

MARCELO GOMES MARÇAL VIEIRA VAZ

DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM *Nostoc* spp: EFEITO
DA INTENSIDADE LUMINOSA E DO PADRÃO DE
SOBREPOSIÇÃO DOS FILAMENTOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

MARCELO GOMES MARÇAL VIEIRA VAZ

DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM *Nostoc* spp: EFEITO
DA INTENSIDADE LUMINOSA E DO PADRÃO DE
SOBREPOSIÇÃO DOS FILAMENTOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola para
obtenção do Título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 25 de junho de 2010.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Coorientador)

Prof^a. Aristéa Alves Azevedo

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Orientador)

“All things must pass”

(George Harrison)

Aos meus pais, Eci e Isma.

Aos meus irmãos, Roberta, Luís André e Amanda.

À minha avó, Raime.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor incondicional durante toda minha vida, pela amizade, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela presença sempre constante mesmo à distância.

Aos meus irmãos, pela amizade, pela cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos: Roberta (Zinha), Luís André (Dedé) e Amanda (Dinha), minha irmã gêmea.

À minha avó Raime, pela presença marcante.

Aos meus sobrinhos, Júlia e Pedro.

Aos meus amigos da Biologia 2004, Patrícia, Tatiana, Mário, Tiago, Alice, Ricardo (Bob), Lucas (Nei), Renan, Kelly e Denise dentre vários outros, pelas alegrias e pela amizade e, em especial, ao Lucas (Panda) pela grande amizade e pela convivência durante mais de quatro anos.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos Júlio, Lygia, Talita, Valdilene, Raphael, Rafael (BQI), Rafael (BIO), Livia, Tatiana, Robson e Caio.

Aos amigos das cianobactérias, Guilherme, Leticia e Sebastião (pioneiros), Mariana e, em especial, ao Rafael, pela dedicação, pela ajuda durante parte da Iniciação Científica e todo o Mestrado, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos mais que amigos, verdadeiros irmãos, Gilberto (Gilbert), Luciano (Fofut), Mateus (Mathias) e Victor (Vitório). Juntos, formamos um grupo, o CSF, mas muito mais do que isso, formamos uma família. Muito obrigado!

Aos eternos amigos do Programa de Educação Tutorial – PET Biologia – Vitor, Lucas (Pará), Felipe, Guilherme e Francisco e aos professores (Tutores) Lino e Lúcio.

Aos companheiros dos demais laboratórios do Departamento de Microbiologia, que de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, professor Antônio Galvão do Nascimento pelo apoio durante esses quase cinco anos de trabalho conjunto, pela amizade e pela confiança.

Aos meus coorientadores, professor Arnaldo Chaer Borges e professora Rosane Maria de Aguiar Euclides, pela ajuda, críticas e sugestões durante a elaboração e a execução do projeto.

Aos membros da banca, professor Marcos Rogério Tótola e professora Maria Cristina Dantas Vanetti.

À Doutora Virgínia Maria Chaves Alves, por todos os momentos de dúvidas, conversas descontraídas, sugestões e pela paciência infinita.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, em especial às professoras Flávia Maria Lopes Passos e Elza Fernandes de Araújo e ao professor Hilário Cuquetto Mantovani.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela imprescindível colaboração.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Microbiologia e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade, pela infra-estrutura e pelo apoio para realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela Bolsa de Mestrado.

BIOGRAFIA

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, filho de Eci Vieira Vaz e de Isma Gomes Marçal Vaz, nasceu no dia 28 de junho de 1986 na cidade de Catalão, GO. Iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004, tendo se graduado em julho de 2008. Em agosto do mesmo ano iniciou o mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – DIFERENCIAÇÃO DE HORMOGÔNIOS EM CIANOBACTÉRIAS	4
1.2 – SISTEMA FOTOSSINTÉTICO, QUALIDADE ESPECTRAL DA LUZ E INTENSIDADE LUMINOSA	7
1.3 – EFEITO DO PADRÃO DE SOBREPOSIÇÃO DE FILAMENTOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DA LUZ	9
1.4 – EFEITO DA QUALIDADE DA LUZ E DA ARQUITETURA DA COLÔNIA SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE HORMOGÔNIOS	11
2 – OBJETIVOS	14
3 – MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 – MICRO-ORGANISMOS	15
3.2 – OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS COM O USO DE SOLUÇÕES DILUÍDAS DE HIPOCLORITO DE SÓDIO	17
3.4 – MÉTODOS DE ANÁLISE	19
3.4.1 – <i>Análise dos padrões morfológicos e de hormogônios</i>	19
3.4.2 – <i>Extração e quantificação de ficobiliproteínas</i>	20
3.4.3 – <i>Extração e quantificação de clorofila a</i>	20
3.4.4 – <i>Determinação de massa seca</i>	21
3.5 – MONTAGENS EXPERIMENTAIS	21

3.5.1 – PRODUÇÃO DE MASSA SECA E CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS EM RESPOSTA A INTENSIDADE LUMINOSA	21
3.5.2 – PRÉ-CULTIVO E EXPOSIÇÃO DE BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIAS A DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS.....	22
3.5.3 – ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE <i>NOSTOC</i> CCLFM XXI A 15 E 60 MMOLES M ⁻² S ⁻¹	22
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 – OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS COM O USO DE SOLUÇÕES DILUÍDAS DE HIPOCLORITO DE SÓDIO	23
4.2 – PRODUÇÃO DE MASSA SECA E CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS EM RESPOSTA A INTENSIDADE LUMINOSA	25
4.2.1 – <i>Isolado Nostoc CCLFM I</i>	25
4.2.2 – <i>Isolado Nostoc CCLFM VIII</i>	26
4.2.3 – <i>Isolado Nostoc CCLFM XXI</i>	27
4.3 – PRÉ-CULTIVO E EXPOSIÇÃO DE BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIAS A DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS.....	32
4.3.1 – <i>Isolado Nostoc CCLFM I</i>	32
4.3.2 – <i>Isolado Nostoc CCLFM VIII</i>	36
4.3.3 – <i>Isolado Nostoc CCLFM XXI</i>	39
4.5 – ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE <i>NOSTOC</i> CCLFM XXI A 15 E 60 MMOLES M ⁻² S ⁻¹	43
4.5.1 – <i>Curva de crescimento de Nostoc CCLFM XXI a 15 μmoles m⁻² s⁻¹</i>	43
4.5.2 – <i>Curva de crescimento de Nostoc CCLFM XXI a 60 μmoles m⁻² s⁻¹</i>	49
5 – CONCLUSÕES	55
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

VAZ, Marcelo Gomes Marçal Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2010. **Diferenciação celular em *Nostoc* spp: efeito da intensidade luminosa e do padrão de sobreposição dos filamentos.** Orientador: Antônio Galvão do Nascimento. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges e Rosane Maria de Aguiar Euclides.

Em isolados do gênero *Nostoc*, a multiplicação das células vegetativas e a diferenciação de algumas células em heterócitos em intervalos regulares é a etapa do ciclo de vida em que ocorre a produção de biomassa. Em outra etapa do ciclo de vida, vários fatores do ambiente podem induzir a diferenciação de hormogônios, filamentos nos quais não ocorre produção de biomassa. A aplicação biotecnológica de cianobactérias pode ser limitada pela intensificação do auto-sombreamento durante o crescimento destas em foto-biorreatores. Em consequência, pode ocorrer diminuição na intensidade e alteração da qualidade espectral da luz que atinge as células. Os objetivos deste trabalho foram: 1) caracterizar a produção de biomassa e de pigmentos por isolados do gênero *Nostoc* cultivados em diferentes intensidades luminosas; 2) analisar o efeito do pré-cultivo e subsequente exposição a diferentes intensidades luminosas sobre os mesmos parâmetros e sobre os processos de diferenciação celular e 3) caracterizar durante o cultivo de *Nostoc* CCLFM XXI em duas intensidades luminosas, a relação das fases de crescimento com os processos de diferenciação celular predominantes. As maiores produções de biomassa foram obtidas a 20, 45 e 75 μ moles

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente em *Nostoc* CCLFM I, VIII e XXI. Em *Nostoc* CCLFM I, apenas a concentração de ficoeritrina variou com a intensidade luminosa, apresentando-se máxima a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e diminuindo com aumentos na intensidade luminosa. As concentrações de pigmentos em *Nostoc* CCLFM VIII não variaram com a intensidade luminosa. As concentrações de ficocianina e aloficocianina, em *Nostoc* CCLFM XXI, variaram com a intensidade luminosa, atingindo um máximo à $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e mantendo-se constantes nas maiores intensidades. O pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposição às baixas intensidades luminosas levou, em *Nostoc* CCLFM VIII e XXI a uma intensa diferenciação de acinetos, o que não ocorreu para *Nostoc* CCLFM I. Quando o pré-cultivo foi realizado a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se, em *Nostoc* CCLFM I e VIII, filamentos com células menores que as células vegetativas, indicativo de diferenciação de hormogônios. *Nostoc* CCLFM XXI quando cultivado a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou intenso padrão de diferenciação de acinetos, ao passo que o cultivo a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou distintos padrões de diferenciação celular nas faixas de parada de produção de biomassa. Nas fases iniciais de cultivo houve predominância de hormogônios, e de acinetos nas fases intermediária e final da curva. Desta forma, há uma relação entre intensidade luminosa e diferenciação celular, sendo que as mais baixas levam à diferenciação de acinetos. No entanto, em maiores intensidades, observa-se tanto diferenciação de hormogônios quanto de acinetos, sendo os primeiros observados na primeira parada de produção de biomassa e os acinetos nas faixas mais tardias de parada, indicando uma sequência na ocorrência destes processos relacionada à disponibilidade de energia luminosa adequada à fotossíntese.

ABSTRACT

VAZ, Marcelo Gomes Marçal Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2010. **Cellular differentiation in *Nostoc* spp: effects of light intensity and pattern of filaments superposition**. Adviser: Antônio Galvão do Nascimento. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Rosane Maria de Aguiar Euclides.

In *Nostoc* isolates, the vegetative cells multiplication and differentiation of some of them in heterocyst is the life cycle phase in which biomass production occurs. In other phase, many environmental changes can trigger hormogonium differentiation, a transient and a non-growth state. The use of cyanobacteria strains in biotechnological processes have been studied for many years, however, the production of biomass is influenced, and can be limited, by the fact that the colonies growth intensify the self-shading. Consequently, changes in light intensity and quality received by cells can occur. The aims of this work were: 1) to characterize biomass and pigments production by *Nostoc* isolates in response to changes in light intensity; 2) to analyze the effect of pre-cultivation and exposure in different light intensities in the same parameters and in cellular differentiation processes; 3) and to relate, for isolate *Nostoc* CCLFM XXI, growth phases to predominant cellular differentiation processes. The greater biomass production was achieved at 20, 45 and 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively in *Nostoc* CCLFM I, VIII and XXI. In *Nostoc* CCLFM I, only phycoerithrin content changed with light intensity, been maximum at 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, decreasing with increasing light

intensities. Pigment contents, in *Nostoc* CCLFM VIII did not vary with light intensities. In *Nostoc* CCLFM XXI phycocyanin and allophycocyanin contents varied with light intensity, reaching a maximum at $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, been constant up to $105 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Biomass pre-cultivated at $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, when exposed to lower light intensities led to an intense akinetes differentiation in *Nostoc* CCLFM VIII and XXI, fact that did not occur in *Nostoc* CCLFM I. When biomass pre-cultivated at $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were exposed to lower light intensities, filaments with smaller cells than vegetative ones were observed, indicating probably, the occurrence of hormogonium differentiation in *Nostoc* CCLFM I and VIII. When cultivated at $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Isolate XXI showed intense akinetes differentiation, and when cultivated at $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ it showed distinct cellular differentiation patterns in phases in which biomass production was not observed. Hormogonia were observed only in the early non-growth phase, while akinetes were observed in middle and late non-growth phases. Therefore, there is relation between light intensity and patterns of cellular differentiation. In lowest light intensities the akinetes differentiation predominates over other differentiation process. However, in higher intensity hormogonia and akinetes were observed, with hormogonia associated with the first non-growth phase and akinetes with middle and late non-growth phase, indicating a sequence in which cellular differentiation occur, probably related with light energy available to photosynthesis.

1 – INTRODUÇÃO

As cianobactérias pertencem ao Domínio Bacteria, apresentando parede celular característico de bactérias gram-negativas. São amplamente distribuídas em diversos ambientes, apresentando adaptações para colonizar habitats desfavoráveis. São todas fotoautotróficas, capazes de realizar fotossíntese oxigênica de forma similar aos fotoautotróficos eucarióticos, sendo que algumas podem apresentar metabolismo heterotrófico. Nesse caso, são designadas de mixotróficas. Muitas espécies de cianobactérias também realizam o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (WOESE, 1985).

Como os primeiros organismos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica, as cianobactérias apresentam papel fundamental no processo de evolução da vida na Terra. A fotossíntese oxigênica requer a ação coordenada dos dois fotossistemas (PSI e PSII) para gerar o potencial eletroquímico necessário à extração de elétrons da água, produzindo o oxigênio (FLORES e HERRERO, 2010). A produção de oxigênio por cianobactérias foi responsável pela oxidação da atmosfera terrestre há 2,4-2,2 bilhões de anos; também contribuíram substancialmente para a produção primária durante a Era Proterozóica e são, atualmente, importantes agentes nos ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio (KNOLL, 2008). Esses micro-organismos formam um grupo filogeneticamente coerente, o qual também inclui os cloroplastos (GIOVANNONI et al., 1988; SHI e FALKOWSKI, 2008). No entanto, há grande diversidade morfológica

dentro do grupo, existindo tanto cianobactérias unicelulares quando filamentosas, além da presença, em algumas cianobactérias filamentosas, de tipos celulares diferenciados. Podem ser encontrados até quatro tipos celulares em alguns isolados de cianobactérias: as células vegetativas dos filamentos maduros, além de acinetos, heterócitos e células de hormogônios (FLORES e HERRERO, 2010).

Os acinetos são células similares a esporos, frequentemente mais largas que as células vegetativas, apresentando-se com granulação conspícua (MEEKS et al., 2002; ARGUETA et al., 2006) e que se diferenciam a partir destas, em resposta a certas condições ambientais, como limitação de luz e desnutrição por fosfato (ADAMS e DUGGAN, 1999). Tais células apresentam atividade metabólica reduzida, acumulam glicogênio como reserva de carbono e cianoficina como de nitrogênio, além de uma parede celular espessada, semelhante à dos heterócitos (LEGANÉS, 1994; FLORES e HERRERO, 2010). A germinação dos acinetos ocorre em condições favoráveis e que são permissíveis ao crescimento da cianobactéria, frequentemente envolvendo a liberação de um pequeno filamento deslizante, através de um poro no envoltório celular do acineto. No entanto, algumas espécies, incluindo *Nostoc punctiforme*, parecem degradar toda a parede celular do acineto, durante a liberação do filamento jovem (dados não publicados de MEEKS, citado por ADAMS e DUGGAN, 1999).

Os heterócitos são os sítios de ocorrência da fixação biológica de nitrogênio em cianobactérias filamentosas heterocitadas e fisiologicamente, podem ser considerados como receptores de carbono reduzido e fontes de nitrogênio reduzido dentro dos filamentos (MEEKS et al., 2002). A síntese de certos sistemas enzimáticos envolvidos com a fotossíntese e com a assimilação de CO₂, como o PSII e a ribulose biscofosfato carboxilase, é reprimida, ao passo que a nitrogenase e o consumo respiratório de O₂ são induzidos e aumentados (WOLK et al., 1994). Nas células vegetativas ocorrem os fluxos cíclico e acíclico de elétrons durante a fotossíntese, resultando na síntese de ATP e de NADPH₂, os quais são usados no ciclo de Calvin. Nos heterócitos ocorre a fotofosforilação cíclica, com a geração de ATP, e a fixação biológica de N₂. Os carboidratos são translocados das células vegetativas para os heterócitos e neles são oxidados pela via das pentoses fosfato, gerando NADPH₂ (WOLK, 1968; MEEKS et al., 2002; FLORES e HERRERO, 2010). Portanto, a contigüidade entre células vegetativas e heterócitos é fundamental para a continuação dos processos de fixação autotrófica de CO₂ e de fixação de N₂.

Os hormogônios são identificados como filamentos móveis e relativamente pequenos, que não apresentam heterócitos, com células menores e de forma distinta das células dos filamentos vegetativos. Constituem um estado transiente, no qual não há produção de biomassa e nem crescimento (TANDEAU DE MARSAC, 1994; MEEKS et al., 2002). O termo ‘hormogônio’ é normalmente usado por ficologistas para designar pequenos tricomas móveis liberados de tricomas imóveis envoltos por bainhas. O seu conceito foi ampliado por RIPPKA et al. (1979) para designar tricomas móveis ou imóveis que são frequentemente vacuolados, sem apresentar heterócitos (TANDEAU DE MARSAC, 1994).

Os hormogônios ocorrem, normalmente, no ciclo de vida de vários gêneros de cianobactérias filamentosas. Eles participam da dispersão da colônia a curtas distâncias em virtude da sua motilidade por deslizamento ou por flutuação na coluna de água, quando apresentam vesículas de gás. Esses filamentos diferenciados também estão envolvidos no processo de simbiose entre cianobactérias e plantas, sendo que algumas substâncias liberadas pelas plantas induzem a diferenciação de hormogônios (TANDEAU DE MARSAC, 1994; MEEKS e ELHAI, 2002; MEEKS et al., 2002).

A aplicação de cianobactérias que realizam a fixação biológica de nitrogênio como biofertilizantes, em solos alagados, tem sido amplamente estudada, pois este processo pode substituir, parcialmente, a adição de fertilizantes nitrogenados, e reduzir custos na produção (ROGER e KULASOORIYA, 1980; CHOUDHURY e KENNEDY, 2004). A adição desses organismos pode resultar em aumento de 14 a 17 % na produtividade de grãos de arroz (ROGER e WATANABE, 1986), além de aumentar a disponibilidade de fósforo pela excreção de ácidos orgânicos (ROGER e KULASOORIA, 1980). Aplicações biotecnológicas de cianobactérias incluem, a produção de biomassa para a alimentação e a produção de metabólitos de interesse industrial, como o H₂, as ficobiliproteínas e exopolissacarídeos, e biocombustíveis (ANGERMAYR, 2009). Ao mesmo tempo, algumas espécies também podem produzir cianotoxinas, que causam sérios problemas para a saúde pública quando há um aumento exagerado das populações destes organismos em lagos, rios ou reservatórios de água (OLIVERA-RAMÍRES et al., 2000; MORENO et al., 2003; PULZ e GROSS, 2004; ESPER et al., 2006; RUPPRECHT et al., 2006; PAERL, 2008).

Em cianobactérias, a razão carbono/nitrogênio (C/N) dentre as espécies que são capazes de fixar N₂, é de importância uma vez que a concentração de alfa ceto-glutarato é um dos sinais intracelulares da disponibilidade de fontes de carbono e de nitrogênio

(ZHANG et al., 2006). Em biorreatores, a produção de biomassa desses microorganismos em biorreatores pode ser influenciada e limitada pelo fato de que o desenvolvimento das colônias intensifica o processo de auto-sombreamento (BERBEROGLU et al., 2007; GIDUGU, 2007). Em conseqüência, pode ocorrer diminuição da intensidade e alteração da qualidade espectral da luz que atinge as células. Para a operação destes biorreatores, portanto, é fundamental entender como tais fatores interferem na taxa de crescimento, no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e nos processos de diferenciação celular.

1.1 – Diferenciação de hormogônios em Cianobactérias

A diferenciação de hormogônios é um importante estágio do ciclo de vida de inúmeras espécies de cianobactérias, pois, apesar de não produzirem biomassa, representam um estágio transiente e que permite a dispersão da colônia. Tal processo está intimamente relacionado com a possibilidade de explorar melhor o ambiente no qual os diferentes isolados de cianobactéria se desenvolvem. No entanto, pode representar um obstáculo ao uso dessas cianobactérias em processos biotecnológicos.

A literatura registra uma série de fatores ambientais, bióticos e abióticos, que levam à diferenciação de hormogônios. Sugere-se que as cianobactérias seriam capazes de detectar tais alterações ambientais, por meio de proteínas sensoriais pré-existentes, capazes de sinalizar uma condição de estresse para a célula (MEEKS e ELHAI, 2002). Tais fatores podem ser concentração de sal e de nutrientes (HERDMAN e RIPPKA, 1988), qualidade luminosa (DAMERVAL et al., 1991; CAMPBELL et al., 1993; NASCIMENTO, 1999), intensidade luminosa (LI et al., 2005) e interações simbióticas (CAMPBELL e MEEKS, 1989), dentre outros.

O primeiro registro de que a transferência de colônias de *Nostoc verrucosum* para um frasco contendo água, induzia a produção de filamentos jovens e capazes de deslizar dentro de 2 a 3 dias, é atribuído a Thuret, em 1844 (TANDEAU DE MARSAC, 1994). Outros pesquisadores assumem que células de cianobactérias em fase estacionária de crescimento sintetizam e liberam uma substância inibidora da diferenciação de hormogônios. Por isso afirmam que a transferência para um novo meio de cultura pode induzir essa diferenciação, desde que o inóculo não esteja em

concentração 5-10 % maior do que o volume do meio (LAZAROFF, 1973; RIPPKA e HERDMAN, 1985; HERDMAN e RIPPKA, 1988).

