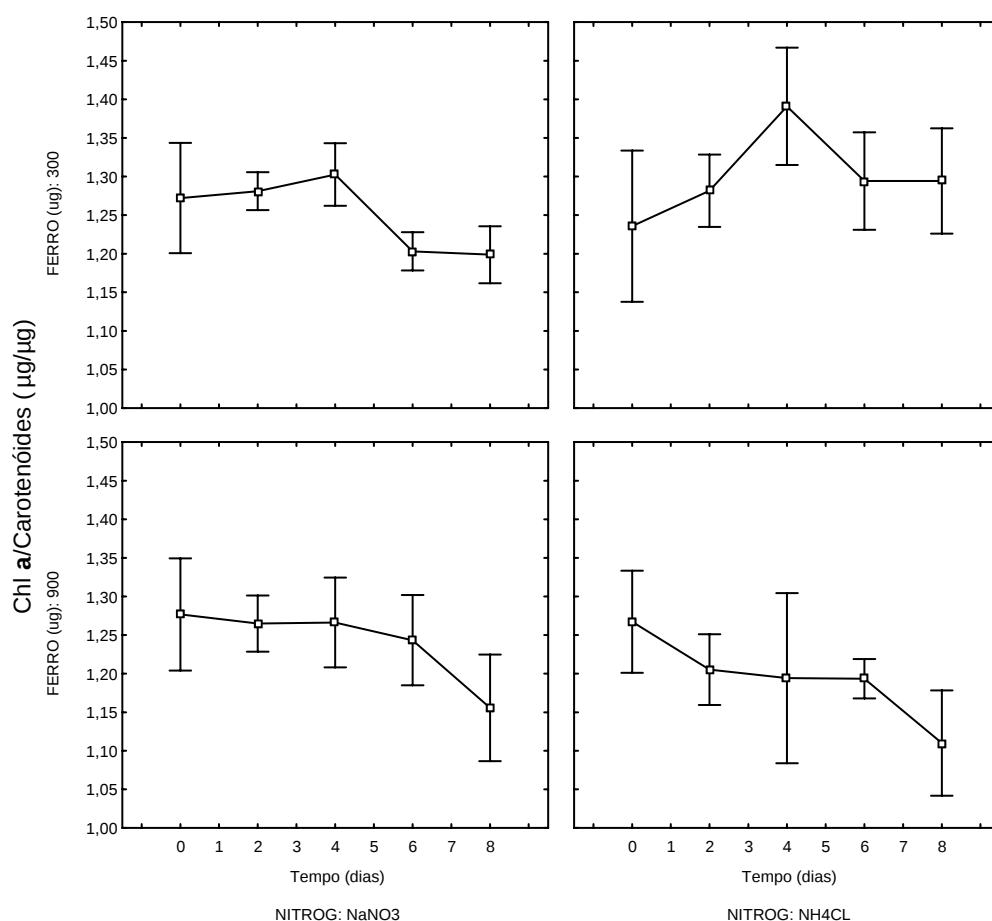


Figura 6a: Efeito de N, Fe e tempo sobre a relação Chl a: CaT, em filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01). (Interação N*Fe*Tempo, $p = 0,01$; $n=5$)

A variação da relação Chl a: CaT, em *C. raciborskii* (UFV-P01) foi, também, influenciada pela intensidade luminosa em função do tempo (Interação Luz*Tempo $p < 0,01$). Esta variação representada na figura 6b mostrou que existe uma relação inversa entre luz baixa e luz alta na razão Chl a: CaT. Quando se aplicou luz baixa, a relação Chl a: CaT apresentou tendência a aumentar ao final do experimento, sendo mais alta até o 4º dia. Posteriormente, tanto no 6º quanto no 8º dia de experimento, a relação Chl a: CaT apresentou uma redução, no entanto, os valores obtidos para estes pontos, ainda foram maiores do que aqueles obtidos no início do experimento.

Sob luz alta a relação Chl **a**: CaT diminuiu drasticamente, a partir do 2º dia experimental, permanecendo do 4º ao 6º dia com os mesmos valores. No 8º dia uma nova queda foi registrada.