A remoção de NaNO_3 do meio de cultura induz a diferenciação de hormogônios que apresentam vesículas de gás em *Nostoc muscorum* (ARMSTRONG et al., 1983) e em *Calothrix* PCC 7601 e PCC 7504 (HERDMAN e RIPPKA, 1988). No primeiro caso, a substituição do NaNO_3 por concentrações equimolares de NaCl , KCl ou KNO_3 previne o processo de diferenciação, ao passo que glicose e sacarose não. Tais resultados indicam que a indução da diferenciação de hormogônios em *Nostoc muscorum* não resulta da desnutrição por nitrogênio, e que soluções iônicas, diferentemente das não-iônicas, previnem esta indução (ARMSTRONG et al., 1983). Em *Calothrix* PCC 7601, a substituição de NaNO_3 por concentrações equimolares de NaCl não preveniu a formação de hormogônios, ao passo que um curto período (2 horas) de desnutrição por nitrogênio é suficiente para iniciar o processo de diferenciação de hormogônios (HERDMAN e RIPPKA, 1988). Desta maneira, a resposta apresentada por *Calothrix* PCC 7601 aparentemente resulta de rápidas mudanças no metabolismo de nitrogênio, mais do que alterações osmóticas.

Em isolados de *Calothrix* sp., culturas deficientes em ferro produzem hormogônios após a adição deste elemento ao meio (DOUGLAS et al., 1986; TANDEAU DE MARSAC, 1994). De modo similar, em vários isolados heterocitados cultivados sob limitação de fósforo, houve indução da diferenciação de hormogônios após sua adição (WOOD et al., 1986). Em diversos isolados de *Calothrix* sp., a parada na produção de hormogônios parece estar relacionada com a indução da atividade de fosfatases, indicando que flutuações nas concentrações de fosfato podem alternativamente levar a diferenciação de hormogônios ou a produção de fosfatases (ISLAM e WHITTON, 1992).

A qualidade espectral da luz incidente afeta enormemente a diferenciação de hormogônios, sendo, talvez o fator mais bem entendido como indutor da formação de hormogônios. A transferência de colônias de *N. muscorum* A (*Nostoc* sp., isolado PCC 7906) de um ambiente sem luz para um de luz vermelha causou a diferenciação de hormogônios independentemente da presença ou ausência de açúcar no meio de cultura LAZAROFF (1966 e 1972, citado por LAZAROFF, 1973). DAMERVAL et al. (1991) e CAMPBELL et al. (1993) levantaram importantes dados relacionados à participação das luzes verde e vermelha no processo de diferenciação e sua relação com o balanço redox na cadeia transportadora de elétrons fotossintética em *Calothrix* PCC 7601.

NASCIMENTO (1999), por sua vez, introduziu o cultivo de isolados do gênero *Nostoc* que apresentavam diferentes arquiteturas de colônia sob ambientes de luz verde ou vermelha contínua, e os efeitos dessas duas variáveis no processo de diferenciação de hormogônios.

Proteínas são diferencialmente sintetizadas em células de hormogônios, a maioria predominantemente associadas à superfície celular, função na motilidade, reconhecimento celular e adesão (KLINT et al., 2006). Durante a diferenciação de hormogônios em *Nostoc punctiforme* PCC 79102, 1.827 genes foram diferencialmente expressos quando comparados com as células vegetativas, o que corresponde a aproximadamente 25 % do genoma. Cerca de metade dos genes que foram menos expressos nos hormogônios codifica para proteínas envolvidas no metabolismo central e aproximadamente 22 % dos genes mais expressos durante o processo de diferenciação codificam proteínas envolvidas em funções de adaptação, incluindo transdução de sinais, taxia e motilidade (CAMPBELL et al., 2007). Esses dados reforçam a função dos hormogônios como unidades dispersivas que, uma vez formadas, são liberadas pela fragmentação dos filamentos parentais (FLORES e HERRERO, 2010).

Os hormogônios também se caracterizam por serem as unidades infectivas durante o estabelecimento de relações simbióticas entre cianobactéria filamentosas heterocitadas e plantas (TANDEAU DE MARSAC, 1994; MEEKS e ELHAI, 2002), sendo que alguns metabólitos liberados por algumas plantas podem induzir a diferenciação de hormogônios (MEEKS e ELHAI, 2002).

Metabólitos produzidos por algumas plantas hospedeiras agem como fatores de indução da diferenciação de hormogônios (da sigla em inglês HIFs). Plantas do gênero *Gunnera* liberam um pequeno peptídeo na mucilagem secretada por glândulas radiculares, que servem como “moléculas-guia” para a infecção por cianobactérias (RASMUSEN et al., 1994). Os HIFs são também produzidos pelo hospedeiro *Anthoceros punctatus* (CAMPBELL e MEEKS, 1989), no entanto a identificação e caracterização molecular desses fatores não está completa. Fatores de repressão da indução de hormogônios (da sigla em inglês HRFs), que contrapõem a diferenciação de hormogônios, também têm sido identificados. Existem evidências experimentais da ocorrência de pelos menos três passos no processo de sinalização química e estabelecimento da associação entre *Nostoc punctiforme* e *A. punctatus* (CAMPBELL et al., 2003). Inicialmente, plantas de *Anthoceros* em condições de limitação por nitrogênio secretam HIFs (CAMPBELL e MEEKS, 1989), e em sequência, os

hormogônios são atraídos por substâncias químicas liberadas pelas plantas, e se aderem aos tecidos dos gametófitos, colonizando as cavidades simbióticas (KNIGHT e ADAMS, 1996). Por fim, após a colonização, HRF é produzido dentro da cavidade simbiótica. Como a atividade de HRF é dominante sobre a de HIF, pressupõe-se que sua liberação induza a mudança nos processos de diferenciação celular, por reprimir a diferenciação de hormogônios e induzir a diferenciação de heterócitos, bem como a atividade da nitrogenase (COHEN e MEEKS, 1997).

1.2 – Sistema fotossintético, qualidade espectral da luz e intensidade luminosa

Em cianobactérias há dois tipos de sistema-antena, um constituído pelas ficobiliproteínas e o outro constituído por moléculas de clorofila *a* associadas a complexos protéicos integrais de membrana (GLAZER e MELIS, 1987). As ficobiliproteínas estão organizadas em uma estrutura chamada ficobilissomo (PBS), a qual se encontra fisicamente ligada à membrana do tilacóide. Essa estrutura em contato com o PSII forma o complexo PBS-PSII, para o qual transfere a maior parte da sua energia de excitação. O sistema antena de clorofila *a* encontra-se em ambos os fotossistemas, porém a quantidade de moléculas de clorofila *a* associada ao PSI é maior do que ao PSII (GROSSMAN et al., 1993; BALD et al., 1996). As principais ficobiliproteínas são a ficoeritrina (Pe), a ficocianina (Pc) e a aloficocianina (Ap). Ficoeritrina absorve energia luminosa na região do verde (máximo de absorção a 565 nm), ficocianina absorve na região do vermelho (máximo de absorção a 625 nm) e aloficocianina absorve energia em luz vermelha (máximo de absorção a 650 nm) (GLAZER, 1981).

Como consequência de mudanças na qualidade espectral da luz, ocorrem ajustes rápidos na distribuição desta entre os fotossistemas, as “transições de estado” (GLAZER et al., 1994; MULLINEAUX, 1994, BALD et al., 1996). Células de *Calothrix* PCC 7601 em condições adaptadas à luz vermelha encontravam-se no “estado 1”, no qual a transferência de energia do PBS-PSII para o PSI é pequena (CAMPBELL, 1996). Por outro lado, as adaptadas à luz verde estavam no “estado 2”, no qual ocorre uma intensa transferência de energia de excitação do PBS-PSII para o PSI. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar esta transferência de energia luminosa, por exemplo, resultante do contato físico parcial do PBS com ambos os fotossistemas,

ou da transferência do excesso de energia de excitação pelo sistema antena de clorofila *a* (GLAZER et al., 1994; MULLINEAUX, 1994, BALD et al., 1996).

As cianobactérias são classificadas em três grupos, de acordo com as variações de composição de ficobiliproteínas em função da qualidade de luz. No Grupo 1, a composição relativa de Pc e Pe não é alterada de acordo com a qualidade da luz; no Grupo 2, apenas a síntese de Pe é estimulada sob luz verde, e no Grupo 3, a síntese de Pe é estimulada sob luz verde e a síntese de Pc quando sob luz vermelha. As cianobactérias do Grupo 3 têm quantidades de Pc e Pe variáveis, em função da composição relativa de radiação verde e vermelha à qual estão expostas. A alteração na composição relativa de Pc e de Pe nos organismos do Grupo 3 em função da qualidade espectral da luz é chamada Adaptação Cromática Complementar (CCA) (TANDEAU de MARSAC, 1977).

As concentrações de ficobiliproteínas e de clorofila *a* também variam com a intensidade luminosa (WYMAN e FAY, 1986; SENDERSKY et al., 2005). Em determinada faixa de aumento de intensidade luminosa, não há modificação do conteúdo de pigmentos por unidade de célula. No entanto, em intensidades acima desta faixa, há um declínio deste conteúdo. A diminuição da concentração de ficobiliproteínas em maiores intensidades luminosas é o resultado de uma menor taxa de síntese, e de um aumento na taxa de degradação das ficobiliproteínas já existentes. Tais mudanças qualitativas e quantitativas nas taxas de síntese de pigmentos em maiores intensidades parecem fazer parte de um mecanismo global que permite o crescimento, em condições que poderiam favorecer a foto-oxidação da clorofila *a* (WYMAN e FAY, 1986).

Durante fases de crescimento onde há limitação de luz, o declínio na quantidade de pigmentos fotossintéticos por células em razão dos aumentos na irradiância, é uma função da relativa baixa taxa de síntese de ficobiliproteínas e de clorofila *a*, comparada à taxa de divisões celulares. Uma vez atingida a taxa máxima de crescimento, no entanto, reduções adicionais na quantidade de pigmentos fotossintéticos por células em maiores intensidades são resultado direto ou do declínio na taxa de síntese, quando a taxa máxima de crescimento é mantida, ou do declínio de taxa de síntese e de taxa de crescimento (WYMAN e FAY, 1986).

Fatores ambientais que definem uma menor taxa fotossintética, como baixas temperaturas e a carência de algum nutriente mineral, também resultam em diminuição da concentração de ficobiliproteínas. De forma que a absorção de energia luminosa pelo

complexo PBS-PSII é controlada de maneira a não resultar em uma absorção excessiva de energia (WYMAN e FAY, 1986).

A taxa de crescimento de cianobactérias, também varia em resposta à intensidade luminosa. No geral, em uma faixa inicial os aumentos de intensidade luminosa levam a aumentos na taxa de crescimento, sendo que após essa faixa, há uma estabilização ou mesmo uma queda da taxa de crescimento, de acordo com a espécie (WYMAN e FAY, 1986). A intensidade luminosa na qual a taxa de crescimento foi máxima variou entre as diferentes espécies analisados por WYMAN e FAY (1986): *Gloeotrichia echinulata* CC1 apresentou máxima taxa de crescimento a $20 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo mantida estável em maiores intensidades – até $184 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$; para *Microcystis aeruginosa* 7806, *Oscillatoria redekei*, *Anabaena solitaria*, e *A. circinalis* a máxima taxa de crescimento foi atingida a $50\text{-}60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em estudo conduzido com *M. aeruginosa* UV-027 a taxa de crescimento aumentou com o aumento de intensidades variando de 20 a $565 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem atingir uma faixa de saturação (RAPS, et al., 1983). *Nostoc commune* requereu intensidade de $33 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para atingir máxima taxa de crescimento e para máxima produção de biomassa (BRIONES E MARTINEZ-GROSS, 1994). Já *Spirulina platensis* alcançou taxa de crescimento máxima quando cultivada em intensidade luminosa maior ou igual a $465 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, até $1500 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (OLAIZOLA e DUERR, 1990).

A intensidade luminosa pode afetar também a diferenciação de hormogônios. Em *Nostoc sphaeroides* cultivado sob intensidades luminosas de 0 a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferenciação foi de 100 % em 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo essas intensidades caracterizadas como intermediárias (LI et al., 2005). No entanto, os autores não apresentaram uma possível relação de causa/efeito entre intensidade luminosa e diferenciação de hormogônios.

1.3 – Efeito do padrão de sobreposição de filamentos sobre as características da luz

Em isolado do gênero *Nostoc*, a multiplicação das células vegetativas e a diferenciação de algumas células em heterócitos, em intervalos regulares, é a etapa do ciclo de vida em que ocorrem a fixação biológica de nitrogênio e a fotossíntese, possibilitando a produção de biomassa (MEEKS et al., 2002). Os heterócitos são diferenciados em condições de maior limitação de nitrogênio, o que explica a sua

diferenciação em regiões mais distantes de heterócitos previamente diferenciados em um filamento (MEEKS e ELHAI, 2002, ZHANG et al., 2006). Este crescimento resulta na formação de colônias de arquitetura e tamanho variável, dependendo da espécie e das condições de cultivo. Os filamentos podem ser levemente ou fortemente retorcidos, frouxamente ou fortemente emaranhados uns em relação aos outros dentro da colônia (DESIKACHARY, 1959, KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS, 1989).

Na etapa do ciclo de vida onde há intensa produção de biomassa, a sobreposição dos filamentos pode causar uma diminuição progressiva da intensidade de luz, bem como uma filtração seletiva da luz ao longo das diferentes camadas dentro da colônia (JORGENSEN et al., 1987, PLOUG et al., 1993, PRUFERT-BEBOUT et al., 1993, ROUG e DOMINY, 1994). Sob intensidades luminosas baixas ($30 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$), em razão da filtração seletiva da luz, uma maior absorção na região de 625 nm relativa à observada a 680 nm causou um enriquecimento da luz na região de 680 nm ao longo de um padrão artificial de auto-sombreamento em *Synechococcus* sp. 6301 (ROUG e DOMINY, 1994). A tendência oposta foi observada quando se caracterizou os espectros de absorção de luz de suspensões de células intactas de cianobactérias crescendo a 55-65 e a $500 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (JORGENSEN et al., 1987; AGUSTÍ e PHILIPS, 1992; PRUFERT-BEBOUT et al., 1993). Nesses casos, os autores observaram uma maior absorção na região de 680 nm. Possivelmente, as diferenças no espectro de absorção citadas sejam causadas pelas diferenças na relação ficobiliproteínas/clorofila *a*, a qual é maior em menores intensidades luminosas.

Em outra etapa do ciclo de vida, vários fatores do ambiente podem induzir um processo de diferenciação celular em regiões do filamento contendo conjuntos de células vegetativas entre dois heterócitos ou em outras regiões, formando os hormogônios (HERDMAN e RIPPKA, 1988, CAMPBELL e MEEKS, 1989, CAMPBELL et al., 1993, CAMPBELL, 1994).

O desenvolvimento do hormogônio recém formado em um filamento jovem é desencadeado de 72 a 96 horas após o início da diferenciação do hormogônio em *Calothrix* ATCC 7601 (DAMERVAL et al., 1991). Inicialmente, diferenciam-se os heterócitos terminais, sendo reiniciada a fixação de nitrogênio atmosférico e a produção de biomassa. A diferenciação dos heterócitos intercalares é reiniciada posteriormente, o que resulta na formação de uma colônia jovem característica de cada linhagem (DAMERVAL et al., 1991; TANDEAU de MARSAC e HOUMARD, 1988). Portanto, no início do desenvolvimento, esta colônia jovem crescerá na ausência dos efeitos de

atenuação da intensidade da luz e de filtração seletiva da luz, característicos da colônia original de onde é proveniente. Em fases adiantadas do desenvolvimento, a sobreposição dos filamentos agrava novamente os efeitos acima citados, podendo gerar um novo ciclo de diferenciação de hormogônios.

Modelos têm sido propostos para explicar o efeito da atividade celular e das condições de cultivo na diferenciação celular, especialmente de heterócitos. Tais modelos levam em consideração, principalmente, o efeito do auto-sombreamento sobre a penetração da luz em fotobiorreatores, além de analisar eficiência de fixação de nitrogênio e taxa fotossintética (PINZON-GAMEZ, 2006).

1.4 – Efeito da qualidade da luz e da arquitetura da colônia sobre a diferenciação de hormogônios

Cianobactérias apresentam um sistema de endomembranas, os tilacóides, no qual localiza-se uma cadeia transportadora de elétrons mista (fotossintética e respiratória) (TRUBITSIN et al., 2005, PAUMANN et al., 2004). Nos tilacóides, os pigmentos fotossintéticos do fotossistema I (PSI) e do fotossistema II (PSII) absorvem energia luminosa, impulsionando um fluxo acíclico de elétrons no qual a água é o doador primário de elétrons e o NADP^+ é o acceptor final de elétrons, adicionalmente ao fluxo cíclico de elétrons. Alguns componentes da cadeia transportadora de elétrons fotossintética (CTEF) são compartilhados com a cadeia transportadora de elétrons respiratória (CTER). Desta forma, elétrons provenientes de coenzimas reduzidas (NAD(P)H), gás hidrogênio (H_2) ou succinato, fluem conjuntamente com os elétrons provenientes do PSII através das plastoquinonas (PQ), do Cit b_6f e da plastocianina, sendo finalmente doados para o PSI ou para a oxidase terminal, sendo que esses eventos resultam na redução de NADP^+ ou O_2 , respectivamente.

CAMPBELL et al. (1993) estudaram a relação entre a composição do PBS e a diferenciação de hormogônios em linhagens de *Calothrix* PCC 7601, que apresentavam adaptação cromática complementar (CCA) do grupo 3 (TANDEAU DE MARSAC, 1977). Culturas pré-cultivadas em luz verde (PBSs ricos em Pe) ou sob luz vermelha (PBSs ricos em Pc) foram subsequentemente expostas ao mesmo tipo de luz ou a um tipo oposto de luz. As maiores porcentagens de diferenciação de hormogônio foram observadas em culturas contendo PBSs ricos em Pe (pré-cultivas em luz verde), que

foram subsequentemente expostas à luz vermelha. Estes resultados sugeriram que a diferenciação de hormogônios foi intensamente induzida quando a luz foi absorvida principalmente ou somente pelo PSI (luz vermelha excita preferencialmente o PSI, uma vez que é enriquecida em comprimentos de onda maiores ou iguais a 680 nm). Essa absorção preferencial de energia luminosa pelo PSI leva a uma oxidação dos componentes da cadeia transportadora de elétrons. A exposição à luz verde, diferentemente, inibiu a diferenciação, já que preferencialmente excita o PSII (complexo PBS-PSII), reduzindo os intermediários da cadeia transportadora de elétrons.

O 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (DCMU ou Diuron[®]) é capaz de bloquear a transferência de elétrons do PSII para o *pool* de plastoquinonas, levando à oxidação da CTE. Na presença deste composto verificou-se a indução da diferenciação de hormogônios, sendo que esta evidência permitiu a conclusão de que a diferenciação de hormogônios é induzida quando o *pool* de plastoquinonas está oxidado (CAMPBELL, 1993).

Sabe-se que a filtração seletiva da luz pode causar um enriquecimento da luz em comprimentos de onda maiores que 680 nm nas camadas internas da colônia (ROUG e DOMINY, 1994). Portanto, é plausível supor que nas camadas internas da colônia, a luz excita principalmente PSI, resultando em um estado de oxidação do *pool* de plastoquinonas. Luz de comprimentos de onda maiores que 680 nm não excita ficobiliproteínas (GLAZER et al., 1994), o que torna inviável o crescimento das cianobactérias neste tipo de luz (JORGENSEN et al., 1987). Possivelmente, a indução da diferenciação de hormogônios quando as plastoquinonas estão oxidadas, seja uma estratégia de fuga de um ambiente de luz, característico do interior da colônia, que é inadequado para a fotossíntese e, conseqüentemente, para a produção de biomassa.

LAZARROF e VISHNIAC (1973) mostraram uma relação entre padrão de arquitetura das colônias e diferenciação de hormogônios em alguns isolados do gênero *Nostoc*. Esses autores observaram a ocorrência do processo de diferenciação de hormogônios em seis linhagens que formaram colônias com padrão intenso de agregação dos filamentos. Entretanto, não observaram este processo em outras três linhagens com um padrão mais disperso de organização dos filamentos na colônia.

Essa relação entre arquitetura da colônia e o processo de diferenciação de hormogônios também foi verificada por NASCIMENTO (1999). Dos três isolados estudados pelo autor, dois apresentavam alto padrão de sobreposição dos filamentos, nos quais se constatou uma maior tendência de diferenciação de hormogônios, quando

comparados com o isolado cujas colônias apresentaram baixo padrão de sobreposição. NASCIMENTO (1999) então propôs que a diferenciação de hormogônios nos isolados com maior padrão de sobreposição de filamentos seria devido à filtração seletiva da luz pelas camadas externas de células. Desta forma, a luz que chega ao interior da colônia excita preferencialmente o PSI, causando a oxidação da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, a diferenciação de hormogônios.

1.5 – Hipótese

A diferenciação de hormogônios varia com a intensidade luminosa, em função dos efeitos desta sobre a taxa de crescimento e sobre o conteúdo de pigmentos, sendo esta relação dependente da arquitetura da colônia, pois quanto maior o padrão de sobreposição de filamentos na colônia, mais intensa é a filtração seletiva da luz.

2 – OBJETIVOS

Caracterizar a produção de biomassa e de pigmentos por isolados do gênero *Nostoc* cultivados em diferentes intensidades luminosas;

Analisar o efeito do pré-cultivo e subsequente exposição a diferentes intensidades luminosas sobre os mesmos parâmetros e sobre os processos de diferenciação celular;

Caracterizar durante o cultivo de *Nostoc* CCLFM XXI em duas intensidades luminosas, a relação das fases de crescimento com os processos de diferenciação celular predominantes.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos e as análises microscópicas foram conduzidas no Laboratório de Associações Micorrízicas, ambos vinculados ao Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa e localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO.

3.1 – Micro-organismos

Para a realização deste trabalho foram selecionados três isolados do gênero *Nostoc* de origem edáfica, pertencentes à Coleção de Cianobactérias do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (CCLFM): I, VIII e XXI.

A seleção desses isolados foi baseada nas seguintes características morfológicas: padrão de auto-agregação quando cultivados em meio líquido, aspecto da colônia em meio sólido (crescimento globoso e séssil ou difuso) e quantidade de exopolissacarídeos produzidos. *Nostoc* CCLFM I, quando cultivado em meio sólido apresenta crescimento globoso, com formação de grandes colônias imersas em grande quantidade de exopolissacarídeos. Quando cultivado em meio líquido, apresenta colônias bem delimitadas, mas de tamanho reduzido, apresentando-se como uma suspensão celular

bastante homogênea, com padrão de auto-agregação inexistente, provavelmente, pela grande quantidade de exopolissacarídeos presente entre os filamentos (Figura 1). *Nostoc* CCLFM VIII, quando cultivado em meio sólido apresenta colônias muito bem delimitadas, pequenas (indicando baixa produção de biomassa) e sem regiões de espalhamento ao redor das colônias (indicativo de baixa ou de nenhuma produção de hormogônios, ou de baixa motilidade dos mesmos). Microscopicamente, apresenta padrão intenso de auto-agregação, sendo os filamentos bastante sobrepostos uns em relação aos outros (Figura 1). *Nostoc* CCLFM XXI, em meio sólido apresenta colônias pequenas e compactas, sendo observadas regiões de espalhamento nos bordos das colônias (indicativo de diferenciação de hormogônios, segundo MEEKS et al., 2002). Microscopicamente, o padrão de sobreposição dos filamentos é bastante intenso, também apresentando alto padrão de auto-agregação (Figura 1).

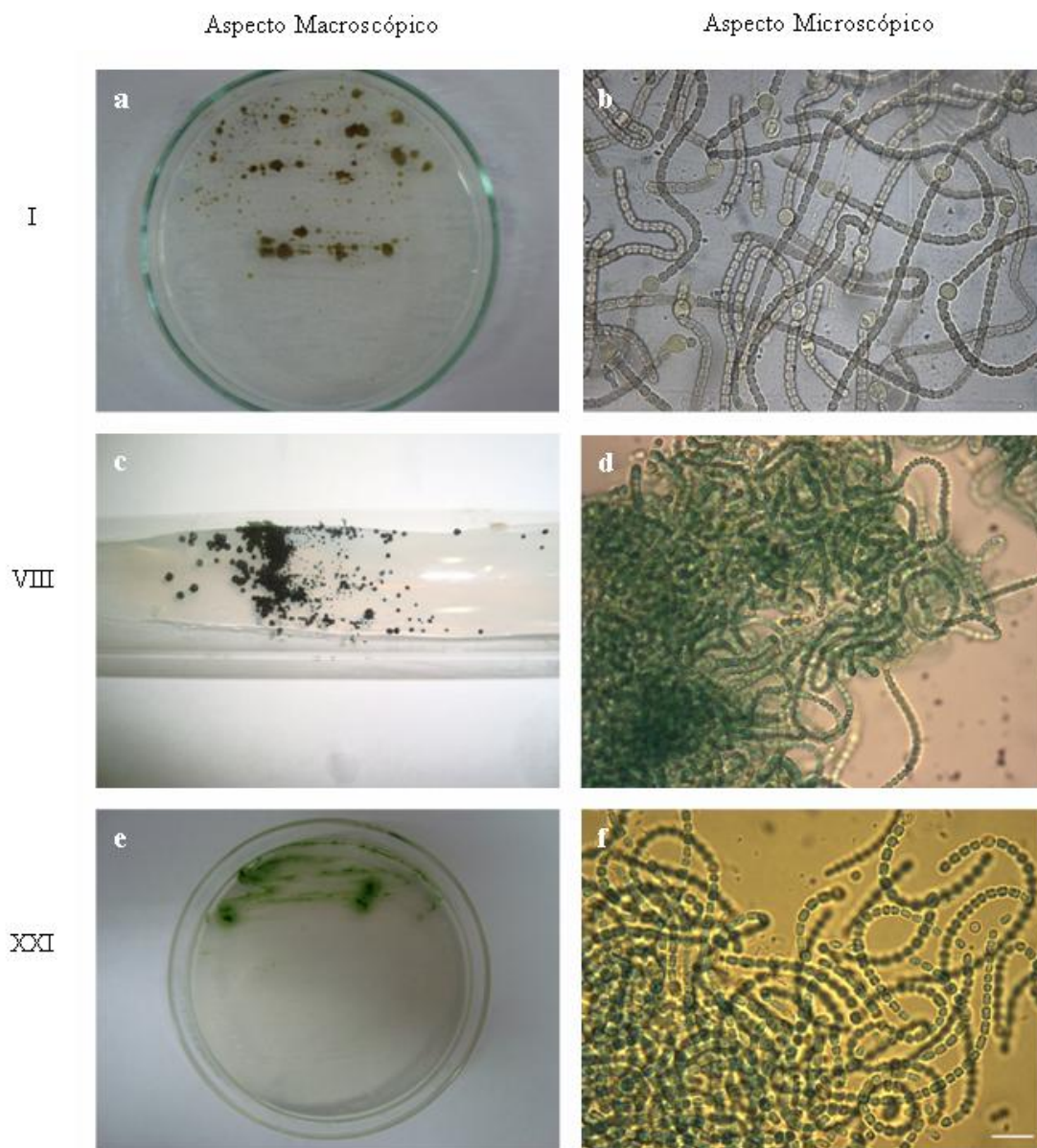


Figura 1. Aspectos macroscópicos (crescimento em meio sólido) e microscópicos de colônias dos Isolados *Nostoc* CCLFM I (**a e b**), *Nostoc* CCLFM VIII (**c e d**) e *Nostoc* CCLFM XXI (**e e f**). Em **a e e**, crescimento em placa; em **c**, crescimento em tubo contendo meio inclinado.

3.2 – Obtenção de culturas puras com o uso de soluções diluídas de hipoclorito de sódio

O método usado para a obtenção de isolados puros se baseou na remoção da camada de exopolissacarídeos de agregados celulares, formados predominantemente por acinetos, com o uso de tampão de extração de exopolissacarídeos (FIORE et al., 2000), seguido de tratamento com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. O tampão

de remoção de exopolissacarídeos usado contém tris-HCl pH 8,0, EDTA 5 mM e NaCl 50 mM.

No procedimento realizado com *Nostoc* CCLFM I, antes do tratamento com soluções diluídas de hipoclorito de sódio, foram obtidas as seguintes suspensões de acinetos: uma sem extração de exopolissacarídeos, sendo os 5 mL iniciais de amostra apenas centrifugados uma vez, para retirada do meio de cultura, e o precipitado ressuspenso em 5 mL de salina 0,85 %; outra, submetida a uma etapa de remoção de exopolissacarídeos; e uma última, submetida a duas etapas de remoção de exopolissacarídeos. Suspensões de acinetos de *Nostoc* CCLFM VIII e de *Nostoc* CCLFM XXI foram submetidas a duas etapas de remoção de exopolissacarídeos.

Frascos de 50 mL de volume contendo 20 mL de cultura rica em acinetos foram submetidos a fluxos de seringa e ultra-som de banho, por tempo necessário, até a obtenção de uma suspensão homogênea de acinetos livres. Dessa suspensão homogênea de acinetos, foram coletados 5 mL, sendo adicionado a ela um volume igual de tampão de extração de exopolissacarídeos. Esse conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 15.000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Essa etapa de remoção da camada de exopolissacarídeos foi repetida por mais uma ou duas vezes e o precipitado final ressuspenso em 5 mL de salina 0,85 %. Alíquotas homogêneas dessa suspensão salina foram, então, usadas para o tratamento com hipoclorito de sódio analítico VETEC[®]. O tratamento foi realizado em sistema de filtração a vácuo acoplado a membrana de ultra-filtração de 0,22 µm, sendo usadas concentrações de 1, 2 e 3 % de hipoclorito de sódio por um tempo de 10 segundos. Após o tratamento, a suspensão de acinetos presente na superfície da membrana de filtração foi retirada com o auxílio de uma alça de repicagem, sendo o material estriado em placa contendo meio BG11 (ALLEN e STANIER, 1968, modificado por PONTES 1988) sólido (ágar 1,5 %).

Ao final de sete dias de incubação, ou tempo necessário ao surgimento de colônias visíveis, a 30 µmoles m⁻² s⁻¹ e a temperatura ambiente, foram feitas réplicas das amostras em placas contendo meio ágar-nutriente, para se analisar a presença de contaminantes heterotróficos. Essas placas foram incubadas em estufa a 30 °C, por até quatro semanas, de forma semelhante ao descrito por FERRIS e HIRSCH (1991), sendo analisadas de 24 em 24 horas.

3.3 - Preparo dos inóculos para a montagem dos experimentos

As culturas para obtenção do pré-inóculo e do inóculo de cada isolado foram mantidas sob iluminação constante e contínua, a $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de um banco de lâmpadas fluorescentes brancas e a 25 a 27 °C.

O pré-inóculo foi obtido a partir de cultura-estoque de cada isolado de cianobactéria cultivada em tubo contendo meio BG11 sólido inclinado. A partir dessa cultura-estoque, fez-se uma repicagem em placas contendo meio BG11 sólido, sendo estas mantidas incubadas em condições de fototrofia por sete dias. Com o auxílio de alça de repicagem, algumas colônias foram transferidas para frascos do tipo *Erlenmeyer* de 50 mL de capacidade contendo 15 mL de BG11 líquido, os quais foram incubados em agitador rotatório, sob agitação constante de 110 rpm, a 27 °C e sob iluminação constante de $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 7-8 dias.

Amostras de cada isolado foram centrifugadas a 15.000 g, por 10 minutos, à temperatura ambiente, para a obtenção dos inóculos. Ao sedimento foram adicionados 10 mL de salina 0,85% esterilizada ou meio BG11 líquido e a suspensão novamente centrifugada. Essa lavagem foi repetida duas vezes, sendo o centrifugado final ressuspensionado em um volume de meio BG11 líquido equivalente a duas vezes o seu próprio volume (NASCIMENTO, 1999).

O cultivo da biomassa durante a realização de todos os experimentos foi realizado em frascos do tipo *Erlenmeyer* de 50 mL de volume, contendo 15 mL de meio BG11, sendo inoculados com 1 % de biomassa v/v (AGUIAR, 1992, com modificações).

3.4 – Métodos de análise

3.4.1 – Análise dos padrões morfológicos e de hormogônios

Os padrões macroscópicos e microscópicos das culturas foram registrados por fotos e a análise dos hormogônios e demais tipos celulares foi realizada qualitativamente por meio de fotos de microscopia de luz.

As amostras destinadas às análises microscópicas foram fixadas em solução Transeau (BICUDO e BICUDO, 1970) e acondicionadas em microtubos de polipropileno do tipo Eppendorf®.

Para as análises de microscopia óptica foi utilizado Microscópio Olympus® BX-50, provido de sistema de captura de imagem Olympus® QColor3R®. As imagens obtidas foram processadas com o *software* QCapture® Suite Pro 6.0 (Quantitative Imaging Corp., BC, CA).

3.4.2 – Extração e quantificação de ficobiliproteínas

A quantificação de ficobiliproteínas foi realizada de acordo com TANDEAU de MARSAC e HOUMARD (1988). Uma alíquota de 5 mL de cultura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos, a 20 °C. O sedimento foi ressuscitado em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,5, sendo novamente centrifugado (etapa realizada por duas vezes). O centrifugado final foi novamente ressuscitado em 5 mL do mesmo tampão. Essa suspensão celular foi submetida a rompimento com o uso de French Press®.

Em seguida, a 1,9 mL do extrato livre de células foram adicionados 100 µL de solução de sulfato de estreptomicina 200 mg mL⁻¹, sendo mantidos a 4 °C por 30 minutos. Após esse período, a solução foi centrifugada a 18.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi, então, suplementado com 400 µL de uma solução de ditiotreitol de 1 mM.

A absorbância foi determinada a 565, 620 e 650 nm. As concentrações de ficocianina (Pc), aloficocianina (Ap) e ficoeritrina (Pe) foram obtidas a partir dos dados de absorbância de cada amostra, utilizando as expressões adotadas por TANDEAU de MARSAC e HOUMARD (1988):

$$Pc \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (Abs_{620 \text{ nm}} - 0,7 \times Abs_{650 \text{ nm}})/7,38;$$

$$Ap \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (Abs_{650 \text{ nm}} - 0,19 \times Abs_{620 \text{ nm}})/5,65 \text{ e}$$

$$Pe \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = [Abs_{565 \text{ nm}} - 2,8(Pc) - 1,34 (Ap)]/12,7.$$

3.4.3 – Extração e quantificação de clorofila *a*

A determinação da concentração de clorofila *a*, foram utilizados 5 mL de uma suspensão celular homogênea. Ela foi centrifugada a 15.000 g por 15 minutos a temperatura ambiente e ao centrifugado foram adicionados 3 mL de salina 0,85 %. Fluxos de seringa foram feitos até a obtenção de uma suspensão homogênea de

filamentos, sendo uma alíquota de 1 mL desta suspensão centrifugada a 10.000 g, a 4 °C, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a partir do sedimento foram realizadas duas extrações consecutivas usando, em cada, 3 mL de metanol 90 %, por 1 hora, a 4 °C, no escuro, seguidas por centrifugação a 10.000 g, a 4 °C, por 10 minutos. A leitura de absorbância de uma alíquota do extrato foi feita a 665 nm e a concentração (C) calculada segundo TANDEAU de MARSAC e HOUMARD (1988):

$$C (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{Abs}_{665 \text{ nm}} \times 13,9.$$

3.4.4 – Determinação de massa seca

A determinação de massa seca foi realizada de acordo com FIORE et al. (2000). Uma suspensão celular de 2 mL foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos, sendo o centrifugado ressuspendido em 2 mL de água destilada estéril, homogeneizado e novamente centrifugado. O centrifugado final foi também ressuspendido no mesmo volume de água destilada estéril. Esses 2 mL foram pesados em cadinhos de alumínio, previamente tarados e secos por 72 horas em estufa a 105 °C.

3.5 – Montagens experimentais

3.5.1 – Produção de massa seca e concentração de pigmentos em resposta a intensidade luminosa

Os isolados *Nostoc* CCLFM I, VIII e XXI foram cultivados em agitador rotatório por cinco dias, a 27° C e 110 rpm e sob luz branca de diferentes intensidades: 0, 15, 20, 30, 45, 75, 95 e 105 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O Isolado I também foi cultivado em mais cinco intensidades luminosas: 1, 3, 5, 7 e 9 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após esse período, a biomassa foi coletada e foram feitas as análises de ficobiliproteínas, clorofila *a* e massa seca. Também foram coletadas e fixadas, em Solução Transeau, amostras para análises microscópicas, nos pontos inicial e final do experimento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos 48 tratamentos foram agrupadas pelo critério de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Todas

as análises foram feitas com o auxílio do *software* SAEG 9.1 (Universidade Federal de Viçosa).

3.5.2 – Pré-cultivo e exposição de biomassa de cianobactérias a diferentes intensidades luminosas

Os isolados *Nostoc* CCLFM I, VIII e XXI foram pré-cultivados em agitador rotatório a 27 °C e 110 rpm, durante cinco dias a 15 e/ou 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No quinto dia de cultivo os isolados foram transferidos para as novas condições luminosas de incubação, sendo mantidos a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por três dias.

Para cada condição de cultivo foram inoculados dez frascos: dois para análises no dia inicial da montagem do experimento, e os outros oito para a incubação a 15 ou a 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No quinto dia, dois frascos foram retirados para análises e os outros seis, dois a dois, foram expostos às novas condições de incubação, 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo analisados após três dias.

Foram feitas análises de ficobiliproteínas, clorofila *a* e massa seca. No primeiro, quinto, sexto, sétimo e oitavo dias de experimento foram coletadas e fixadas em solução Transeau, amostras para análises microscópicas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias agrupadas pelo critério de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Todas as análises foram feitas com o auxílio do *software* SAEG 9.1 (Universidade Federal de Viçosa).

3.5.3 – Análise do crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI a 15 e 60 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Nostoc CCLFM XXI foi cultivado em agitador rotatório a 110 rpm, 27 °C, durante 10 dias, sob iluminação constante de 15 e 60 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em cada condição luminosa foram incubados 42 frascos. De 12 em 12 horas foram coletados dois frascos para análises de ficobiliproteínas, clorofila *a* e massa seca e amostras para análises microscópicas.

Os dados de massa seca foram transformados em logaritmo neperiano, sendo esses valores transformados, utilizados para obtenção das curvas de crescimento.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Obtenção de culturas puras com o uso de soluções diluídas de hipoclorito de sódio

Foram obtidas colônias puras dos três isolados selecionados. No entanto, a obtenção de culturas puras se caracterizou como uma etapa extremamente trabalhosa durante a execução deste projeto, mesmo com a utilização de um único método, reconhecidamente eficiente. Isso se deve grandemente a aspectos relacionados com a própria morfologia e fisiologia dos diferentes isolados, como a quantidade de exopolissacarídeos que envolve as colônias, o padrão de auto-agregação dos filamentos e o padrão de diferenciação celular, além da contaminação inicial. Tal dificuldade de se obter culturas puras de cianobactérias, talvez, seja um dos maiores obstáculos encontrados pelos pesquisadores para o desenvolvimento de experimentos com esses micro-organismos (FERRIS e HIRSCH, 1991, NASCIMENTO, 1999).

Em ambientes como o solo e a água, a interação das cianobactérias com uma série de outros organismos, tais como bactérias, protozoários e microalgas, além de larvas de insetos, afeta consideravelmente o padrão de contaminação inicial (FERRIS e HIRSCH, 1991, REJMANKOVA, et al., 2000). Além disso, a maioria das

cianobactérias apresenta envoltórios celulares muito espessos, caracterizados pela presença de grandes quantidades de exopolissacarídeos, o que torna mais difícil a obtenção de filamentos isolados livres de contaminantes associados (HOICZYK e BAUMEISTER, 1995). Além dessas dificuldades, a publicação de artigos onde esse tema é abordado é muito escassa, tornando ainda mais complexas as tentativas de se obter culturas axênicas de cianobactérias (VÁZQUEZ-MARTINEZ et al., 2004).

A utilização de hipoclorito de sódio como agente descontaminante está condicionada à resistência das células, que varia, entre outros fatores, em função dos diferentes estágios do ciclo de vida. As células vegetativas diferentemente dos acinetos não suportam o tratamento com soluções diluídas de hipoclorito de sódio (NASCIMENTO, 1999). Sabe-se que os acinetos apresentam envoltório celular extremamente espesso, semelhante em composição química e estrutural ao apresentado pelos heterócitos (FLORES e HERRERO, 2010), quando comparados com o envoltório das células vegetativas (ARGUETA et al., 2006). Portanto, um dos fatores determinantes da resistência dos acinetos ao hipoclorito de sódio é a presença da parede celular mais espessa (NASCIMENTO, 1999).

Foi observada a formação de colônias de *Nostoc* CCLFM I em placas contendo meio BG11 sólido, após 18 dias de incubação em condições de fototrofia. A obtenção de colônias deste isolado foi feita a partir de suspensão de acinetos nas quais não houve a etapa de extração de exopolissacarídeos. Após a repicagem de colônias de cada um dos tratamentos em placa contendo meio ágar-nutriente e sete dias de incubação em estufa a 30 °C verificou-se a obtenção de colônias puras apenas quando foi usada solução de hipoclorito de sódio a 1 %.

A obtenção de colônias puras de *Nostoc* CCLFM I apenas neste tratamento, teoricamente mais brando que os outros, é explicada por suas próprias características morfológicas. Por apresentar filamentos pouco sobrepostos uns em relação aos outros e baixo padrão de auto-agregação, o hipoclorito de sódio, mesmo em baixas concentrações, deve ser capaz de atingir a grande maioria das células e filamentos. E como não existem grandes agregados de filamentos, a superfície dos mesmos, sítio provável de adesão dos contaminantes heterotróficos (HOICZYK e BAUMEISTER, 1995), está acessível à ação do hipoclorito de sódio. Por isso também, o uso de altas concentrações de hipoclorito de sódio, neste caso 2 e 3 %, além de ser prejudicial às células de heterotróficos contaminantes, também o é aos acinetos, uma vez que, mesmo

com um envoltório celular mais espesso, tais concentrações inviabilizaram a formação de novas colônias deste isolado.

Os isolados *Nostoc* CCLFM VIII e *Nostoc* CCLFM XXI formaram colônias após todos os tratamentos e incubação em condições de fototrofia por sete dias. No entanto, após a repicagem de colônias de cada um dos tratamentos em placa contendo meio ágar-nutriente e sete dias de incubação em estufa a 30 °C, não houve crescimento de contaminantes heterotróficos apenas no tratamento no qual se usou solução de hipoclorito de sódio, a 3 %. De modo diferente ao observado para *Nostoc* CCLFM I que não apresenta padrão de auto-agregação, *Nostoc* CCLFM VIII e *Nostoc* CCLFM XXI apresentam colônias formadas por filamentos densamente sobrepostos uns sobre os outros. Desta forma, a grande quantidade de agregados de células, mesmo após tentativas de rompimento com fluxos de seringa e uso de banho ultra-som, diminui a efetividade do hipoclorito de sódio, o que pode explicar a eficiência do tratamento apenas na maior concentração de hipoclorito de sódio.