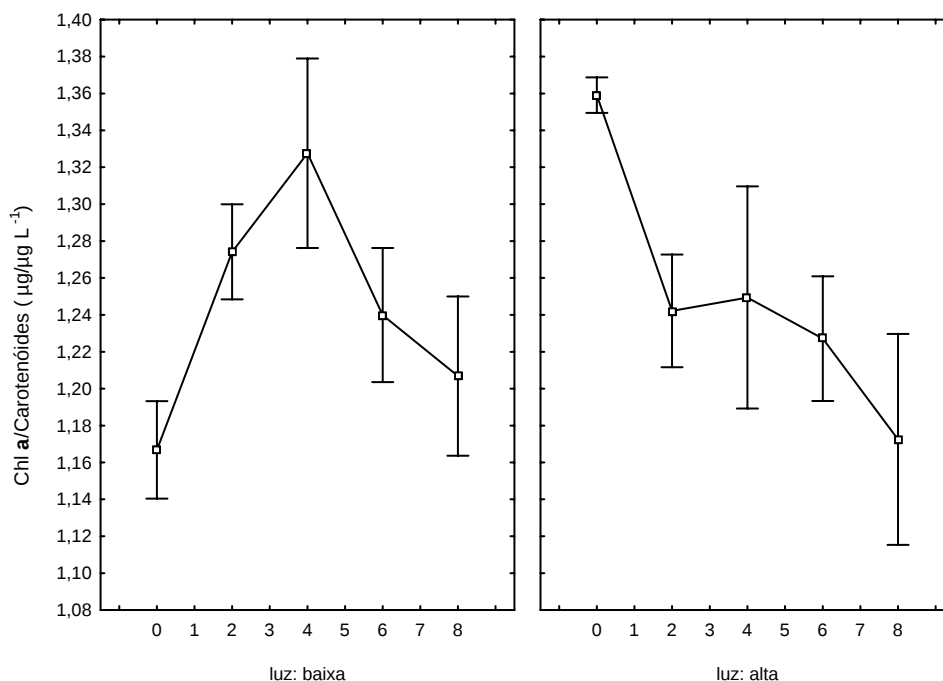


Figura 6b: Efeito da luz e do tempo sobre a relação Chl **a**: CaT em filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01) (Interação Luz*Tempo $p < 0,01$; $n = 5$)

3.2.6 Curvas e taxas específicas de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01)

Sob luz baixa, independente da fonte de N aplicada, os tratamentos com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe foram os que resultaram maiores taxas de crescimento ($0,23 \text{ dia}^{-1}$ para $\text{NO}_3 - \text{N}$ e $0,26 \text{ dia}^{-1}$ para $\text{NH}_4 - \text{N}$), identificado pela inclinação da reta, no intervalo entre 0 a 4 dias, conforme mostra a figura 7a.

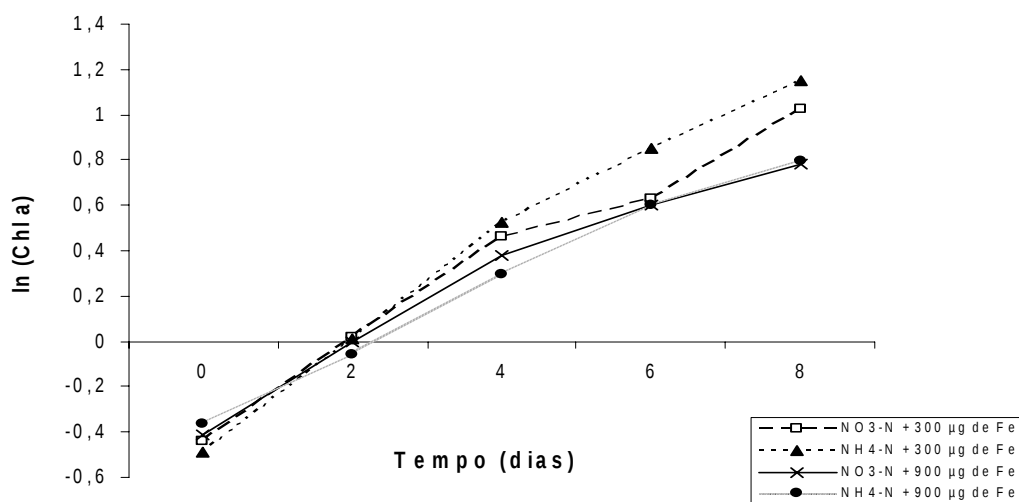


Figura 7a: Curvas de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01), sob luz baixa, associada aos diferentes tratamentos de N e Fe (n=5).

Sob luz alta, para a fonte NO₃ – N, independente dos tratamentos de Fe aplicados, as taxas de crescimento apresentadas foram semelhantes (0,35 d⁻¹ para 300 e 900 µg L⁻¹ de Fe), diferentemente da fonte NH₄ – N, no qual apresentou uma taxa de crescimento maior quando submetido a menor concentração de Fe (0.39 dia⁻¹), quando comparado a concentração de Fe equivalente a 900 µg L⁻¹ (0.33 dia⁻¹) (Figura 7b).

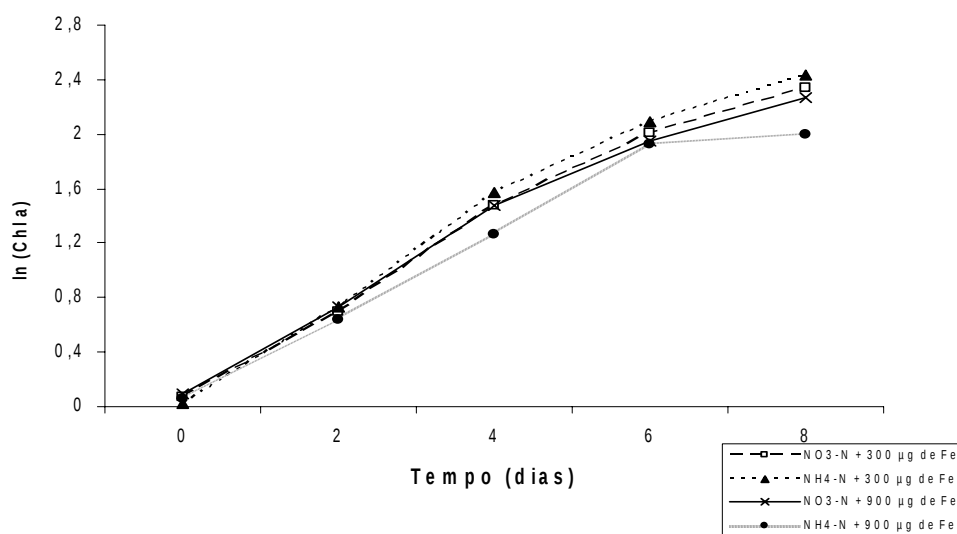


Figura 7b: Curvas de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01), sob luz alta, associada aos diferentes tratamentos de N e Fe (n = 5).