A aplicação de soluções diluídas de hipoclorito pode, portanto, ser indicada para a obtenção de culturas puras de isolados de cianobactérias, das quais seja possível obter suspensões ricas em acinetos, uma vez que esta é uma metodologia simples e de rápida execução.

4.2 – Produção de massa seca e concentração de pigmentos em resposta a intensidade luminosa

4.2.1 – Isolado *Nostoc* CCLFM I

As quantidades de massa seca após cinco dias de cultivo em intensidades entre 0 e 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não diferiram da massa inoculada em cada frasco (Figura 2; Tabela 1). Portanto, é possível afirmar que nesta faixa de intensidades luminosas não há produção de biomassa, provavelmente pela impossibilidade de ocorrência de processos como fixação de carbono e de nitrogênio. A maior produção de massa seca foi atingida a 20 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não havendo diferenças entre a média obtida nesta e nas maiores intensidades luminosas (Tabela 1).

A taxa fotossintética e a fixação biológica de nitrogênio são extremamente afetadas pela intensidade luminosa. Em determinadas faixas estes dois processos

respondem positivamente a aumentos na intensidade luminosa, sendo ambos dependentes de uma intensidade mínima, específica para diferentes isolados (LEE e RHEE, 1999; VALIENTE e LEGANES, 1989; PRUFERT-BEBOUT et al, 1993). Em *Nostoc* UAM 205, a atividade da nitrogenase não foi detectada em intensidades luminosas menores que $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$; aumentando de 10 a $250 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e permanecendo constante após essa intensidade luminosa (VALIENTE e LEGANES, 1989).

A concentração de ficoeritrina variou com a intensidade luminosa, sendo máxima a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entre 20 e $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não houve variação das concentrações, caracterizando-se como uma faixa de concentração intermediária de ficoeritrina. A $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e entre 75 e $105 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram observados as menores concentrações desta ficobiliproteína (Tabela 1). Em valores absolutos, ficoeritrina foi a ficobiliproteína mais abundante neste isolado, com concentração máxima de 8,09 μg por miligrama de massa seca.

A maior concentração de clorofila *a* – 5,14 μg por miligrama de massa seca – foi obtida a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a mesma intensidade na qual foi observada a maior concentração de ficoeritrina, sendo que nas demais intensidades luminosas as concentrações foram iguais.

4.2.2 – Isolado *Nostoc* CCLFM VIII

A produção de biomassa em *Nostoc* CCLFM VIII não variou entre 0 e 30 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De modo semelhante a *Nostoc* CCLFM I, os valores das médias de massa seca nestas intensidades não diferiram da média de massa seca da biomassa inoculada no início do experimento – 18,375 mg. No entanto, a produção de biomassa de *Nostoc* CCLFM VIII não variou em uma faixa de intensidade luminosa mais extensa quando comparado a *Nostoc* CCLFM I (Figura 2 e Tabela 1).

Provavelmente, pelo intenso padrão de auto-agregação e de sobreposição dos filamentos neste isolado, a luz que efetivamente chega ao interior das colônias de *Nostoc* CCLFM VIII é menor do que a que chega no interior das colônias de *Nostoc* CCLFM I, gerando diferentes padrões de resposta à intensidade luminosa. O auto-sombreamento e a diminuição da intensidade luminosa que efetivamente chega ao interior das colônias são tidos como importantes fatores a serem analisados no cultivo

em larga escala de cianobactérias, visto que podem limitar a produção de biomassa desses micro-organismos (BERBEROGLU et al., 2007; GIDUGU et al., 2007).

A maior produção de biomassa foi observada a $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, permanecendo constante até $105 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2 e Tabela 1). Nas intensidades luminosas acima de $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas quais tanto *Nostoc* CCLFM I quanto *Nostoc* CCLFM VIII apresentaram sua produção máxima de massa seca, o último apresentou valores maiores do que o primeiro.

As concentrações das três ficobiliproteínas e de clorofila *a* não variaram com aumentos na intensidade luminosa (Tabela 1). Em valores absolutos, ficocianina foi o pigmento de maior concentração neste isolado, atingindo $7,87 \mu\text{g}$ por mg de massa seca a $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3).

4.2.3 – Isolado *Nostoc* CCLFM XXI

Nostoc CCLFM XXI não apresentou alteração de produção de biomassa em resposta a aumentos na intensidade luminosa, de 0 a $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo os valores médios de massa seca iguais, nas diferentes intensidades nesta faixa (Tabela 1). Tal fato foi semelhante ao observado para o *Nostoc* CCLFM VIII, indicando mais uma vez que o padrão de auto-agregação e a sobreposição dos filamentos dentro de uma colônia podem afetar a intensidade luminosa que efetivamente chega ao interior da colônia. Dos três isolados estudados, *Nostoc* CCLFM XXI é o que apresenta o padrão mais intenso de auto-agregação, de forma que parece haver uma relação entre padrão de auto-agregação e de sobreposição dos filamentos com intensidade luminosa mínima requerida para que haja produção líquida de biomassa.

A máxima produção de massa seca foi observada a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não variando até $105 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A produção de massa seca a 95 e $105 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi igual entre *Nostoc* CCLFM VIII e XXI, sendo maior do que a de *Nostoc* CCLFM I. Entretanto, *Nostoc* CCLFM VIII atingiu sua máxima produção de biomassa em uma intensidade luminosa menor, $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 1).

A concentração de ficoeritrina não variou com a intensidade luminosa, diferentemente do que ocorreu com as concentrações de aloficocianina e ficocianina. Não houve variação de concentração de aloficocianina entre 0 e $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$; a $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a concentração máxima foi atingida, sendo mantida constante nas

maiores intensidades. A concentração de ficocianina foi mínima a 0, 15 e 30 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, intermediária a 20 e máxima a 45 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não variando em intensidades acima de 45 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 1), sendo a concentração de clorofila *a* máxima na faixa entre 15 e 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

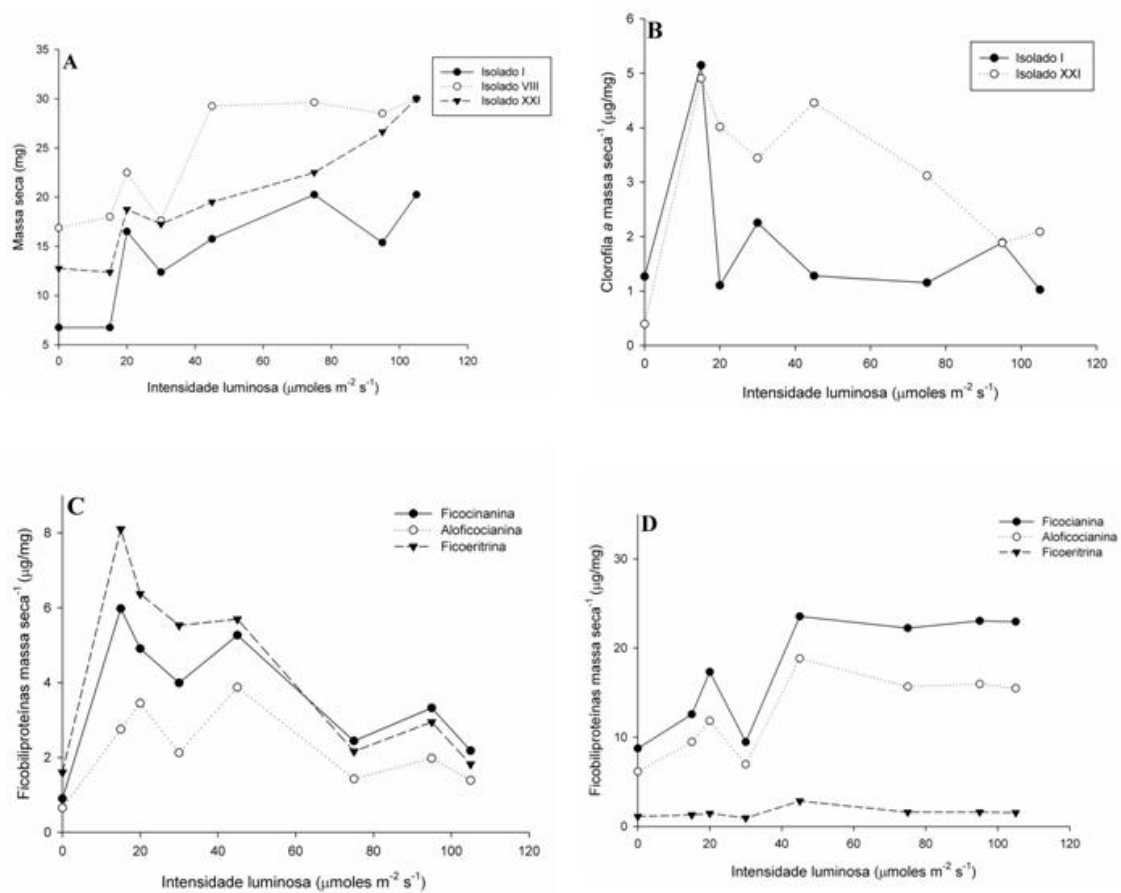


Figura 2. Massa seca dos Isolados *Nostoc* CCLFM I, VIII e XXI (A); concentração de clorofila *a* dos Isolados *Nostoc* CCLFM I e XXI (B); concentração de ficobiliproteínas em *Nostoc* CCLFM I (C) e em *Nostoc* CCLFM XXI (D) após cultivo por cinco dias, em meio BG11 líquido, a 27 °C e 110 rpm, submetido a oito intensidades luminosas. Os dados em A estão expressos em miligrama por volume total da cultura (15 mL), e em B, C e D em micrograma de pigmento por miligrama de massa seca ($\mu\text{g mg}^{-1}$).

Tabela 1. Médias de massa seca, ficocianina (Pc), aloficocianina (Ap), ficoeritrina (Pe) e clorofila *a*, após o cultivo dos isolados de cianobactérias submetidos a diferentes intensidades luminosas, em meio BG11 líquido, durante cinco dias, a 27 °C e agitação de 110rpm.

Isolados	Intensidade luminosa ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)							
	0	15	20	30	45	75	95	105
Massa seca								
----- mg -----								
I	6,75 bB*	6,75 bB	16,50 aA	12,37 aA	15,75 aB	18,00 aB	15,37 aB	20,25 aB
VIII	16,87 bA	18,00 bA	22,50 bA	17,62 bA	29,25 aA	29,62 aA	28,50 aA	30,00 aA
XXI	12,75 bA	12,37 bB	18,75 bA	17,25 bA	19,50 bB	22,50 aB	26,62 aA	30,00 aA
Ficocianina (Pc)								
----- $\mu\text{g mg}^{-1}$ -----								
I	0,89 aB	5,97 aB	4,90 aB	3,99 aA	5,26 aB	2,44 aB	3,32 aB	1,18 aC
VIII	4,46 aB	4,29 aB	7,87 aB	5,79 aA	6,59 aB	7,23 aB	8,09 aB	7,76 aB
XXI	8,74 cA	12,56 cA	17,31 bA	9,46 cA	23,54 aA	22,23 aA	23,05 aA	22,95 aA
Aloficocianina (Ap)								
----- $\mu\text{g mg}^{-1}$ -----								
I	0,65 aA	2,75 aB	3,44 aB	2,12 aA	3,87 aB	1,42 aB	1,98 aB	1,39 aC
VIII	3,83 aA	3,66 aB	5,82 aB	5,00 aA	4,39 aB	5,12 aB	6,10 aB	6,86 aB
XXI	6,14 bA	9,47 bA	11,85 bA	5,95 bA	18,83 aA	15,66 aA	15,96 aA	15,48 aA
Ficoeritrina (Pe)								
----- $\mu\text{g mg}^{-1}$ -----								
I	1,60 cA	8,09 aA	6,36 bA	5,52 bA	5,69 bA	2,16 cA	2,94 cA	1,82 cA
VIII	1,15 aA	1,45 aB	1,45 aB	1,57 aB	1,12 aB	1,30 aA	1,55 aB	1,85 aA
XXI	1,12 aA	1,29 aB	1,46 aB	0,94 aB	2,85 aC	1,59 aA	1,61 aB	1,53 aA
Clorofila <i>a</i>								
----- $\mu\text{g mg}^{-1}$ -----								
I	1,26 bA	5,14 aA	1,10 bB	2,25 bA	1,27 bB	1,15 bA	1,88 bA	1,02 bA
VIII	1,73 aA	1,40 aB	3,80 aA	3,60 aA	2,01 aB	1,97 aA	2,05 aA	2,34 aA
XXI	0,39 bA	4,90 aA	4,01 aA	3,44 aA	4,45 aA	3,11 aA	1,88 bA	2,08 bA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, e pela mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo critério de Scott-Knott ($p > 0,05$), para cada variável.

As intensidades luminosas nas quais se atingiu as máximas produções de massa seca foram diferentes entre os três isolados: 20, 45 e 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em *Nostoc* CCLFM I, *Nostoc* CCLFM VIII e *Nostoc* CCLFM XXI, respectivamente. Além disso, a quantidade de massa seca produzida diferiu quando se compara o isolado *Nostoc* CCLFM I com os demais. Apesar do baixo padrão de auto-agregação de seus filamentos e de, em tese, receber uma maior quantidade efetiva de luz por célula, este produz grande quantidade de exopolissacarídeos (EPS) e não massa celular, desviando parte do carbono fixado.

A produção de EPS em *Nostoc*, em condições *in vitro*, serve como um “escoamento” para o excesso de carbono fixado em condições de alta relação carbono/nitrogênio. A escassez de CO₂ leva, de outro modo, a uma diminuição na síntese de EPS. Logo, em condições de intensidade luminosa na qual a atividade fotossintética seja máxima e com quantidades suficientes de CO₂, a cultura se torna limitada em relação a nitrogênio, sendo o excesso de CO₂ canalizado para a síntese de EPS (OTERO e VINCENZINI, 2004).

A relação entre fotossíntese e fixação biológica do nitrogênio ou atividade da nitrogenase (AN) pode ser em parte, mediada pela quantidade de energia fornecida pela fotossíntese para a fixação do nitrogênio, mas também pela ação tóxica do oxigênio liberado durante o mesmo processo. Com aumentos na intensidade luminosa, atingir-se-á uma situação em que, apesar do efeito positivo do alto suprimento de energia, a atividade da nitrogenase também é afetada negativamente pelo oxigênio produzido (KANGATHARALINGAM et al., 1991). Desta maneira, a grande quantidade de EPSs produzida por *Nostoc* CCLFM I equilibraria sua relação intracelular de carbono/nitrogênio. Uma vez que a produção de massa seca neste isolado aumenta, atingindo o máximo em uma faixa de menores intensidades luminosas, pode-se supor que suas taxas fotossintéticas também aumentem nestas condições, o que em última análise intensifica a produção de oxigênio. A ausência de sobreposição de filamentos permite que os gases presentes no meio de cultura, em especial o oxigênio, se difundam com maior facilidade, entrando em contato direto com a maioria dos filamentos, o que levaria a diminuição da AN.

Em *Nostoc* CCLFM VIII e *Nostoc* CCLFM XXI, apesar da necessidade de maiores intensidades luminosas para a produção de massa seca, provavelmente a maior parte do carbono fixado foi direcionada para a síntese de massa celular. Filamentos mais sobrepostos uns sobre os outros permitem a formação de regiões de microaerofília, nas quais a fixação de nitrogênio ocorre mais intensamente (KANGATHARALINGAM et al., 1991). Desta forma, o padrão intenso de sobreposição dos filamentos permitiria a formação destas regiões ao diminuir a quantidade de luz que efetivamente chega ao interior da colônia, diminuindo tanto a taxa fotossintética – que se mantém alta nas regiões mais externas da colônia – quanto a liberação de oxigênio, permitindo que a atividade na nitrogenase seja mais intensa.

Em *Anabaena flos-aquae*, foi demonstrado que a atividade da nitrogenase é muita mais intensa quando da formação de agregados de heterócitos, uma vez que

minimiza o efeito inibitório do oxigênio, por diminuir sua difusão na região de atividade da nitrogenase, mesmo em maiores intensidades luminosas (KANGATHARALINGAM et al., 1991).

A faixa de intensidades luminosas usada não diminuiu a produção de biomassa nas maiores intensidades. Provavelmente, pelo fato de essas intensidades luminosas não serem suficientemente altas para causar danos à fisiologia do micro-organismo. Em *Oscillatoria agardhii* 7821, *Anabaena circinalis* MA22, intensidades luminosas maiores que 50-60 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ diminuíram consideravelmente as taxas de crescimento, as quais decaíram à metade da máxima em intensidades próximas a 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Neste estudo, porém, a maioria dos isolados apresentou saturação da taxa de crescimento em intensidades maiores ou iguais a 100-180 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (WYMAN e FAY, 1986). *Spirulina platensis* UEX 1928 apresentou máxima taxa de crescimento a 432 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mantendo-a constante até intensidades próximas a 1500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (OLAIZOLA e DUERR, 1990). Em *Microcystis aeruginosa* UV-027 observou-se aumentos na taxa de crescimento com aumentos de intensidade luminosa (20 a 565 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sem atingir uma faixa de saturação (RAPS, et al., 1983).

Neste trabalho não foram obtidos dados relativos à taxa de crescimento, no entanto a análise de produção de biomassa após determinado tempo pode refletir a variação de taxa de crescimento. A coleta de biomassa para análises, após cinco dias de cultivo, foi uma estratégia para garantir a ocorrência de, pelo menos, uma fase logarítmica completa (NASCIMENTO, 1999) e que os dados refletissem diferenças nas taxas de crescimento.

Nas intensidades luminosas analisadas, não houve alteração na concentração de pigmentos de *Nostoc* CCLFM VIII. Em *Nostoc* CCLFM I, ficoeritrina e clorofila *a* foram os únicos pigmentos que responderam à intensidade luminosa. A concentração de ficoeritrina foi máxima a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, decaindo com os aumentos subseqüentes nas intensidades luminosas; clorofila *a* também apresentou máxima concentração a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando nas demais intensidades luminosas valores menores do que a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, todavia iguais entre si. *Nostoc* CCLFM XXI apresentou as maiores concentrações de ficocianina e aloficocianina a 45 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e estas permaneceram constantes em maiores intensidades luminosas; a concentração de clorofila *a* foi máxima na faixa entre 20 e 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, diminuindo nas maiores intensidades luminosas (Tabela 1).

E registrada relação inversa entre conteúdo de pigmentos e intensidade luminosa (WYMAN e FAY, 1986; REUTER e MÜLLE, 1993; SOLTANI et al., 2006). No presente trabalho, no entanto, observou-se também relação direta entre conteúdo de pigmentos e intensidade luminosa, em seus menores valores.

4.3 – Pré-cultivo e exposição de biomassa de cianobactérias a diferentes intensidades luminosas

4.3.1 – Isolado *Nostoc* CCLFM I

Após cinco dias de cultivo do *Nostoc* CCLFM I a 15 e 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi observada produção de biomassa apenas na última intensidade luminosa; e ficoeritrina foi a única ficobiliproteína cuja concentração variou entre as intensidades, sendo maior a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Tais resultados confirmam os dados anteriores (Figura 2 e Tabela 1).

Biomassa pré-cultivada a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando exposta por três dias a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gerou as seguintes massas: 11,25; 12,375; 12,75 mg. Estes valores são iguais entre si, mas diferem do valor de massa seca obtido ao final do pré-cultivo, 7,875 mg. Desta forma, o pré-cultivo a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e exposição subsequente a menores intensidades luminosas, resulta em produção de biomassa. Tais resultados diferem dos apresentados pela Curva de Resposta, entre intensidades de 0 a 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As concentrações de ficoeritrina e ficocianina aumentaram com a intensidade luminosa até 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O aspecto microscópico do pré-inóculo do *Nostoc* CCLFM I, produzido a 30 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e do mesmo, após cinco dias de pré-cultivo a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é apresentado na Figura 3. O aspecto microscópico das culturas após este pré-cultivo e subsequente exposição a 0 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é apresentado na Figura 3.

Os dados de microscopia, ao apresentarem uma predominância de filamentos vegetativos, ratificam os dados de massa seca, permitindo a conclusão de que de fato há produção de biomassa. No entanto, como esse Isolado consegue produzir biomassa em ausência de luz? Uma possibilidade é por meio da utilização dos EPSs como fonte carbono, como proposto por OTERO e VINCENZINI (2004). É necessário, no entanto, comprovar o potencial de crescimento heterotrófico deste Isolado, bem como sua capacidade em fixar nitrogênio em ausência de luz.

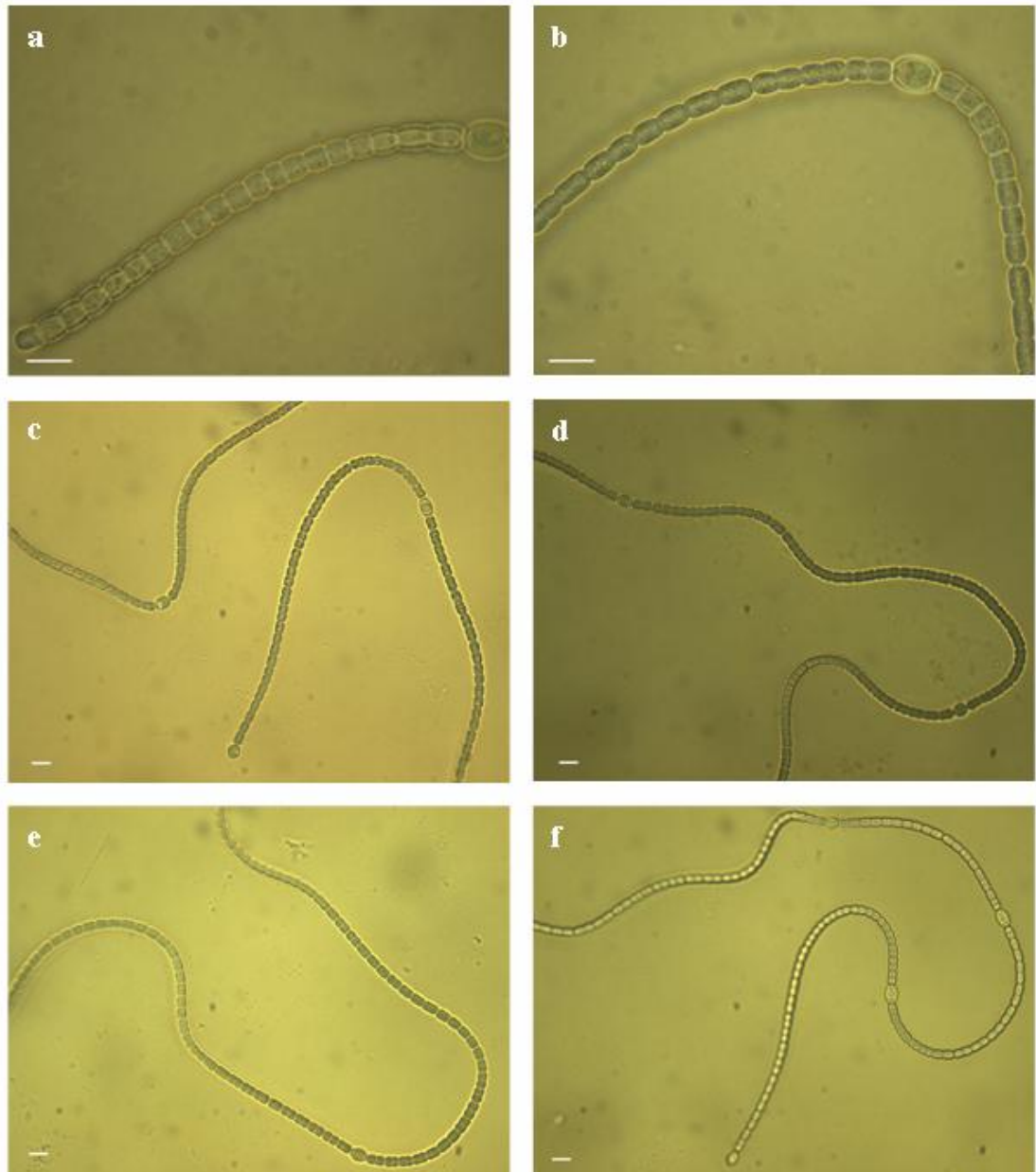


Figura 3. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM I. Em **a**, filamento vegetativo típico, presente no pré-inóculo cultivado a $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **b**, filamento vegetativo, após 5 dias de cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **c**, filamento vegetativo após pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **d**, filamento vegetativo após pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **e** e **f**, filamentos vegetativos após pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Barras = $10 \mu\text{m}$.

As Figura 3 também apresenta fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM I, referentes à exposição a 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Observam-se os mesmos padrões da exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou seja, predominância de filamentos vegetativos intactos.

A biomassa pré-cultivada a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando exposta por três dias a 0, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentou as seguintes massas: 19,125; 19,125 e 19,5 mg, as quais não diferem entre si e da massa do pré-cultivo. Também não se observou variação nas concentrações de ficobiliproteínas entre as três intensidades de exposição e nem entre estas e os valores obtidos ao final do pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ao final do cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foram observados filamentos com diferentes dimensões celulares (Figura 4a). Filamentos compostos por células de menores dimensões também foram observados após exposição às baixas intensidades luminosas. Observou-se perda de heterócitos ou rompimento das regiões de ligações destes com as células vegetativas, além do aspecto mais granuloso, possivelmente em função da presença de vesículas de gás (Figuras 4).

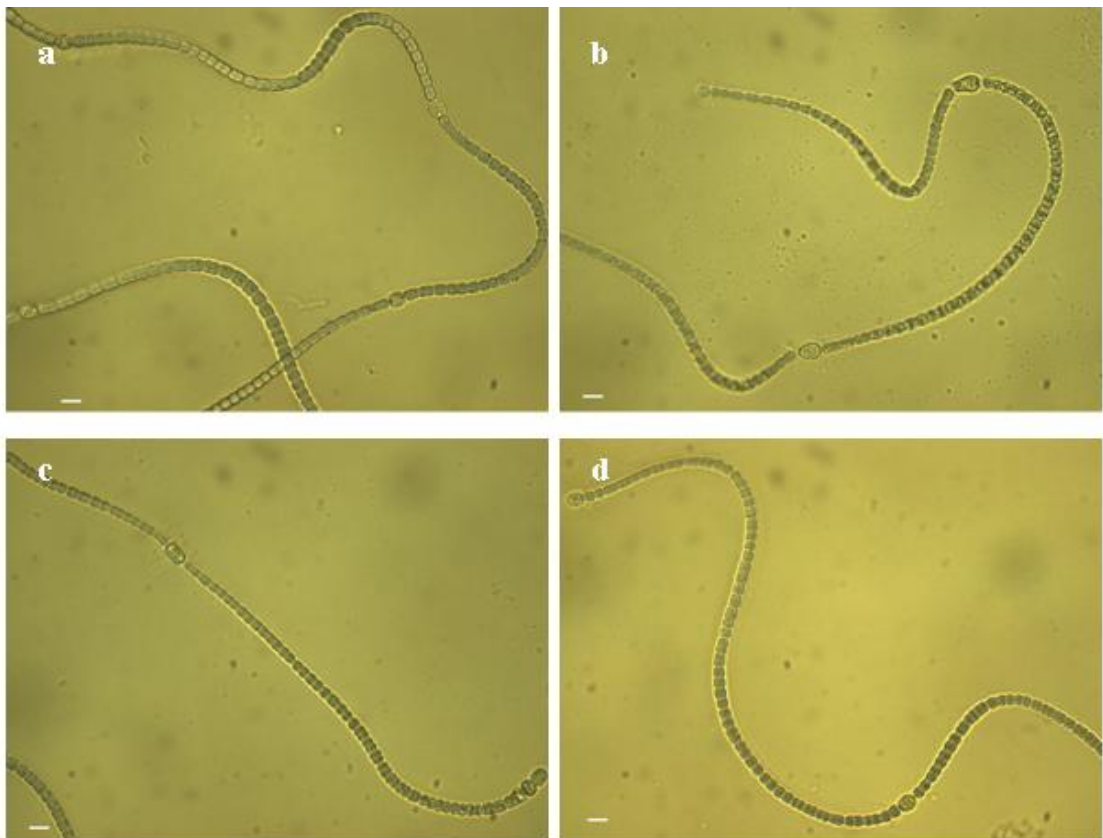


Figura 4. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM I. Em **a**, filamento vegetativo, após 5 dias de cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **b**, filamento vegetativo após pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 5 dias e exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **c**, filamento após pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 5 dias e exposição a $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **d**, filamento após pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 5 dias e exposição a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Barras = 10 μm .

Filamentos formados por células de menores dimensões podem ser um indicativo de que estejam se diferenciando em hormogônios (HERDMAN e RIPPKA, 1988, CAMPBELL e MEEKS, 1989, CAMPBELL et al., 1993, CAMPBELL, 1994). Além disso, perda de heterócitos e presença de vesículas de gás são outras características de filamentos neste processo de diferenciação (RIPPKA et al., 1979; TANDEAU DE MARSAC, 1994).

Em nenhum ponto observaram-se hormogônios livres, no entanto, a não produção de biomassa após três dias de exposição às baixas intensidades luminosas e os padrões morfológicos observados podem indicar a ocorrência do processo de diferenciação de hormogônios (TANDEAU DE MARSAC, 1994; MEEKS et al., 2002; MEEKS e ELHAI, 2002; FLORES e HERRERO, 2010).

A diferenciação de hormogônios, neste caso, pode ser uma resposta à mudança nas intensidades luminosas às quais os micro-organismos estavam submetidos. Apesar de não haver alteração significativa na concentração de pigmentos, a quantidade de biomassa submetida às baixas intensidades luminosas é relativamente alta, o que poderia intensificar a filtração seletiva da luz. Ou seja, mesmo que as concentrações de ficobiliproteínas sejam as mesmas no pré-cultivo e nas diferentes condições de exposição, a quantidade de energia luminosa que efetivamente chega aos filamentos não é.

A ausência de produção de biomassa após a exposição às baixas intensidades luminosas também pode ser um indicativo de que, após cinco dias de cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, *Nostoc* CCLFM I encontrava-se em fase estacionária. Além disso, de acordo com a Curva de Resposta (Tabela 1), após cinco dias de cultivo, as concentrações de ficobiliproteínas foram mais altas nas menores intensidades luminosas. No experimento de pré-cultivo e exposição observou-se que, em três dias, não houve alteração nas concentrações de ficobiliproteínas. Em baixas intensidades luminosas, maior concentração de pigmentos está relacionada com aumento na capacidade coletora de energia luminosa (WYMAN e FAY, 1986). Como não se observou diferença nas concentrações destes pigmentos, comparando-se o pré-cultivo com a subsequente exposição por três dias a $0, 5$ e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provavelmente a célula ainda não tenha conseguido adequar a síntese destes pigmentos a este ambiente de luz.

4.3.2 – Isolado *Nostoc* CCLFM VIII

Após cinco dias de cultivo de *Nostoc* CCLFM VIII a 15 e 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foram produzidos, respectivamente, 8,25 e 12 mg de massa seca. Esses valores são diferentes entre si (critério de Scott-Knott, a 5 % de significância), no entanto o valor de massa seca obtido a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não difere do valor de massa seca da biomassa inoculada nos frascos, no início do experimento. Não houve variação significativa na concentração em nenhum dos pigmentos, entre as duas condições de pré-cultivo e entre estas e o pré-inóculo.

Nostoc CCLFM VIII pré-cultivado a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não produziu biomassa quando subsequentemente exposto a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Também não houve significativa alteração na concentração de ficobiliproteínas, entre as intensidades de exposição e nem entre estas e a intensidade de pré-cultivo. Esses resultados corroboram aqueles da Curva de Resposta (Tabela 1).

A Figura 5 apresenta aspectos da colônia e de filamentos vegetativos do pré-inóculo, mantido a 30 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após cinco dias de pré-cultivo a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se um aumento no número de acinetos, e após subsequente exposição a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ também se observou o mesmo padrão. O pré-cultivo a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a subsequente exposição deste Isolado a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, resultou em expressiva diferenciação de acinetos. Essa resposta do *Nostoc* CCLFM VIII diferiu da apresentada por *Nostoc* CCLFM I, que não diferenciou acinetos (Figuras 3 e 4).

Os acinetos, esporos de resistência produzidos por alguns gêneros de cianobactérias, são diferenciados em condições de estresse ambiental, como carência de fosfato e limitação de luz (ADAMS e DUGGAN, 1999; MEEKS et al., 2002; ARGUETA et al. 2006; FLORES e HERRERO, 2010). Desta forma, 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pode ser considerada uma intensidade luminosa que, além de não permitir a produção de biomassa, induz a diferenciação de acinetos em *Nostoc* CCLFM VIII.

No entanto, em nenhuma das imagens citadas observam-se apenas acinetos, havendo também filamentos vegetativos. Muito pouco se sabe sobre a dinâmica do processo de diferenciação de acinetos (ARGUETA et al., 2006), mas, especula-se que nem todas as células de um mesmo filamento ou da cultura sejam igualmente susceptíveis à diferenciação e que pelo menos em *Anabaena circinalis* a diferenciação

de acinetos também dependa de uma queda na atividade da nitrogenase e na frequência de heterócitos (FAY, et al., 1984).

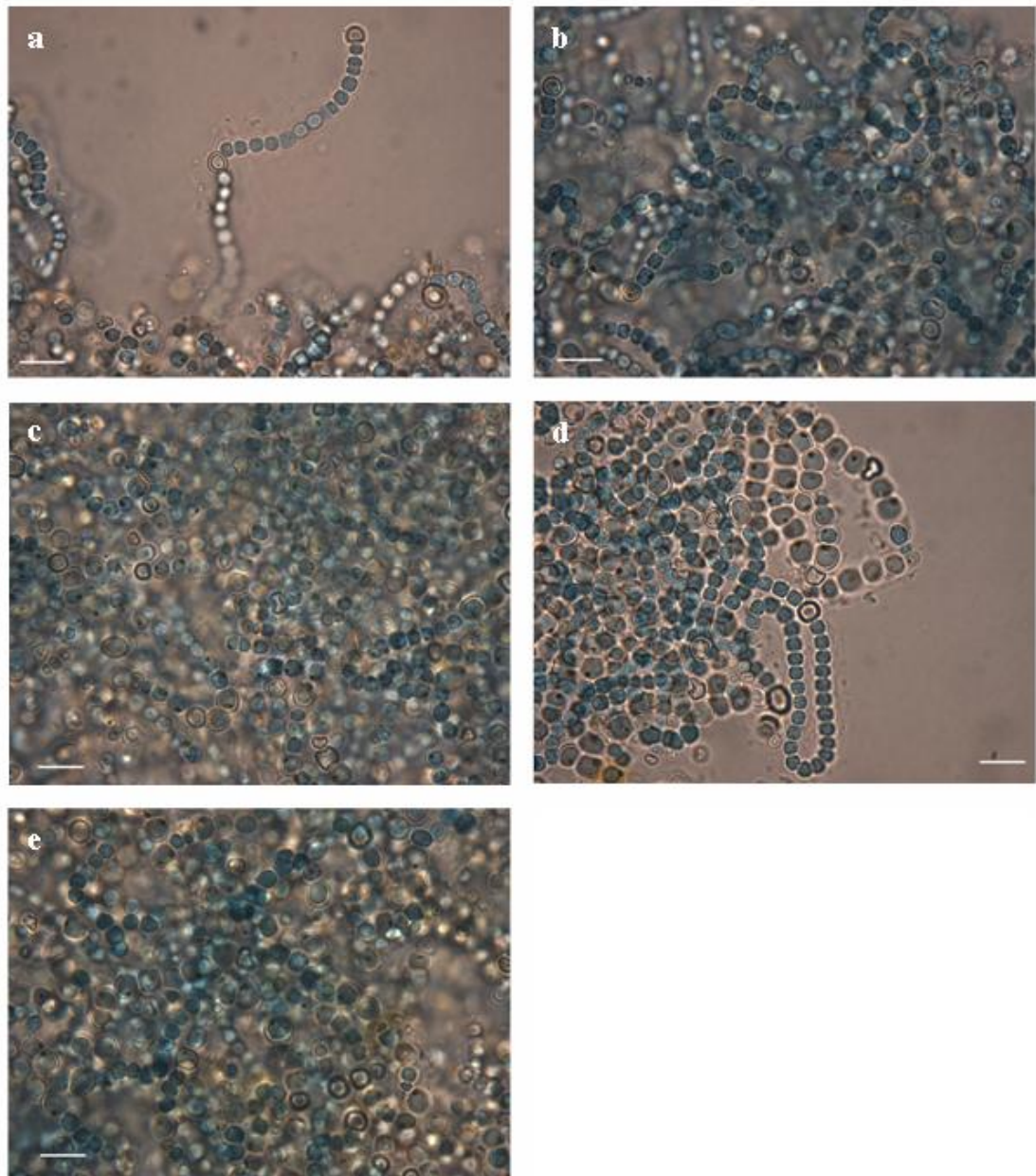


Figura 5. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM VIII. Em **a**, aspecto da colônia e de filamento vegetativo, presente no pré-inóculo mantido a $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **b**, colônia apresentando grande número de filamentos vegetativos e acinetos, após 5 dias de pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **c**, amostra pré-cultivada a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposta a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando predominância de acinetos. Em **d**, amostra pré-cultivada a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposta a $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando predominância de acinetos. Em **e**, amostra pré-cultivada a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposta a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando predominância de acinetos. Barras = $10 \mu\text{m}$.

Biomassa pré-cultivada a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando exposta por três dias a 0, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gerou as seguintes massas: 10,875; 11,25 e 10,875 mg. Estes valores são iguais entre si, e iguais ao valor de massa seca obtido ao final do pré-cultivo, não havendo, portanto, produção de biomassa. Não houve diferença na concentração de ficobiliproteínas, entre as intensidades de exposição e nem entre estas e intensidade de pré-cultivo. Tais resultados são semelhantes ao obtido para o pré-cultivo deste isolado a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

No entanto, as interpretações para a não alteração na quantidade de biomassa produzida são diferentes. Através das análises microscópicas, observou-se uma diferença nos tipos celulares predominantes: poucos acinetos e predominância de filamentos vegetativos. Entre estes observaram-se diferenças nas dimensões das células (Figura 6), além da presença de filamentos apresentando rompimento parcial na ligação heterócito-célula vegetativa.

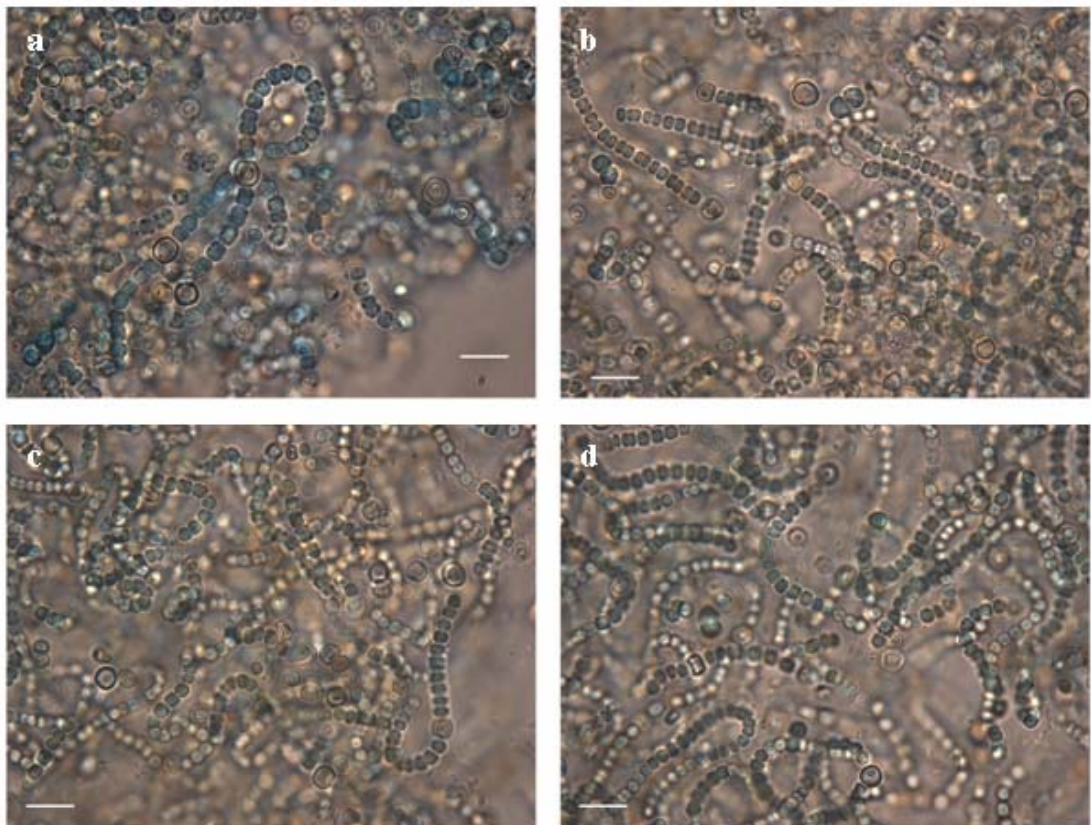


Figura 6. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM VIII. Em **a**, filamentos após cinco dias de pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **b**, filamentos vegetativos com células de diferentes dimensões, após 5 dias de pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **c**, amostra pré-cultivada a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposta a $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, também apresentando filamentos com células de diferentes dimensões. Em **d**, amostra pré-cultivada a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e exposta a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando filamentos rompidos na região de ligação entre heterócitos e células vegetativas. Barras = $10 \mu\text{m}$.

Nostoc CCLFM VIII, semelhante à *Nostoc* CCLFM I, não apresentou hormogônios livres em nenhum ponto. Mas, para ambos a ausência de crescimento após os três dias de exposição às baixas intensidades luminosas e os padrões morfológicos observados, possivelmente indiquem diferenciação de hormogônios.

4.3.3 – Isolado *Nostoc* CCLFM XXI

Nostoc CCLFM XXI, após cinco dias de cultivo a 15 e 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, produziu, respectivamente, 14,25 e 19,125 mg de massa seca. Esses valores são diferentes entre si (Scott-Knott, a 5 % de significância), e também diferem do valor de massa seca obtido quando do cultivo em frascos, no início do experimento. Esse resultado é diferente do apresentado pela Curva de Resposta (Tabela 1), na qual, não houve variação na produção de biomassa, na faixa de 0 a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Uma possível explicação é a diferença de biomassa inoculada nos dois experimentos, a saber: 13,125 mg na Curva de Resposta e 6,75 mg no experimento de Pré-cultivo e Exposição. Na curva de crescimento deste isolado, a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ evidenciou-se que no início da fase estacionária a massa acumulada era de 11,62 mg. A grande quantidade de biomassa inoculada na Curva de Resposta (Tabela 1) pode ter intensificado os efeitos da filtração seletiva da luz, de 0 a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a tal ponto que a luz disponível não foi suficiente para o crescimento. As concentrações de ficocianina e de aloficocianina foram maiores no pré-cultivo a 75 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comparado ao pré-cultivo a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, da mesma forma que na Curva de Resposta (Tabela 1).