As taxas de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01), sob luz alta, foram maiores do que sob luz baixa, em todos os tratamentos de N e Fe aplicados (Figura 8). Nesta figura, também se observa que independente da intensidade luminosa as melhores taxas de crescimento foram obtidos nos tratamento de $\text{NH}_4 - \text{N}$ com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe.

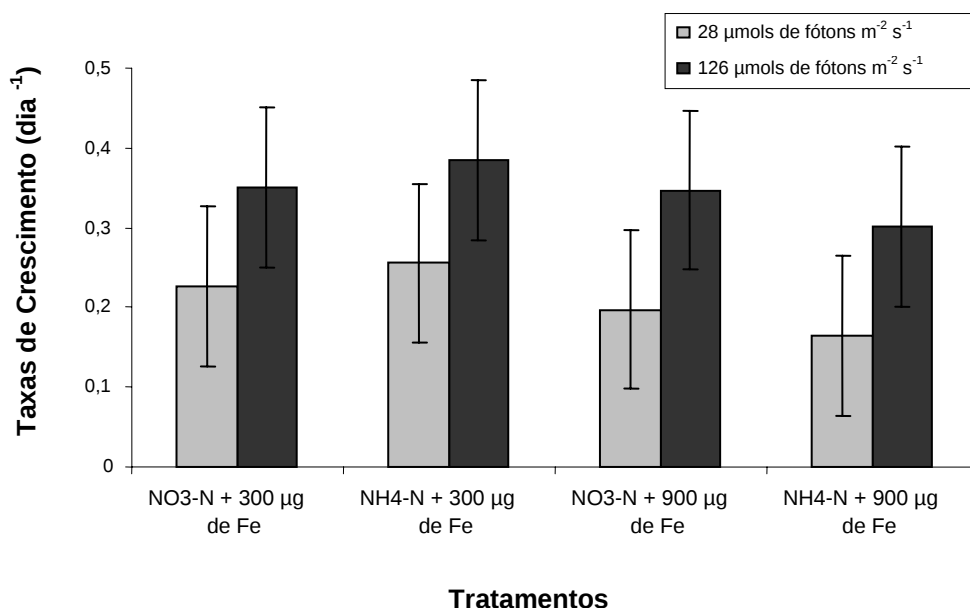


Figura 8: Médias das taxas de crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01), submetidos a diferentes tratamentos de luz, N e Fe.

3.3 Características morfológicas de *C. raciborskii* (UFV-P01)

C. raciborskii são organismos com organização de talo filamentoso, não ramificado, sendo os tricomas isolados, eretos ou levemente atenuados (Figura 9a). As células são cilíndricas e com conteúdo geralmente verde-amarelado (Figura 9b). No citoplasma ocorrem muitos aerótopos. Possuem heterocitos, células fixadoras de N_2 , em posição terminal, sendo em forma de gota ou chama de vela (Figura 9b, cabeça de seta). Em alguns filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01) foi possível observar a presença de 2 heterocitos num mesmo filamento (Figura 9c cabeça de seta). Células de resistência, denominadas acinetos, estão presentes nesta espécie (Figura 9d). Sua

forma é geralmente elíptica, podendo estes estar isolados ou em grupos no mesmo filamento, separados ou não do heterocito por uma célula vegetativa, apresentando muitos grânulos de reserva de cianoficina e polifosfato (Figura 9d).



Figura 9 (a-d): Características morfológicas dos filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01) cultivados, em meio ASM-1 (padrão), com 18 dias. **A** = Acineto; **G** = Grânulo; **H** = Heterocito; Barra= 50 μ m.

4. DISCUSSÃO

As respostas de *C. raciborskii* (UVF-P01), em termos de Chl **a**, proteína total e contagem de filamentos, foram similares, em função dos tratamentos aplicados e sugerem uma inter-relação dos mesmos no crescimento do organismo.

Independente da fonte de N fornecida e dos níveis de Fe aplicados, no meio de cultura, *C. raciborskii* (UFV-P01) apresentou maior crescimento quando submetido à luz alta ($128 \mu\text{mols de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este resultado é semelhante àquele obtido por Saker *et al.* (1999) trabalhando com duas cepas de *C. raciborskii* isoladas do lago Solomon Dam, Austrália. Os autores encontraram taxas de crescimento máximas para os organismos quando esses foram submetidos a uma intensidade luminosa equivalente a $118 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A disponibilidade de luz é um dos principais fatores que determinam o estabelecimento e o crescimento das cianobactérias nos diferentes habitats. Este parâmetro tem importância fundamental na dinâmica dos ecossistemas aquáticos. Praticamente, toda a energia que regula o metabolismo dos lagos, deriva diretamente da energia luminosa utilizada pela fotossíntese (Horne & Goldman 1994). A alta intensidade luminosa pode estimular a rápida formação de produtos próprios da fotossíntese como o ATP e o NADPH_2 (Moss, 1986), consequentemente, levando à maior produção de fotoassimilados. No entanto, sob alta irradiação, a taxa fotossintética pode ser reduzida e inibida, devido aos processos de fotorespiração e fotooxidação (Taiz & Zeiger 2004). As cianobactérias são muito sensíveis à fotoinibição (Kudo & Harrison 1997). De acordo com Saker *et al.* (1999), iluminação contínua equivalente a $165 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inibiu completamente o crescimento de isolados de *C. raciborskii* do lago Solomon Dam, Austrália. Enquanto que Várkonyi *et al.* (2000) observaram inibição do fotossistema II de células de *C. raciborskii*, isoladas de um lago na Hungria, somente quando estas foram crescidas durante longo período de incubação nas temperaturas de 25° ou 35°C , sob intensidade luminosa de $1\text{mmol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O excesso de energia de excitação resultante da absorção de mais luz do que aquela que pode ser utilizada pelo sistema de transporte de elétrons, leva a formação de espécies intermediárias de oxigênio reativas (ROIS) (Arora *et al.*, 2002). ROIS são potencialmente prejudiciais e podem oxidar proteínas e pigmentos fotossintetizantes, causando danos nos centros de reações de luz. (Van Leeuwe & Stefels, 1998; Falkowski & Raven, 1997). Além disso, a luz

excessiva também estimula a fotorespiração, promovendo maior absorção de oxigênio e a evolução do dióxido de carbono, resultante da oxidação da ribulose bifosfato (RuBP) (Salisbury & Ross, 1991). Uma das estratégias utilizadas pelas cianobactérias, para evitar a exposição a alta incidência de luz, inclui a migração vertical para áreas de intensidade luminosa mais adequada e a produção de moléculas protetoras, tais como os pigmentos acessórios (carotenóides e xantofilas), que protegem os complexos coletores de luz (Watkinson 1999). O aumento da concentração de CaT quando as células de *C. raciborskii* (UFP-P01) foram submetidas à luz alta (Figura 5b e 6b) corrobora a idéia de que os carotenóides auxiliam absorvendo a energia da clorofila no estado de maior excitação, prevenindo a formação de oxigênio singlete e evitando o estresse oxidativo, por dissiparem a energia numa forma não reativa, ou seja, na forma de calor (Young 1991). O aumento da produção de carotenóides para conter a fotoinibição durante florações superficiais de *Microcystis aeruginosa* também tem sido registrado (Paerl *et al.*, 1983; Paerl *et al.*, 1985).

Neste estudo, considerando-se os resultados obtidos, para as variáveis Chl **a**, proteína total, número de filamentos e CaT, observou-se que *C. raciborskii* (UFV-P01) é capaz de, concomitantemente, utilizar diferentes fontes de N para o seu metabolismo. No entanto, dependendo da fonte de N aplicado ($\text{NO}_3 - \text{N}$ ou $\text{NH}_4 - \text{N}$) as respostas de *C. raciborskii* (UFV-P01) para os parâmetros produção de Chl **a**, número de filamentos, relação Chl **a**: CaT e taxas de crescimento, foram influenciadas pelos tratamentos de Fe adicionados no meio de cultura. Observou-se também que, independente da fonte de N e da intensidade luminosa aplicada, as maiores taxas de crescimento foram obtidas para os tratamentos com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe. Além disso, quando esse nível de Fe foi associado a fonte $\text{NH}_4 - \text{N}$, a produção de Chl **a**, o número de filamentos e as taxas de crescimento foram maiores comparado com a fonte $\text{NO}_3 - \text{N}$. Em cianobactérias é comum observar taxas de crescimento mais elevadas quando a fonte de N aplicada é o $\text{NH}_4 - \text{N}$ (Wetzel, 1993). Neste estudo, a concentração de N fornecida no meio de cultura foi baixa ($300 \mu\text{g L}^{-1}$ tanto para $\text{NO}_3 - \text{N}$ como para $\text{NH}_4 - \text{N}$).

Portanto, não se pode deixar de considerar o fato de que a espécie de *C. raciborskii* (UFV-P01) também tenha utilizado o processo de fixação de N_2 , para sustentar o seu crescimento, principalmente sob intensidade luminosa maior. Isto porque, a maioria dos seus filamentos diferenciou heterocitos e, em muitos deles foram encontrados até dois heterocitos em um mesmo filamento.

Saker *et al.* (1999) avaliando o crescimento de duas cepas de *C. raciborskii* também observaram taxas elevadas de crescimento no meio nutritivo suplementado por $NH_4 - N$. A comparação entre $NO_3 - N$, $NH_4 - N$ e $N_2 - N$, como fontes de N aplicadas na cianofícea *Aphanizomenon flos-aquae* (heterocitada) e *Microcystis aeruginosa* (não heterocitada) associadas a diferentes intensidades luminosas (alta, baixa e variável) mostrou que as taxas de crescimento mais altas ocorreram sempre, quando o crescimento se fazia às custas da fonte de $NH_4 - N$ seguida pelo $NO_3 - N$ e $N_2 - N$ (Ward & Wetzel, 1980). Entretanto, Sprober *et al.* (2003) relataram que os parâmetros de crescimento: Chl **a**, N particulado e carbono particulado estudados em *C. raciborskii* isolado do Lago Balaton, Hungria, foram muito semelhantes, tanto para $NH_4 - N$ como para $NO_3 - N$, como fontes primárias de N, quando suplementados com elevadas concentrações de P. Porém a assimilação do NO_3^- requereu mais energia do que a de NH_4^+ .