Biomassa pré-cultivada a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando exposta por três dias a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gerou as seguintes massas: 14,625; 20,25 e 16,875 mg. Tais valores são estatisticamente iguais entre si, e não diferem do valor de massa seca obtido ao final do pré-cultivo a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14,25 mg. Mais uma vez a quantidade de biomassa no início da Exposição a 0, 5 e 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi característica de fase estacionária. Ressalta-se que na Curva de Crescimento a 60 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ detectou-se aumento significativo de biomassa até o valor de 26,25 mg, indicando que a massa seca máxima é dependente da intensidade luminosa disponível.

Os resultados do experimento de Curva de Resposta (Tabela 1), os quais mostram que não há incremento na produção de biomassa em intensidades luminosas

abaixo de $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando comparado ao valor de massa seca da biomassa inoculada, corroboram os resultados obtidos nessa etapa.

A figura 7 apresenta fotomicrografias correspondentes ao pré-inóculo e ao Pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e subsequente Exposição a 0, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram observados grande quantidade de filamentos vegetativos juntamente com acinetos no pré-inóculo, mantido a $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ao final do pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observa-se uma predominância de acinetos, padrão mantido após as subsequentes exposições a 0, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esses resultados indicam que a diferenciação de acinetos é uma resposta à limitação de energia luminosa.

O fator ambiental mais importante a estimular a diferenciação de acinetos em *A. circinalis* é a limitação de luz ou de energia, existindo diferenças em relação ao cultivo de culturas diluídas em baixas intensidades, e à diminuição da intensidade luminosa por processos de filtração devido ao adensamento das colônias. A principal diferença nestes dois casos, seria a limitação na radiação capaz de estimular a fotossíntese. Em culturas diluídas, nas quais ainda não há efeito do auto-sombreamento, as células estão igualmente expostas a uma vasta faixa de radiações luminosas. No entanto, quando a cultura atinge uma densidade crítica, as células mais próximas da luz incidente agem como um filtro seletivo (FAY et al., 1984), absorvendo a maior parte da luz capaz de estimular a fotossíntese, fazendo com que nas camadas mais internas da colônia chegue luz enriquecida na região do verde. Espectros de luz com essa composição são incapazes de estimular o fluxo de elétrons nos heterócitos, uma vez que estes não apresentam ficobiliproteínas como sistema antena, reduzindo a atividade da nitrogenase. A diferenciação de acinetos seria então uma resposta à carência de nitrogênio, devido à diminuição da atividade dos heterócitos em razão à limitação de energia luminosa (FAY et al., 1984).

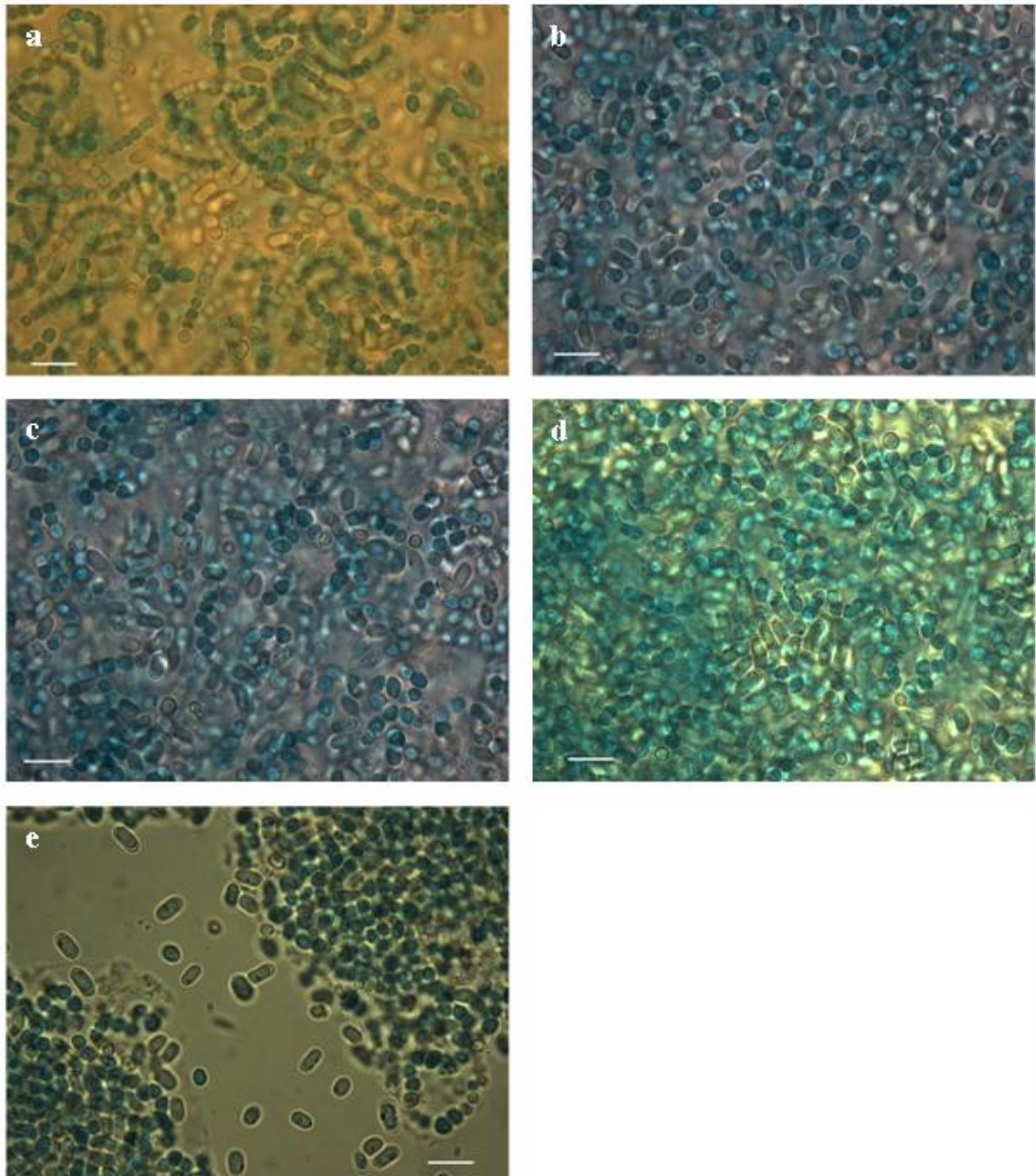


Figura 7. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI. Em **a**, aspectos de filamentos vegetativos, presentes no pré-inóculo mantido a $30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **b**, grande número de acinetos, após 5 dias de cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **c**, fotomicrografia de amostra submetida à pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **d**, fotomicrografia de amostra submetida à pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **e**, fotomicrografia de amostra submetida à pré-cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nas três últimas imagens, predominância de acinetos. Barras = $10 \mu\text{m}$.

Após pré-cultivo dos isolados *Nostoc* CCLFM VIII e XXI a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e subsequente exposição a 0 , 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se a mesma resposta: diferenciação de acinetos.

Biomassa pré-cultivada a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando exposta por três dias a 0, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gerou as seguintes massas: 25,875; 28,5 e 23,25 mg. Estes valores são iguais entre si, diferindo do valor de massa seca obtido ao final do pré-cultivo, 19,125 mg. Portanto, a exposição a baixas intensidades luminosas, após o pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, permitiu o crescimento e a produção de biomassa. Ocorreram diferenças nas concentrações de ficocianina e aloficocianina, que reduziram após a exposição às baixas intensidades luminosas, quando comparadas às concentrações do pré-cultivo, confirmando os dados obtidos na Curva de Resposta (Tabela 1).

A figura 8 apresenta as micrografias referentes ao pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e subsequente exposição a 0, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após cinco dias de cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ são observados predominantemente filamentos vegetativos. Na subsequente exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observou-se uma maior quantidade de acinetos, apesar de os filamentos vegetativos ainda predominarem. Nas condições de exposição a 5 e a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, há também predominância de filamentos vegetativos, no entanto, estes apresentam células com diferentes morfologias quando comparados aos observados após Exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os filamentos que apresentam células de menores dimensões podem ser um indicativo de diferenciação de hormogônios (HERDMAN e RIPPKA, 1988, CAMPBELL e MEEKS, 1989, CAMPBELL et al., 1993, CAMPBELL, 1994), assim como no caso dos Isolados *Nostoc* CCLFM I e VIII.

Há também uma diferença no padrão de agregação dos filamentos, possivelmente conseqüência do processo de diferenciação de hormogônios. O padrão de sobreposição de filamentos apresentado pela colônia após os cinco dias de cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 8a) é extremamente intenso. Após os três dias de exposição às intensidades mais baixas, há um afrouxamento neste padrão, especialmente na exposição a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 8, b-d).

Os resultados apresentados nesse experimento permitem a conclusão de que em condições nas quais não há incidência de luz nas colônias, a diferenciação de acinetos é o evento predominante. No entanto, quando há disponibilidade de luz, mesmo em baixas intensidades, 5 e $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, possivelmente a tendência é de diferenciação de hormogônios.

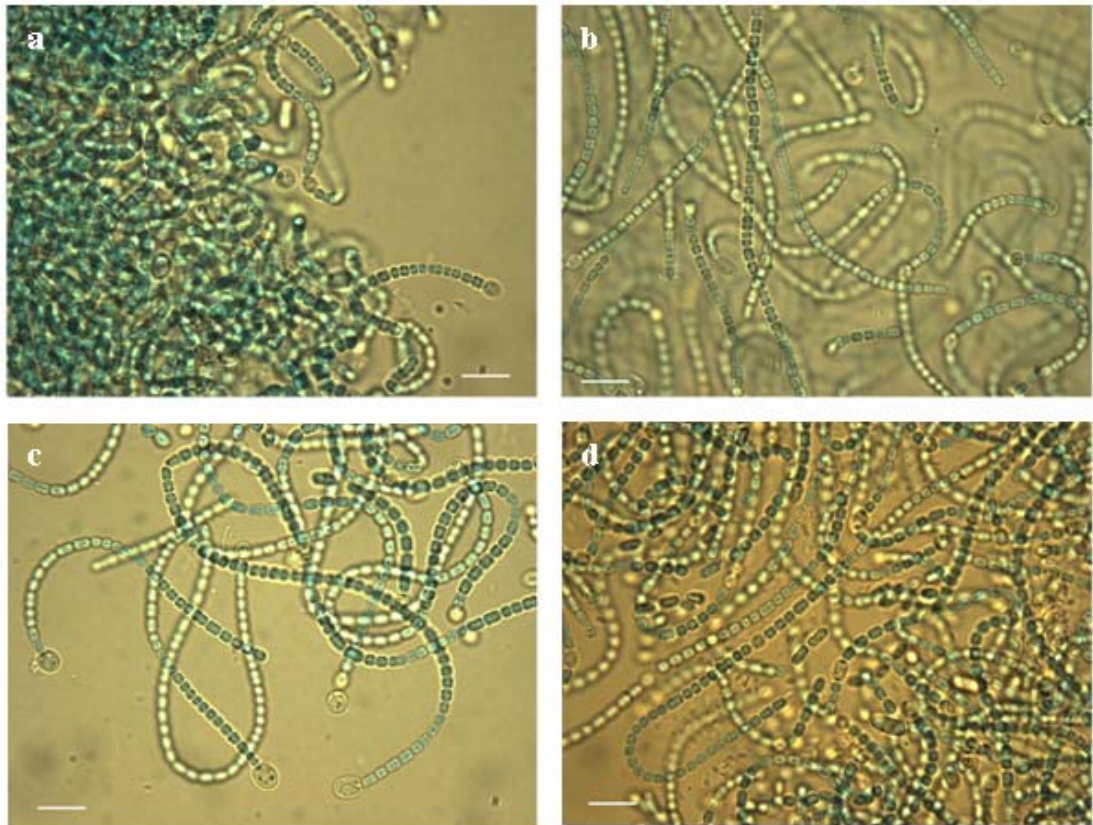


Figura 8. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI. Em **a**, aspectos de filamentos, após 5 dias de cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **b**, fotomicrografias de amostras submetidas à pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **c**, fotomicrografias de amostras submetidas à pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em **d**, fotomicrografias de amostras submetidas à pré-cultivo a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por cinco dias e exposição a $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Barras = $10 \mu\text{m}$.

4.5 – Análise do crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI a 15 e $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$

4.5.1 – Curva de crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$

A Figura 9 apresenta a curva de crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI cultivado por 240 horas em meio BG11, a 27°C e 110 rpm e sob luz branca a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os aspectos morfológicos correspondentes às diferentes fases de cultivo deste isolado estão apresentados nas Figuras 10 a.

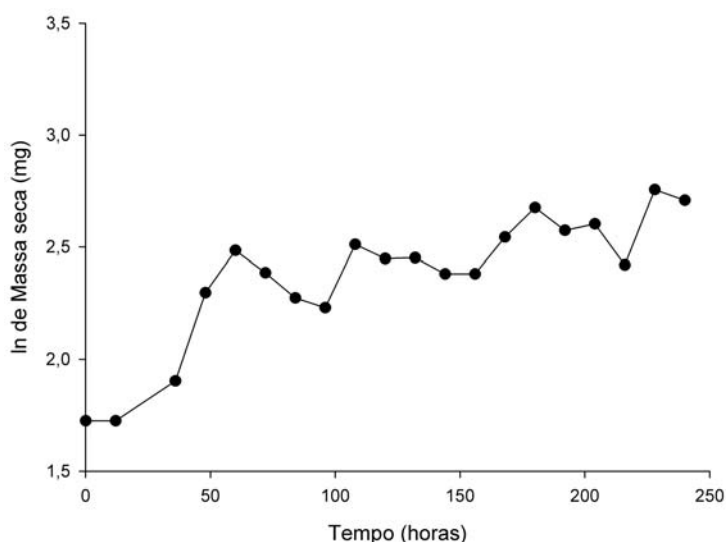


Figura 9. Curva de crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI, cultivado por 10 dias em meio BG11, a 27 °C e 110 rpm, sob luz branca de intensidade 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O gráfico apresenta a variação do ln da quantidade de massa seca (mg) com o tempo (horas).

Nostoc CCLFM XXI cultivado a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 9), permaneceu em fase lag até, no mínimo 12 horas. A cultura apresentou crescimento logarítmico de 36 a 48 horas, seguido de fase de desaceleração de 48 a 60 horas. Entre 60 e 96 horas ocorre uma fase de queda na biomassa. Após este período, observa-se uma alternância entre pequenas fases de aumento e outras de decréscimo na biomassa. Visto que o pré-inóculo para esse experimento também foi cultivado a 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não se esperava a fase lag observada. No entanto, observa-se uma tendência de progressivo aumento no número de acinetos até 24 horas (Figura 10). Portanto esta fase lag pode ser explicada pela qualidade inicial do inóculo, formado por células em processo de diferenciação. Sabe-se que alguns processos de diferenciação são irreversíveis, como o do heterócito (MEEKS et al., 2002; FLORES e HERRERO, 2010). Provavelmente, o mesmo se observa para a diferenciação de acinetos.

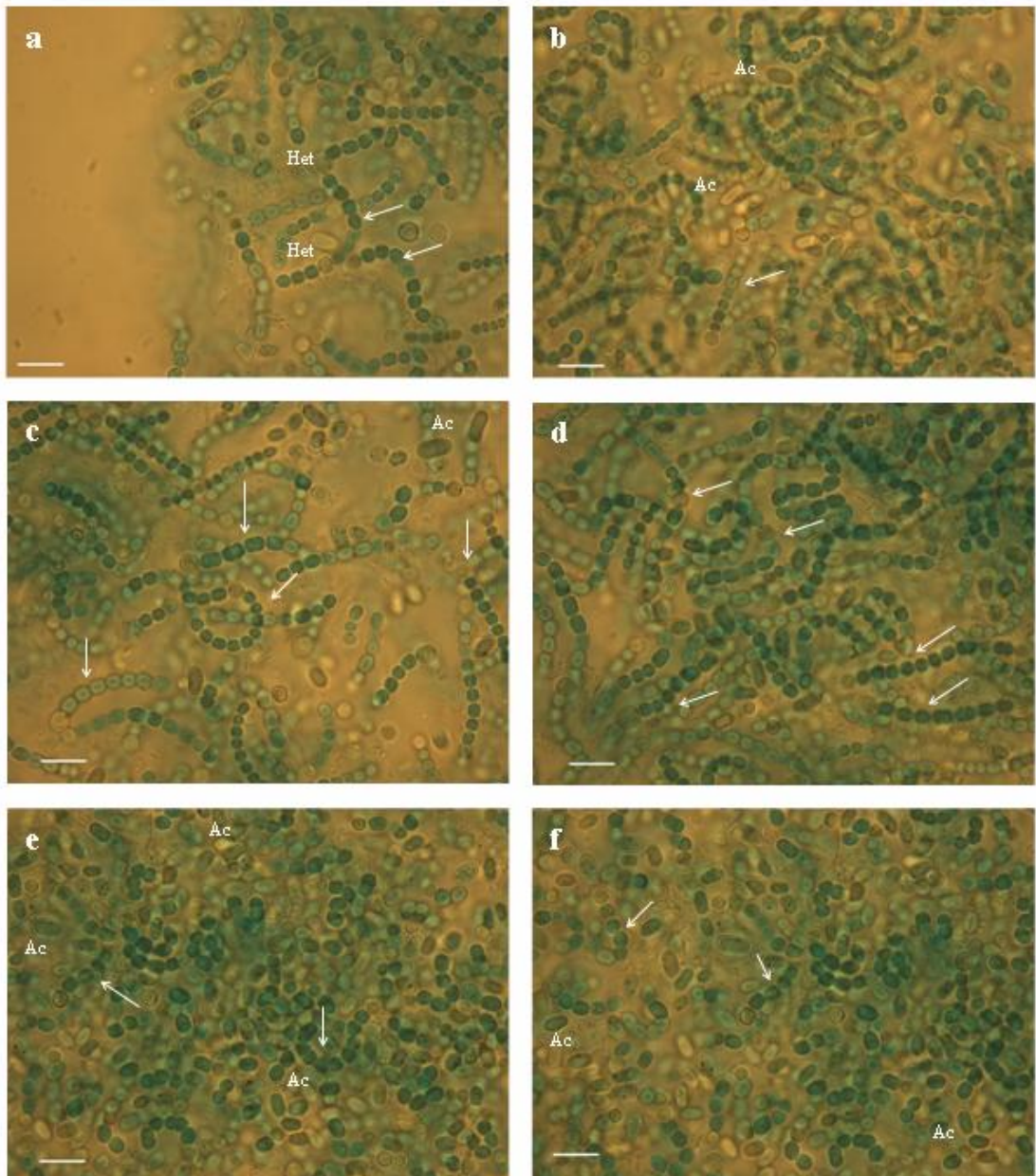


Figura 10. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI, referentes aos pontos 0 (**a e b**), 12 (**c e d**) e 24 horas (**e e f**). As setas indicam filamentos vegetativos; **het** = heterócito; **Ac** = acineto. Barras = 10 µm.

Um aumento na quantidade de filamentos vegetativos foi observado de 48 a 60 horas, seguido de um novo aumento no número de acinetos a 60 horas. Esta alternância de tipos celulares explica a fase de desaceleração entre 48 e 60 horas. Na fase de redução de biomassa, entre 72 e 96 horas (Figura 20) observou-se, microscopicamente, um número crescente de acinetos na cultura (Figura 11).

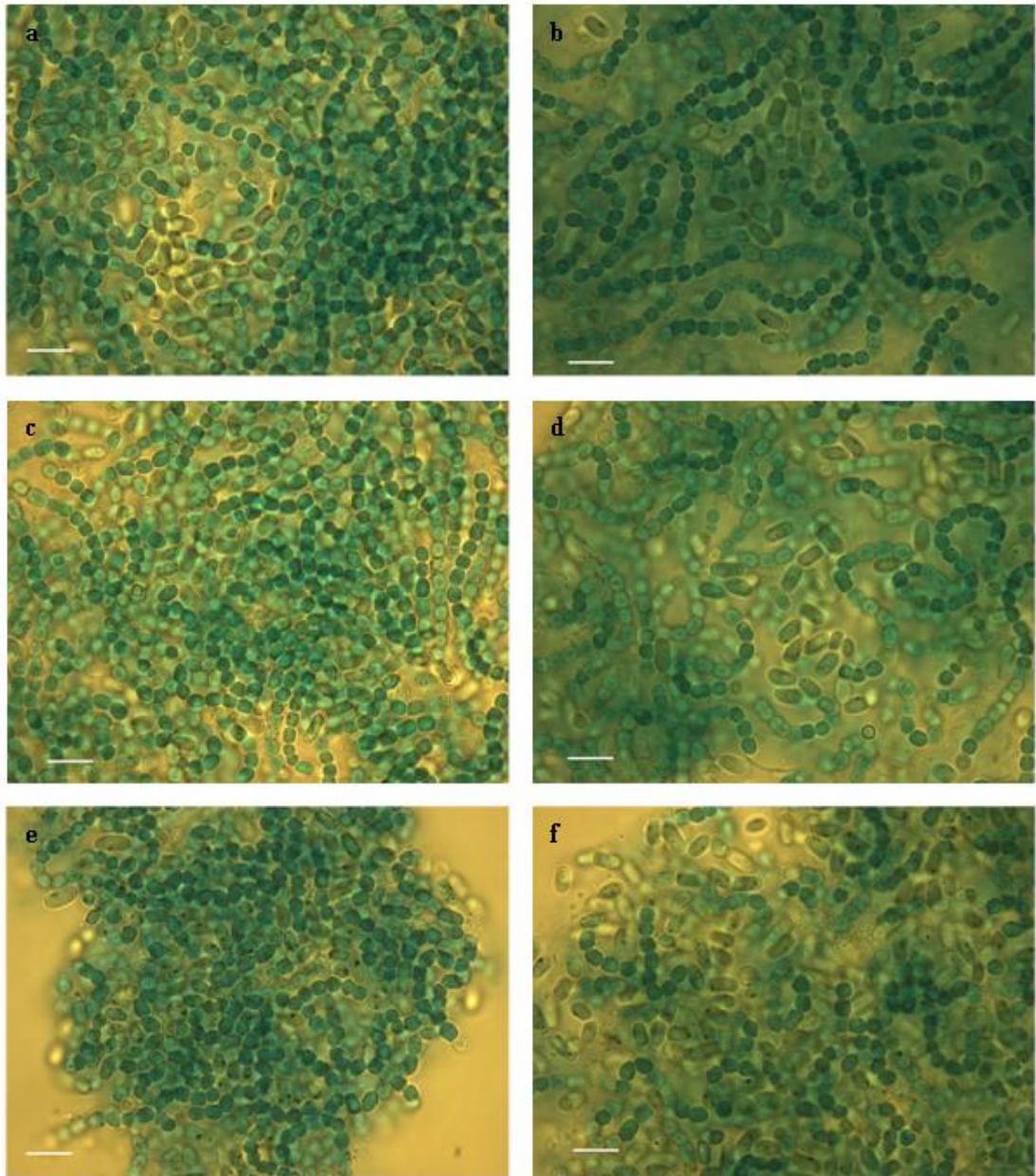


Figura 11. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI, referentes aos pontos 72 h (a e b), 84 h (c e d) e 96 h (e e f). Barras = 10 μm .