Como o NO_3^- tem que ser reduzido a NH_4^+ antes de ser assimilado pelas células das cianobactérias, as taxas de absorção e de assimilação do NH_4^+ são, normalmente, mais elevadas do que para o nitrato (Mallet *et al.*, 1998). A redução do nitrato requer das cianobactérias a utilização de 8 moléculas de ferredoxinas (Von Ruckert & Giani, 2004). As respostas de produção de Chl **a**, número de filamentos, relação **a**:CaT e taxas de crescimento observados neste estudo, podem estar relacionadas a forma do N fornecido. O nitrato tem que ser absorvido, acumulado na célula e, posteriormente, ser reduzido à compostos intermediários, tais como amônio e aminoácidos livres, para ser incorporado as proteínas, clorofilas e ser utilizado na divisão celular. Além disso, a variação da resposta de crescimento de *C. raciborskii*

(UFV-P01) pode estar associada as diferentes necessidades e utilizações do Fe pelo organismo. Além da assimilação de diferentes fontes de N fornecidas. Uma das importantes funções do Fe, no metabolismo intracelular, é estar envolvido na atividade das enzimas nitrogenase, nitrato e nitrito redutase, pois o Fe apresenta-se como um dos componentes estruturais dessas enzimas e, também, da ferridoxina, doador de elétrons para a redução do nitrato em cianobactérias (Kudo & Harrison, 1997). Desta forma, quando o suprimento de N é o $\text{NO}_3 - \text{N}$, as necessidades férricas do fitoplâncton, incluindo as cianobactérias, são maiores do que para a fonte $\text{NH}_4 - \text{N}$ (Lewitus *et al.*, 2004).

Kustka *et al.* (2003) trabalhando com uma cianobactéria marinha do gênero *Trichodesmium* (IMS 101), submetida a diferentes níveis de Fe e fontes de N ($\text{N}_2 - \text{N}$ e $\text{NH}_4 - \text{N}$), evidenciou que o conteúdo celular e a taxa de absorção de Fe foram proporcionais à concentração do Fe total no meio, ao longo do período amostral. Os autores não observaram nenhuma saturação aparente ou regulação do sistema de absorção de Fe pela cianobactéria, quando submetida a altas concentrações do metal, mesmo quando a fonte de N disponível era o $\text{NH}_4 - \text{N}$. Ao contrário, quando se adicionava Fe ao meio, a absorção continuava aumentar, bem na região de precipitação do hidróxido férrico, sendo sugerido pelos autores que o Fe coloidal também possa ter sido usado por este gênero.

Neste estudo, sob condições de maior disponibilidade de Fe, uma maior absorção do mesmo, provavelmente tenha ocorrido na cianobactéria, resultando em acúmulo intracelular do metal, conforme sugere Kustka *et al.* (2003), atingindo, provavelmente, níveis de toxidez de Fe, significativas no organismo. Aparentemente, o crescimento de *C. raciborskii* (UFV-P01) na presença de $\text{NH}_4 - \text{N}$ requer menos disponibilidade de Fe do que na presença de $\text{NO}_3 - \text{N}$. Desta forma, um possível excesso intracelular de Fe no organismo pode ter ocorrido, interferindo no crescimento devido ao estresse oxidativo, provocado pela reação de Fenton. Kustka *et al.* (2003) também observaram menor crescimento do gênero *Trichodesmium* (IMS 101), no tratamento com

NH₄ – N, na presença de maior concentração de Fe total no meio. O stress oxidativo provoca danos as proteínas, DNA e lipídios insaturados da membrana pelos metabólitos reativos do oxigênio (Becana 1998; Connolly & Gueriot, 2002). Neste experimento, os resultados obtidos na Figura 3a indicaram menor concentração de proteína total, ao final do experimento, quando *C. raciborskii* (UVP-P01) foi crescido nos tratamentos com 900 µg L⁻¹ de Fe do que com 300 µg L⁻¹ de Fe no meio (5,9 e 8,4 µg mL⁻¹ de proteína total, respectivamente).

Mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos existem para proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo excesso de Fe nas plantas (Suh *et al.*, 2002), assim como em cianobactérias. Em organismos fotossintetizantes, como as cianobactérias, pigmentos da classe dos carotenóides compõem um dos sistemas não-enzimáticos para a neutralização da síntese de oxigênios intermediários reativos (ROIS) pelas células (Thomas *et al.* 1998). Os carotenóides, além de funcionarem como pigmentos acessórios, possuem importante capacidade de desintoxicar várias formas de oxigênio reativo e, também, de clorofilas no estado de maior excitação (Mathis & Kleo, 1973).

É interessante observar que, mesmo que a produção de CaT neste estudo tenha sido reduzida nos tratamentos com 900 µg L⁻¹ de Fe (Figura 5a), a diminuição da relação Chl **a**: CaT, ao final do experimento, foi detectada em todos os tratamentos aplicados, exceto no de NH₄ – N com 300 µg L⁻¹ de Fe (Figura 6a). Os dados evidenciaram maior produção de carotenóides para os tratamentos com NH₄ – N (900 µg L⁻¹ de Fe), desde o 2º dia do experimento, enquanto que, quando crescidas com 300 µg L⁻¹ de Fe, uma tendência inversa foi observada, ou seja, aumentou-se a produção de Chl **a**, até o 4º dia do experimento ocorrendo uma posterior estabilização ao final do experimento (Figura 6a).

5. CONCLUSÃO

As células de *C. raciborskii* (UFV-P01) utilizadas neste experimento apresentaram respostas diferenciadas de crescimento quando submetidas a diferentes intensidades luminosas, fontes de N e níveis de Fe. Um aumento significativo do crescimento, em laboratório, ocorreu para todos os parâmetros analisados, quando as células do organismo foram submetidas a maior intensidade luminosa, independentemente das fontes de N e dos tratamentos de Fe empregados. Sob esta condição de luz, observou-se maior concentração de CaT nos filamentos de *C. raciborskii* (UFV-P01), refletindo a capacidade de adaptação e de proteção do organismo, quando crescido nestas condições.

Reduções significativas na produção de Chl **a**, número de filamentos relação Chl **a**: CaT e taxas de crescimento ocorreram quando a fonte primária de N foi o $\text{NH}_4 - \text{N}$, associado ao tratamento com $900 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe. Para a fonte $\text{NO}_3 - \text{N}$, o aumento da concentração de Fe aplicado no meio não resultou em resposta diferenciada de crescimento para os mesmos parâmetros avaliados.

As variações na produção de carotenóides e proteína total, por *C. raciborskii* (UFV-P01), também foram influenciadas pelos tratamentos de Fe empregados no meio de cultura, em função do tempo. Desta forma, quanto maior a concentração de Fe aplicado menor a produção de carotenóides e proteína total.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, R.M. (1992) **Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de N, e o isolamento de mutantes espontâneos**. Piracicaba. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Agujaro, L.F.; Isaac, R.L. (2003) Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá – Estado de São Paulo – e avaliação dos mananciais em relação à eutrofização. In: **22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental** de 14 a 19 de setembro. Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Aitkin, M.; Anderson, D.; Francis, B.; Hinde, J. (1989) **Statistical Modelling in GLIM**. Oxford, Oxford University Press.

Arora, A.; Sairam, R.K.; Srivastava, G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science** 82(10):1227-1238.

Bazza, E.L.; Train, S.; Thomaz, S.M. (1999) Flutuações na estrutura da comunidade fitoplanctônica durante o período de enchimento do reservatório de Corumbá (GO). In: **VII Congresso Brasileiro de Limnologia**. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Becana, M.; Moran, J.F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil** 201:137-147.

Bittencourt-Oliveira, M.C.; Molica, R. (2003) Cianobactéria Invasora. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 30:82-90.

Bouvy, M.; Falcão, D.; Marinho, M.; Pagano, M.; Moura, A. (2000) Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian Tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology** 23:13-27.

Bouvy, M.; Molica, R.J.R.; Nascimento, S.M. (1999) Cianobactérias: risco em águas de abastecimento. **Ciência Hoje** 26(154):67-69.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry** 72:248 – 254.

Branco, C.W.C.; Senna, P.A.C. (1994) Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Algological Studies** 75:85-96.

Branco, S.M. (1986) **Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária**. 3. ed. São Paulo, CETESB.

Briand, J.F.; Robillot, C.; Quiblier-Llobéras, C.; Humbert, J.F.; Couté, A.; Bernard, C. (2002) Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research** 36:3183–3192.

Briand, J.F.; Leboulanger, C.; Humbert, J.F.; Bernard, C.; Dufour, P. (2004) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or warming global? **Journal of Phycology** 40:231-238.

Carmichael, W.W. (1996) Toxic *Microcystis* and the environment. In: **Toxic Microcystis**. M F Watanabe *et al.* (Eds.) New York: CRC Press, pp. 1-11.

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. **Environment Health Perspective** 109:663-668.

Chonudomkul, D.; Yongmanitchai, W.; Theeragool, G.; Kawachi, M.; Kasai, F.; Kaya, K.; Watanabe, M.M. (2004) Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology** 48:345–355.

Chorus, I.; Bartram, J. (1999) **Toxic cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management**. London, E & FN Spon.

Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. (2002) Iron stress in plants. **Genome Biology** 3(8):reviews 1024.1-1024.4.

Cood, G.A. (2000) Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. **Ecological Engineering** 16:51-60.

Crawley, M.J. (1993) **GLIM for ecologists**. London, Blackwell Scientific Publications.

Elder, G.H.; Hunter, P.R.; Cood, G.A. (1993) Hazardous freshwater cyanobacteria (blue-green algae). **The lancet** 341:1519-1520.

Falconer, I.R.; Bartram, J.; Chorus, I.; Kuiper-Goodman, T.; Utkilen, H.; Burch, M.; Cood, G.A. (1999) "Safe levels and safe particles". In: Chorus, I. e Bartram, J. (Eds), **Toxic cyanobacteria in water**. London, E&FN Spon.

Falconer, I.R.; Burch, M.D.; Steffensen, D.A.; Choice, M.; Coverdale, O.R. (1994) Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environmental toxicology and water quality journal** 9:131-139.