Esta tendência de redução da massa seca seria uma etapa inerente ao processo de diferenciação de acinetos? Essa pergunta se faz necessária, pois durante o cultivo a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, também foram feitas as mesmas observações; todavia não foram encontrados registros sobre estes fenômenos. Apesar de os acinetos apresentarem baixa atividade metabólica, em especial baixas taxas de fotossíntese e de fixação de nitrogênio (ADDAMS e DUGGAN, 1999; MEEKS et al., 2002; FLORES e HERRERO, 2010), a taxa de respiração é frequentemente elevada (HERDMAN, 1987), embora dependa da

idade, uma vez que a capacidade respiratória é perdida em acinetos velhos (ADDAMS e DUGGAN, 1999). Muito pouco se sabe sobre a diferenciação de acinetos (ARGUETA et al., 2006). Foi apresentada a hipótese de que nem todas as células de um mesmo filamento sejam igualmente susceptíveis à diferenciação e que pelo menos em *A. circinalis* a diferenciação de acinetos também dependa de uma queda na atividade da nitrogenase e na frequência de heterócitos (FAY, et al., 1984).

Desta forma, se há uma queda na atividade da nitrogenase e se as taxas de respiração são altas, é provável que a queda na produção de biomassa seja realmente um fato recorrente quando do processo de diferenciação de acinetos. No entanto, a afirmação definitiva da ocorrência deste padrão ainda depende de estudos nos quais parâmetros como taxas respiratórias e de fixação de nitrogênio sejam avaliados.

Após 96 horas de cultivo a alternância observada (Figura 20) pode ser explicada pela germinação de alguns acinetos que atingem a superfície dos agregados, seguida de nova fase de diferenciação. Ao final da curva de crescimento, a partir de 216 horas, há grande quantidade de acinetos em todos os pontos (Figura 12).

Colônias que passam por intenso processo de diferenciação de acinetos apresentam mudanças no padrão típico de arquitetura de suas colônias. Apesar de os acinetos de espécies do gênero *Nostoc* se formarem em cadeia, o processo de diferenciação é concluído quando essas cadeias se rompem, liberando os acinetos (MEEKS et al., 2002). Desta forma, no caso de *Nostoc* CCLFM XXI, a fragmentação dos filamentos durante o processo de diferenciação de acinetos representa um desmonte do padrão intenso de auto-agregação e de sobreposição dos filamentos. A ocorrência desse desmonte permite a dispersão da colônia, o que favorece o aproveitamento da luz incidente. Essa pode ser uma explicação para o aumento na quantidade de biomassa na faixa de 156 a 180 horas de cultivo.

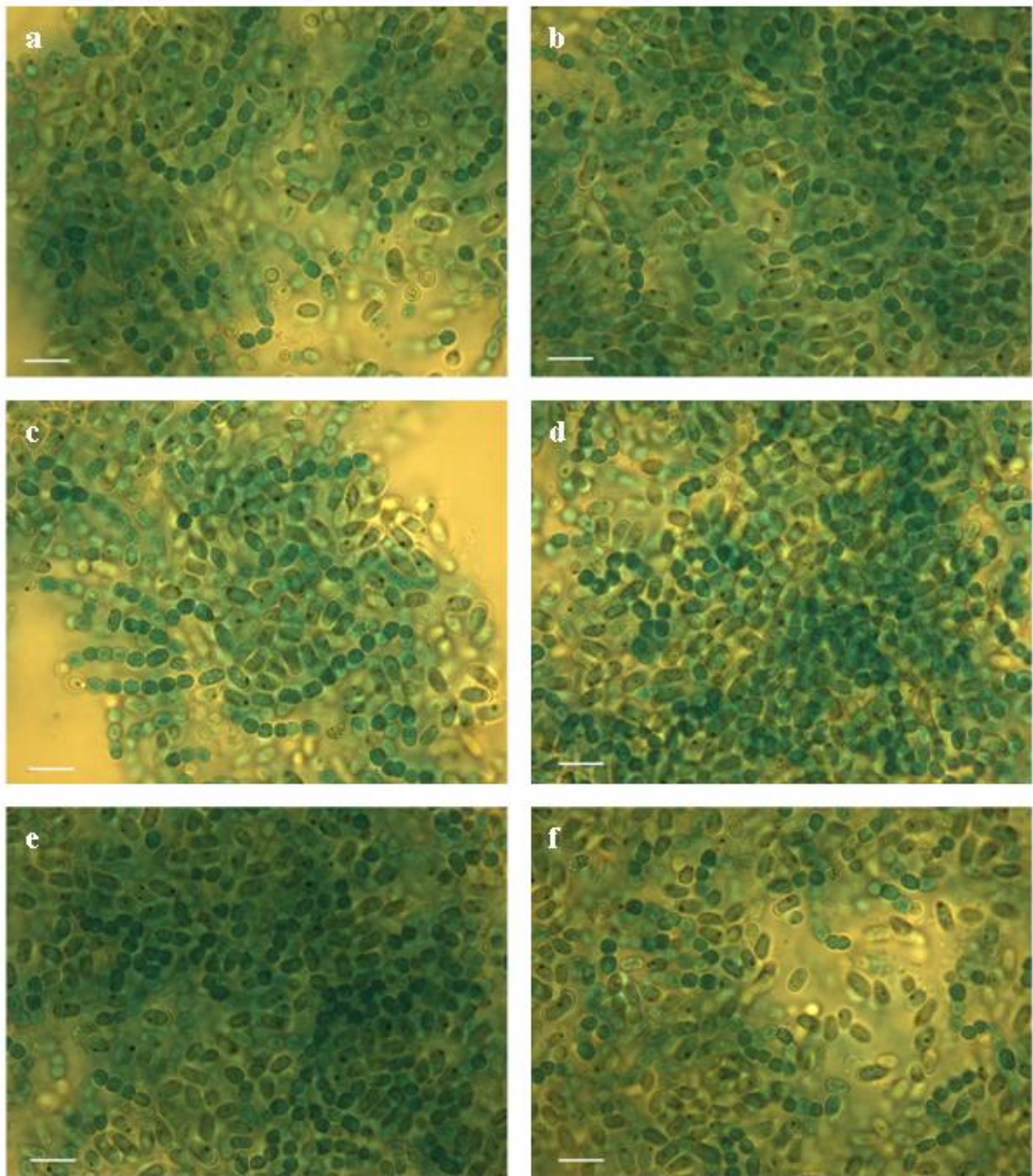


Figura 12. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI, referentes aos pontos 216 (a e b), 228 (c e d) e 240 horas (e e f). Barras = 10 μ m.

4.5.2 – Curva de crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$

A curva de crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI cultivado $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 13), apresenta em sequência: fase lag até 12 horas, seguida de uma primeira fase de crescimento entre 12 e 24 horas; fase de parada do crescimento até 60 horas; fase de crescimento de 60 até 84 horas; fase de parada do crescimento de 84 a 120 horas; fase de crescimento entre 120 e 204 horas e fase de decréscimo até 240 horas.

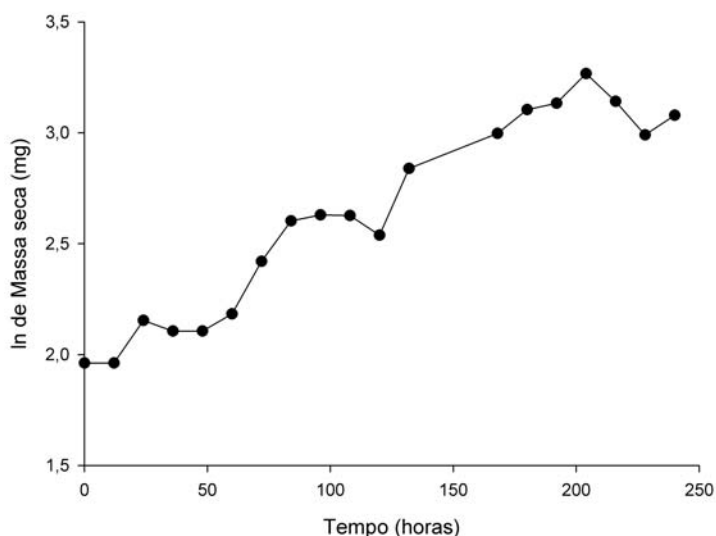


Figura 13. Curva de crescimento de *Nostoc* CCLFM XXI, cultivado por 10 dias em meio BG11, a 27°C e 110 rpm, sob luz branca de intensidade $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O gráfico apresenta a variação do ln da quantidade de massa seca (mg) com o tempo (horas).

Ao contrário do observado a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, também foram diferenciados hormogônios, além de acinetos, sendo que os primeiros se diferenciaram na fase de parada entre 24 e 60 horas.

A Figura 14-a apresenta o aspecto microscópico de uma colônia de *Nostoc* CCLFM XXI, mostrando o intenso padrão de sobreposição dos filamentos. As demais imagens da Figura 14 apresentam os tipos morfológicos predominantes nas primeiras 24 horas de cultivo, caracterizada por uma pequena fase lag, de 0 a 12 horas e por uma fase de crescimento de 12 a 24 horas. Entre 24 e 60 horas de cultivo, momento no qual ocorreu a primeira parada na produção de biomassa, houve predominância de hormogônios (Figura 15), diferentemente do que aconteceu na curva a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na qual todos os eventos de parada na produção de biomassa foram relacionados com a diferenciação de acinetos.

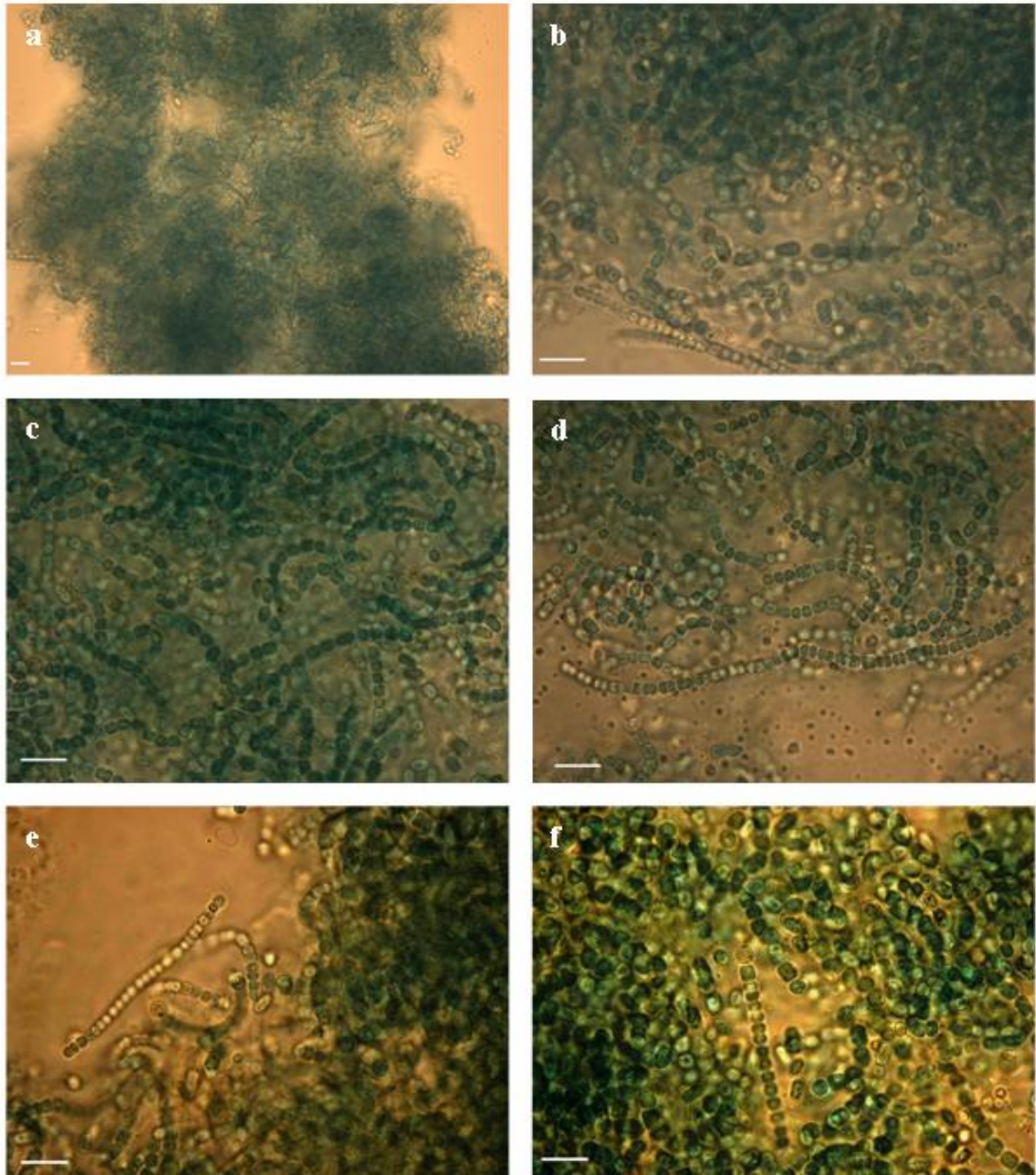


Figura 14. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI, referentes aos pontos 0 (a e b), 12 (c e d) e 24 horas (e e f). Barras = 10 μm .

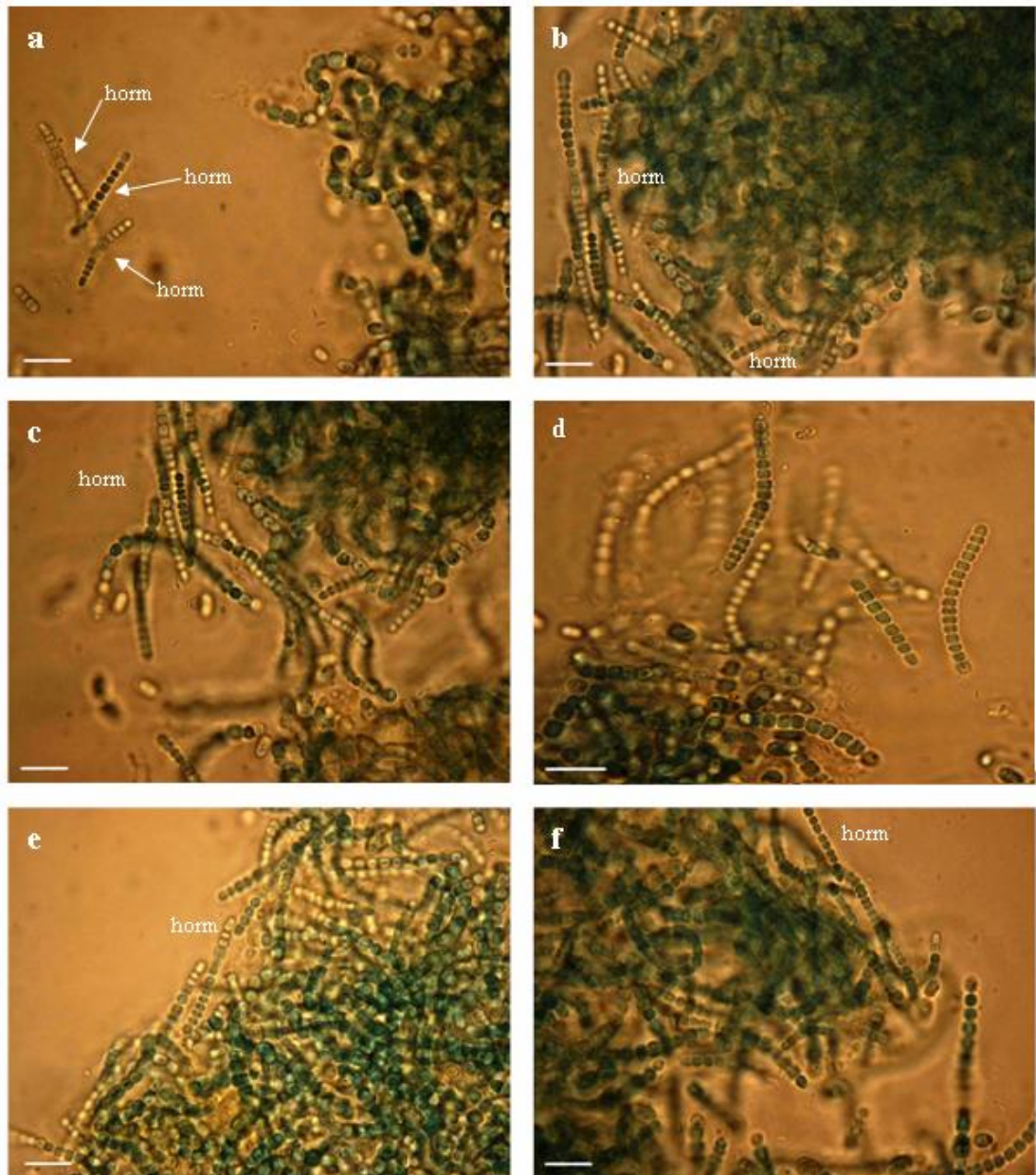


Figura 15. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI, referentes ao ponto 36 horas. As setas indicam os hormogônios. Horm = hormogônios. Barras = 10 μ m.

A partir de 60, até 84 horas, há uma segunda fase de crescimento. Muito provavelmente, esse aumento de biomassa é consequência da retomada da biossíntese, no início do desenvolvimento dos hormogônios posicionados na periferia da colônia, em novos filamentos jovens.

No ponto 84 horas, observa-se uma grande quantidade de acinetos, mas no ponto 96 horas também se observa a presença de hormogônios. Nos pontos 108 e 120 horas também são observados os mesmo tipos celulares. Todavia, há um expressivo aumento

na quantidade de acinetos acompanhado de uma expressiva queda no número de hormogônios. Portanto, os aspectos morfológicos indicam que nesta faixa, a parada de crescimento deve estar mais relacionada com a diferenciação de acinetos.

Graficamente, a fase entre 120 e 180 horas de cultivo caracteriza-se como uma nova fase de crescimento. A presença de grande quantidade de acinetos livres em suspensão sempre foi observada quando nos agregados também havia muito acineto. Logo, a retomada do crescimento possivelmente é consequência da germinação destes acinetos, que alcançaram ambientes com maior disponibilidade de energia luminosa. O ponto 180 horas apresenta grande quantidade de acinetos, condição que persiste até o final da curva. De 204 horas de cultivo em diante, há progressivamente, cada vez mais acinetos e novamente ocorre um evento de queda na produção de biomassa, semelhante ao ocorrido entre 108 e 120 horas de cultivo, e ao ocorrido na curva a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

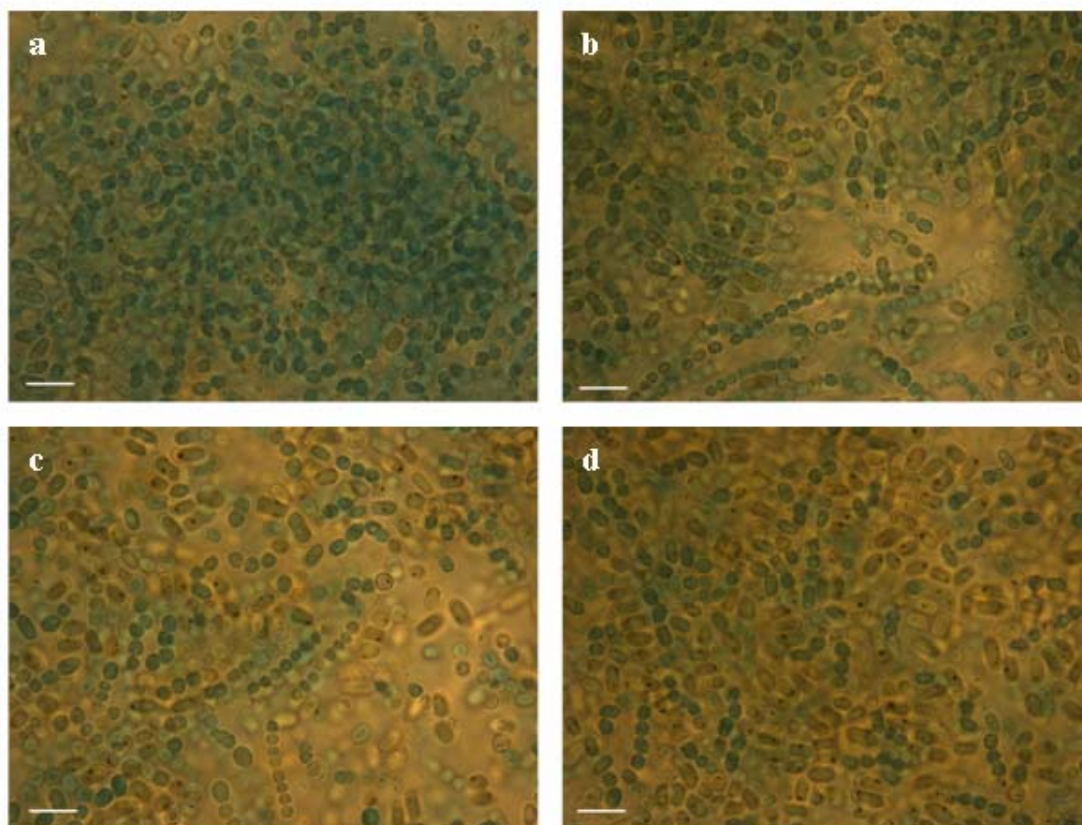


Figura 16. Fotomicrografias de *Nostoc* CCLFM XXI, referentes aos pontos 216 (a), 228 (b) e 240 horas (c e d). Barras = 10 μm .