Falkowski, P.G.; Raven, J.A. (1997) **Aquatic Photosynthesis**. Massachusetts, Blackwell Science.

Fastner, J.; Heinze, R.; Humpage, A.R.; Mischke, U.; Eaglesham, G.K.; Chorus, I. (2003) Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon** 42:313–321.

Fernandes, V.O. (2003) Ecossistemas aquáticos continentais do Espírito Santo: “Berços” de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas? In: **IX Congresso Brasileiro de Limnologia**, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

FUNASA - Fundação Nacional da Saúde (2003) **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano** – Brasília: Ministério da Saúde.

Geider, R.J.; La Roche, J. (1993) Response of the photosynthesis apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. **Journal of Phycology** 29:755-766.

Gorham, P.R.; McLachlan, J.R.; Hammer, V.T.; Kim, W.K. (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. Verhandlungen – **Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie** 15:796-804.

Graham, L.E.; Wilcox, L.W. (2000) **Algae**, Rio de Janeiro, Prentice-Hall do Brasil, Ltda.

Havens, K.E.; James, R.T.; East, T.L.; Smith, V.H. (2003) N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. **Environmental Pollution** 122:379-390.

Horne, A.J.; Goldman, C.R. (1994) **Limnology**. 2nd ed. New York, McGraw-Hill.

Huszar, V.L.M.; Silva, L.H.S.; Marinho, M.; Domingos, P.; Sant'Anna, C.L. (2000) Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian water. **Hydrobiologia** 424:67-77.

Istvánovics, V.; Somlyódy, L.; Clement, A. (2002) Cyanobacteria-mediated internal eutrophication in shallow Lake Balaton after load reduction. **Water Research** 36: 3314–3322.

Jardim, F.A. (1999) **Implantação e realização de análise de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA MG**. Belo Horizonte. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Escola de Engenharia - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

Jardim, F.A.; Fonseca, Y.M.F.; Vianna, L.N.L.; Azevedo, S.M.F.O.; Ciscotto, P.H.C. (2001) Primeira ocorrência de cianobactéria tóxicas em um reservatório da COPASA – Minas Gerais – Brasil. **Revista Bios – Caderno do Departamento de Ciências Biológicas – Puc Minas** 9:83-91.

Kaur, K.; Bott, T.R.; Heathcote, G.R.; Keay, G.; Leadbeater, B.S.C. (1994). Treatment of algal-laden water: pilot-plant experiences. **Journal IWEM** 8:22-32.

Komárkova, 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

Kudo, I.; Harrison, P.J. (1997) Effect of iron nutrition on the marine cyanobacterium *Synechococcus* grown on different N sources and irradiances. **Journal of Phycology** 33:232-240.

Kudo, I.; Miyamoto, M.; Noiri, Y.; Maita, Y. (2000) Combined effects of temperature and iron the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology** 36:1096-1102.

Kustka, A.B.; Sañudo-Wilhelmy, S.A.; Carpenter, E.J.; Capone, D.; Burns, J.; Sunda, W.G. (2003) Iron requeriments for dinitrogen and ammonium-supported growth in cultures of *Trichodesmium* (IMS 101): Comparison with nitrogen fixation rates and iron: carbon rations of field populations. **Limnology and Oceanography** 48(5):1869-1884.

Lagos, N.; Onodera, H.; Zagatto, P.A.; Andrinolo, D.; Azevedo, S.M.F.Q.; Oshima, Y. (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon** 37:1359 -1373.

Lee, R.E. (1999) **Phycology**. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press

Lewintus, A.J.; Kawaguchi, T.; DiTullio, G.R.; Keesee, J.D.M. (2004) Iron limitation of phytoplankton in an urbanized vs. forested southeastern U.S. salt marsh estuary. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 298:233-254.

Li, R.; Carmichael, W.W.; Brittain, S.; Eaglesham, G.K.; Shaw, G.R.; Mahakhant, A.; Noparatnaraporn, N.; Yongmanitchai, W.; Kaya, K.; Watanabe, M.M. (2001) Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon** 39:973-980.

Lorenzi, A.S. (2004) **Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil**. Piracicaba. Dissertação de Mestrado – Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mallet, C.; Charpin, M.F.; Devaux, J. (1998). Nitrate reductase activity of plankton populations in eutrophic Lake Aydat and meso-oligotrophic Lake Pavin: a comparison. **Hydrobiologia** 373-374:135-148.

Marschner, H. (1995). **Mineral nutrition of higher plants**, 2nd ed. London, Academic Press.

Mathis, P.; Kleo, J. (1973). The triplet state of β -carotene and of analog polyenes of different length. **Photochemistry Photobiologic** 18:343-346.

Matthiensen, A.; Yunes, J.S.; Codd, G.A. (1999). Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos-RS. **Revista Brasileira de Biologia** 59(3):361-376.

Mendes, J.S.; Barbosa, J.E.L.; Watanabe, T. (2003). Dinâmica da composição e biomassa fitoplâncton durante a fase de enchimento da Barragem de Acauã, Itatuba – Paraíba. In: **IX Congresso Brasileiro de Limnologia**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

Meeks, J.C.; Castenholz, R.W. (1971). Growth and photosynthesis in extreme thermophile *Synechococcus lividis* – I. Effect of temperature on fluorescence and enhancement of CO₂ assimilation. **Journal Thermal Biologic** 3:11-18.

Mischke, U. (2003). Cyanobacteria associations in shallow polytrophic lakes: influence of environmental factors. **Acta Oecologica** 24:S11-S23.

Molica, R.J.R.; Oliveira, E.J.A.; Carvalho, P.V.V.C.; Costa, A.N.S.F.; Cunha, M.C.C.; Melo, G.L.; Azevedo, S.M.F.O. (2004). Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae** 3(2):99-115.

Moss, B. (1986). **Ecology of fresh waters**, 3. ed. London, Blackwell Scientific Publications.

Muro-Pastor, M.I.; Florencio, F.J. (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. **Plant physiology and biochemistry** 41:595-603.

Nascimento, A.G. (1999). **Métodos de purificação e efeitos da qualidade spectral da luz em *Nostoc spp.*** Dissertação de mestrado – Departamento de Microbiologia Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais

Padisák, J. (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archive Hydrobiological Supplement** 4 107:563-593

Paerl, H.W.; Tucker, J.; Bland, P.T. (1983). Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. **Limnology and Oceanography** 28:847-857.

Paerl, H.W.; Bland, P.T.; Dean Bowles, N.; Haibach, M.E. (1985) Adaptation to high intensity, low-wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology** 49:1046-1052.

Pedrosa, P.E.; Resende, C.E. (1999) As muitas faces de uma lagoa. **Ciência Hoje** 26 (153):40-47.

Proença, L.A.O.; Cunha, N.T.; Yunes, J.S. (2002) Análise da cianotoxina cilindrospermopsina em amostras de reservatórios. In: **Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental**, Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, SC. Disponível em: <http://www.cttmar.univali.br/algas/publicações/ciano16.pdf>>. Acesso em: 10 de abril, 2005

Saha, A.k.; Uma, L.; Subramanian, G. (2003). Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiology Ecology** 45:263-272.

Saker, M.L.; Neilan, B.A.; Griffiths, D.J. (1999). Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. **Journal of phycology** 35:599-606.

Saker, M.L.; Nogueira, I.C.; Vasconcelos, V.M.; Neilan, B.A.; Eaglesham, G.K.; Pereira, P. (2003) First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese Freshwaters. **Ecotoxicology Environmental Safety** 55:243-250.

Salisbury, F.B.; Ross, C.W. (1991) **Plant Physiology**. California, Wadsworth Publishing Company, Belmont.

Sant'anna, C.L.; Azevedo, M.T.P. (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia** 71:359-385.

Seenayya, G.; Raju, S.N. (1972) On the ecology and systematic of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz). Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*. In Desikachary, TV (ed), Papers submitted to the first International Symposium on Taxonomy and Biology of Blue-green algae. **Madras University**: 52-57.

Souza, R.C.R.; Carvalho, M.C.; Truzzi, A.C. (1998) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae). Dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality** 13:73-81.

Spróber, P.; Shafik, H.M.; Présing, M.; Kovács, A.W.; Herodek, S. (2003) Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* under different nitrogen conditions. **Hydrobiologia** 506/509:169-174.

Suh, H.; Kim, C.S.; Lee, J.; Jung, J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology** 75:513-518.

Sunda, W.; Huntsman, S. (2003) Effect of pH, light, and temperature on Fe-EDTA chelation and Fe hydrolysis in seawater. **Marine Chemistry** 84:35-47.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre, Artmed.

Thomas, D.J.; Avenson, T.J.; Thomas, J.B.; Herbert, S.K. (1998) A cyanobacterium lacking iron superoxide dismutase is sensitized to oxidative stress induced with methyl viologen but not sensitized to oxidative stress induced with norflurazon. **Plant Physiology**. 116(4):1593-1602.

Tucci, A.; Sant'anna, C. (2003) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, Sp. Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 26:97-112.

Van Leeuwe, M.A.; Stefels, J. (1998) Effect of iron and light stress on the biochemical composition of Antarctic *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae). II. pigment composition. **Journal of Phycology**. 34:496-503.

Várkonyi, Z.; Zsiros, O.; Farkas, T.; Garab, G.; Gombos, Z. (2000) The tolerance of cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to low temperature photo-inhibition affected by the induction of polyunsaturated fatty acid synthesis. **Biochemical Society Transactions**. 28(6):892-894.

Von Ruckert, G.; Giani, A. (2004) Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). **Revista Brasileira de Botânica**. 27(2):325-331.

Ward, A.K.; Wetzel, R.G. (1980) Interactions of light and nitrogen source among planktonic blue-green algae. **Archiv Hydrobiological**. 90:129-138.

Watkinson, A. (1999) **Ecophysiology of Marine Cyanobacterial Blooms**. Literature review submitted to the Department of Botany, University of Queensland, for the partial fulfillment of Bachelor of Science (Hons).

Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**. 144:307-313.

Wetzel, R.G. (1993) **Limnologia**. Trad. Maria José L. Boavida, 1. ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Young, A.J. (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. **Physiology of Plant**. 83:702-708.

Yunes, J.S.; Niencheski, L.F.H.; Salomón, P.S.; Parise, M.; Beattie, K.A.; Raggett, S.L.; Codd, G.A. (1998) The effect of nutrient balance and physical factors on the control of cyanobacterial blooms in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. Verh. International Verein. **Limnology**. 26:1796-1800.