Há relação entre a intensidade luminosa na qual *Nostoc* CCLFM XXI foi cultivado e os eventos de diferenciação celular. Quando cultivado a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não foi observada diferenciação de hormogônios em nenhum ponto. Já no cultivo a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve uma primeira parada na produção de biomassa relacionada com predominância de hormogônios. Após 84 horas verificou-se um aumento progressivo no número de acinetos.

Como já discutido anteriormente, o processo de diferenciação de acinetos é dependente de eventos de filtração seletiva da luz, que levam a uma excitação preferencial do fotossistema II (PSII), em *A. circinalis* (FAY et al., 1984). Como os heterócitos são desprovidos de PSII, e a realização da fotossíntese nesta célula é dependente unicamente do PSI, que apresenta como molécula coletora apenas clorofila *a*, a luz que chega ao interior das colônias, não é capaz de permitir a geração de ATP através da cadeia transportadora de elétrons (CTE). A diminuição do funcionamento dos heterócitos, em função de qualidades luminosas inadequadas à fotossíntese nestas células, levaria ao processo de diferenciação de acinetos.

O processo de diferenciação de hormogônios também é dependente de eventos que ocorrem na cadeia transportadora de elétrons. Comprimentos de onda que excitam preferencialmente fotossistema I (PS I), levando a uma oxidação do *pool* de plastoquinonas, desencadeiam o processo de diferenciação de hormogônios (DAMERVAL et al., 1991; CAMPBELL et al., 1993). Desta maneira, os dois processos são desencadeados pela excitação diferencial ou pela não excitação de diferentes componentes de cadeia transportadora de elétrons (CTE), em resposta a diferentes qualidades espectrais de luz.

A diferenciação de acinetos parece depender de um estresse mais intenso, uma vez que se pressupõe que sua diferenciação ocorra em condições de não excitação da CTE dos heterócitos (FAY et al., 1984). Esse estresse mais intenso foi no caso de *Nostoc* CCLFM XXI, tanto o cultivo em baixa intensidade luminosa – $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – quanto a própria atenuação da luz pelos filamentos da colônia na maior intensidade luminosa. Provavelmente, a diferenciação de acinetos apenas em fases mais adiantadas desta curva de crescimento seja em função da densidade celular mínima necessária para desencadear tal processo, como propostos por FAY et al. (1994).

Outro aspecto importante é que em intensidades luminosas acima de $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, *Nostoc* CCLFM XXI apresenta as maiores concentrações de ficocianina e

aloficocianina (Tabela 1), o que em determinadas condições pode intensificar o processo de filtração seletiva da luz em qualidades que induzem a diferenciação de hormogônios. Inicialmente, para *Nostoc* CCLFM XXI, cultivado $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o processo de diferenciação de hormogônios é preponderante sobre a diferenciação de acinetos. Sendo que a diferenciação de acinetos é mais importante no final da curva de crescimento.

5 – CONCLUSÕES

Foram obtidas culturas puras de três isolados com padrões distintos de auto-agregação e de produção de exopolissacarídeos. O uso de soluções diluídas de hipoclorito de sódio, precedido ou não de etapas de remoção de exopolissacarídeos mostrou-se eficiente no processo de remoção dos contaminantes heterotróficos.

Nostoc CCLFM I, VIII e XXI apresentaram padrões distintos de resposta à variação na intensidade luminosa de cultivo. Em *Nostoc* CCLFM I, a maior produção de biomassa foi obtida a $20 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo esta mantida constante nas maiores intensidades luminosas analisadas. Em *Nostoc* CCLFM VIII, a maior produção de biomassa foi obtida a $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem variar nas maiores intensidades. *Nostoc* CCLFM XXI apresentou maior produção de biomassa a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, também sem apresentar variação com aumentos na intensidade luminosa. Sendo que *Nostoc* CCLFM VIII e XXI apresentaram as maiores produções de biomassa.

Em *Nostoc* CCLFM I, a concentração de ficoeritrina foi máxima a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, decrescendo progressivamente após essa intensidade luminosa. Em *Nostoc* CCLFM VIII a concentração de nenhum pigmento variou em resposta à intensidade luminosa. Já em *Nostoc* CCLFM XXI, as concentrações de ficocianina e aloficocianina foram máximas a $45 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, permanecendo constantes após esta intensidade luminosa.

O pré-cultivo dos três Isolados a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e subsequente exposição a baixas intensidades luminosas permitiu a produção de biomassa apenas em *Nostoc*

CCLFM I. Possivelmente, este isolado use os exopolissacarídeos, em função do seu crescimento a $0 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Além disso, a diminuição nas concentrações de ficobiliproteínas pode indicar o seu uso como fonte de aminoácidos em condições de limitação de energia luminosa. Nestas condições de pré-cultivo e exposição ocorreu intensa diferenciação de acinetos, o que explica a não produção de biomassa nos isolados *Nostoc* CCLFM VIII e XXI.

O pré-cultivo dos três Isolados a $75 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e subsequente exposição a baixas intensidades permitiu a produção de biomassa apenas em *Nostoc* CCLFM XXI. Em *Nostoc* CCLFM I e VIII observaram-se filamentos com menores dimensões celulares além de filamentos rompidos na ligação heterócito-célula vegetativa, prováveis indicativos de diferenciação de hormogônios.

Nostoc CCLFM XXI cultivado a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mostrou uma fase log de 24 a 48 horas. Após 48 horas observaram-se pequenas variações na quantidade de biomassa, resultantes de períodos intercalados de decréscimo e incremento dessa biomassa. Possivelmente esta alternância seja explicada pela morte de algumas células, durante a diferenciação de acinetos, e germinação de acinetos fora dos agregados, respectivamente. Quando cultivado a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se mais de uma fase de crescimento, sendo estas fases intercaladas por períodos de parada no crescimento. Na primeira parada foram observadas quantidades significativas de hormogônios, e a partir da segunda parada de crescimento e em todo o restante do experimento observou-se um número crescente de acineto na cultura.

Propõe-se que a diferenciação de hormogônios tenha acontecido em momentos iniciais do cultivo a $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pois ainda ocorreu a percepção de uma disponibilidade mínima de energia luminosa. Esta seria suficiente para sustentar a retomada da biossíntese no início do desenvolvimento dos hormogônios em filamentos jovens. Por outro lado, em fases adiantadas deste cultivo, provavelmente o auto-sombreamento intensificado tenha reduzido a disponibilidade de energia luminosa abaixo deste mínimo, sendo plausível relacionar esta condição com a diferenciação de acinetos. Portanto, é compreensível a não diferenciação de hormogônios, mas sim de acinetos, desde momentos iniciais do cultivo a $15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ressalta-se a importância de avançar no conhecimento destes efeitos da intensidade luminosa em cianobactérias, pois um problema no dimensionamento e operação de foto-biorreatores é a limitação de energia luminosa em função do auto-sombreamento.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. G., DUGGAN, P. S. Heterocyst and akinete differentiation in Cyanobacteria. **New Phytologist**, v. 144, p. 1-33, 1999.

AGUIAR, R. M. **Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos.** Piracicaba: ESALQ. 1992, 122p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, 1992.

AGUSTÍ, S., PHILIPS, E. J. Light absorption by cyanobacteria: implications of the colonial growth form. **Limnology and Oceanography**, v.37, n.2, p.434-441, 1992.

ALLEN, M. M. Methods for cyanophyceae. In: STEIN, J. K. (Ed.). **Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements.** New York: Cambridge Univ., p.127-138. 1973.

ANGERMAYR, S. A., HELLINGWERF, K. J., LINDBLAD, P., de MATTOS, M. J. T. Energy biotechnology with cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 257-263, 2009.

ARGUETA, C., YUKSEK, K., PATEL, R., SUMMERS, M. L. Identification of *Nostoc punctiforme* akinete-expressed genes using differential display. **Molecular Microbiology**, v. 61(3), p. 748-757, 2006.

ARMSTRONG, R. E., HAYES, P. K., WALSBY, A. E. Gas vacuole formation in hormogonia of *Nostoc muscorum*. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 263-270, 1983.

BALD, D., KRUIP, J., RÖGNER, M. Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems? **Photosynthesis Research**, v. 49, p. 103-118, 1996.

BERBEROGLU, H., YIN, J., PILON, L. Light transfer in bubble photobioreactors for H₂ production and CO₂ mitigation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 2273-2285, 2007.

BICUDO, C. E. M. e BICUDO, R. M. F. In: BICUDO, C. E. M. (Ed.). **Algas de águas continentais brasileiras: Chave ilustrada para identificação de gêneros**. São Paulo: Editora USP, 1970.

BRIONES, M. P. P., MARTINEZ-GOSS, M. R. Response of *Nostoc commune* Vauch. To different irradiances and photoperiods. **Asia Life Sciences**, v. 3(1), p. 11-20, 1994.

CAMPBELL, E. L., MEEKS, J. C., Characteristics of hormogonia formation by symbiotic *Nostoc* spp in response to the presence of *Anthoceros punctatus* or its extracellular products. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 125-131, 1989.

CAMPBELL, D. HOUMARD, J., TANDEAU de MARSAC, N. Electron transport regulates cellular differentiation in the filamentous cyanobacterium *Calothrix*. **The Plant Cell**, v.5, p. 451-463, 1993.

CAMPBELL, D. Relations entre L'environnement, le métabolisme intermédiaire et la différenciation cellulaire chez une cyanobactérie filamenteuse. **Bulletin d'Institut Pasteur**, v. 92, p. 27-43, 1994.

CAMPBELL, D. Complementary chromatic adaptation alters photosynthetic strategies in the cyanobacterium *Calothrix*. **Microbiology**, v. 142, p. 1255-1263, 1996.

CAMPBELL, E. L., WONG, F. C. Y., MEEKS, J. C. DNA binding properties of the HrmR protein of *Nostoc punctiforme* responsible for transcriptional regulation of genes involved in the differentiation of hormogonia. **Molecular Microbiology**, v. 47(2), p. 573-582, 2003.

CAMPBELL, E. L. Global gene expression patterns of *Nostoc punctiforme* in steady-state dinitrogen-grown heterocyst-containing cultures and at single time points during differentiation of akinetes and hormogonia. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 5247-5256, 2007.

CHOUDHURY, A. T. M. A., KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for system of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biological Fertility Soils**, v. 39, p. 219-227, 2004.

COHEN, M. F., MEEKS, J. C. A hormogonium regulating locus, hrmUA, of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its response to an extract of a symbiotic plant partner *Anthoceros punctatus*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, p. 280-289, 1997.

DAMERVAL, T., GUGLIELMI, G.L., HOUMARD, J.L., TANDEAU de MARSAC, N. Hormogonium differentiation in the cyanobacterium *Calothrix*: a photoregulated developmental process. **The Plant Cell**, v.3, p. 191-201, 1991.

DESIKACHARY, T. V. **Cyanophyta**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research, 1959, 686p.

DOUGLAS, D., PEAT, A., WHITTON B. A., WOOD, P. Influence of iron status on structure of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*. **Cytobios**, v. 47, p. 155-165, 1986.

ESPER, B., BADURA, A., RÖGNER, M. Photosynthesis as a power supply for (bio-) hydrogen production. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 543-549, 2006.

FAY, P., LYNN, J. A., MAJER, S. C. Akinete development in the planktonic blue-green alga *Anabaena circinalis*. **European Journal of Phycology**, v. 19(2), p. 163-173, 1984.

FIORE, M. F., MOON, D. H., TSAI, S. M., LEE, H., TREVORS, J. T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 159-169, 2000.

FLORES, E., HERRERO, ANTONIA. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature Reviews**, v. 8, p. 39-49, 2010.

GIDUGU, V. R. **Parametric study of light intensity on the growth rate of “*Chroocloeocystis siderophila*” in a photo-bioreactor**. Ohio-USA, 2007, 161 p. Tese (Mestrado) – Russ College of Engineering and Technology, 2007.

GIOVANNONI, S. J., TURNER, S., OLSEN, G. J, BARNS, S., LANE, D. J., PACE, N. R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3584-3592, 1988.

GLAZER, A. N. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: STUMPF, P. K., CONN, E. E. (Eds). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic, 1981. p. 51-96.

GLAZER, A. N., MELIS, A. Photochemical reaction centers: structure, organization, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p.11-45, 1987.

GLAZER, A. N., GINDT, Y. M., CHAN, C. F., SAUER, K. Selective disruption of energy flow from phycobilisomes to photosystem I. **Photosynthesis Research**, v. 40, p. 167-173, 1994.

GROSSMAN, A. R., SCHAEFER, M. R., CHIANG, G. G., COLLIER, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiology Reviews**, v. 57, p. 725-749, 1993.

HERDMAN, M. Akinetes: structure and function. In: FAY, P. VAN, B. C. (Ed.). **The Cyanobacteria**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p.227-250. 1987.

HERDMAN, M. RIPPKA, R. Cellular differentiation: Hormogonia and baeocytes. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 232-242, 1988.

HOICZYK, E., BAUMCISTER, W. Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 2387-2395, 1995.

ISLAM, M. R., WHITTON, B. A. Phosphorus content and phosphatase activity of the deepwater rice-field cyanobacterium (blue-green algae) *Calothrix* D764. **Microbios**, v. 69, p. 7-16, 1992.

JORGENSEN, B. B., COHEN, Y., MARAIS, D. J. D. Photosynthetic action spectra and adaptation to spectral light distribution in a benthic cyanobacterial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 879-886, 1987.

KANGATHARALINGAM, N., DODDS, W. K., PRISCU, J. C. Nitrogenase activity, photosynthesis, and the degree of heterocyst aggregation in the Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. **Journal of Phycology**, v. 27, p. 680-686, 1991.

KLINT, J., RAN, L., RASMUSSEN, U., BERGMAN, B. Identification of developmentally regulated proteins in cyanobacterial hormogonia using a proteomic approach. **Symbiosis**, v. 41, p. 87-95, 2006.

KNIGHT, C. D., ADAMS, D. G. A method for studying chemotaxis in nitrogen fixing cyanobacterium-plant symbiosis. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 73-77, 1996.

KNOLL, A. H. In: HERRERO, A. e FLORES, E. (Ed.). **The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution**. Norfolk: Caister Academic, p.1-19. 2008.

KOMÁREK, J., ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classifications system of cyanophytes. 4- Nostocales. **Archives on Hydrobiological Supplied**, v. 82, p. 243-345, 1989.

LAZAROFF, N., VISHNIAC, W. The relationship of cellular differentiation to colonial morphogenesis of the blue-green alga, *Nostoc muscorum* A. **Journal of General Microbiology**, v. 35, p. 447-457, 1973.

LEE, D. Y., RHEE, G. Y. Kinetics of growth and death in *Anabaena flos-aquae* (Cyanobacteria) under light limitation and supersaturation. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 700-709, 1999.

LEGANÉS, F. Genetic evidence that hepA gene is involved in the normal deposition of the envelop of both heterocyst and akinete in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **FEMS Microbiological Letters**, v. 123, p. 63-68, 1994.

LI, D. H., CHEN, L. Z., LI, G. B., WANG, G. H., SONG, L. R., LIU, Y. D. Photoregulated or energy dependent process of hormogonia differentiation in *Nostoc sphaeroides* Kützing (Cyanobacterium). **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, p. 709-716, 2005.

MEEKS, J. C., CAMPBELL, E. L., SUMMERS, M. L., WONG, F. C. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Archieve of Microbiology**, v. 178, p. 395-403, 2002.

MEEKS, J. C., ELHAI, J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacterium in free-living and plant-associated symbiotic growth states. **Microbiology Molecular Biological Review**, v. 66. p. 94-121, 2002.

MORENO, J., VARGAS, M. Á., RODRÍGUEZ, H., RIVAS, J., GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 191-197, 2003.

MULLINEAUX, C. W. Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1184, p. 71-77, 1994.

NASCIMENTO, A. G. **Métodos de purificação e efeitos da qualidade espectral da luz em *Nostoc* spp.** Viçosa, MG: UFV, 1999, 63p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

OLAIZOLA, M., DUERR, E. O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 97-104, 1990.

OLIVERA-RAMÍREZ, R., CORIA-CEDILLO, M., CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O., MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F., PONCE-NOYOLA, T., RÍOS-LEAL, E. Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 121-124, 2000.

OTERO, A., VINCENZINI, M. Nostoc (Cyanophyceae) goes nude: Extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 74-81, 2004.

PAERL, H.W. Nutrient and Other Environmental Controls of Harmful Cyanobacterial Florations along the Freshwater-marine continuum. Pp 217-237. *In*:H.K. Hudnell(ed). Cyanobacterial Harmful Algal Floraciones: state of Science and Research Needs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 619, p. 213-217, 2008.

PAUMANN, M., REGELSBERGER, G., OBINGER, C., PESCHEK, G. A. The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** 1707, p. 231-253, 2004.

PINZON-GAMEZ, N. M. **Heterocystous N₂-fixing cyanobacteria: Modeling of culture profiles, effect of red light, and cell flocculation study.** 2006, 63p. Thesis (Magister) – University of Akron, 2006.

PLOUG, H., LASSEN, C., JORGENSEN, B. B. Action spectra of microalgal photosynthesis and depth distribution of spectral scalar irradiance in a coastal marine sediment of Limfjorden, Denmark. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 12, p. 69-78, 1993.

PRUFERT-BEBOUT, L., PAERL, H. W., LASSEN, C. Growth, nitrogen fixation, and spectral attenuation in cultivated *Trichodesmium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1367-1375, 1993.

PULZ, O., GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.65, p. 635-648, 2004.

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

RASMUSEN, U., JOHANSSON, C., BERGMAN, B. Early communication in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: Plant-induced cell differentiation and protein synthesis in the cyanobacterium. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 7, p. 696-702, 1994.

RICKARD, A. H., Mc BAIN, A. J., LEDDER, R. G., HANDLEY, P.S., GILBERT, P. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 133-140, 2003.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., STANIER R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RIPPKA, R., HERDMAN, M. Division patterns and cellular differentiation in cyanobacteria. **Annals of Microbiology (Institute Pasteur)**, v. 136A, p. 33-39, 1985.

ROGER, P. A., KULASOORIYA, S. A. **Blue-green algae and rice**. Los Bânos, Philippines: The International Rice Research Institute, 1980. 112p.

ROGER, P. A., WATANABE, I. Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentials, current usage and limiting factors. **Fertility Research.**, v. 9, p. 39-77, 1986.

ROUG, D., DOMINY, P. State adaptations in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 (PCC): dependence on light intensity or spectral composition? **Photosynthesis Research**, v. 40, p. 107-117, 1994.

RUPPRECHT, J., HANKAMER, B., MUSSGUNG, J. H., ANANYEV, G., DISMUKES, C., KRUSE, O. Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 72, p. 442-449, 2006.

SENDERSKY, E., LAHMI, R., SHALTIEL, J., PERELMAN, A., SCHWARZ, R. NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. **Molecular Microbiology**, v. 58 (3), 659-668, 2005.

SHI, T., FALKOWSKI, P. G. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 2510-2515, 2008.

SOLTANI, N., KHAVARI-NEJAD, R. A., YAZDI, M. T., SHOKRAVI, S. FERNÁNDEZ-VALIENTE, E. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different

irradiance and pH values. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 571-576, 2006.

TANDEAU de MARSAC, N. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 130, p. 82-91, 1977.

TANDEAU de MARSAC, N., HOUMARD, J. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 318-128, 1988.

TANDEAU de MARSAC, N. Differentiation of Hormogonia and Relationship with other biological process. In: BRYANT, D. A. (Ed.). **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.825-842. 1994.

TRUBITSIN, B. V., PTUSHENKO, V. V., KOKSSHAROVA, O. A., MADEMOV, M. D., VITUKHNOVSKAYA, L. A., GRIGOR'EV, I. A., SEMENOV. A. Y., TIKHONOV, A. N. EPR study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1708, p. 238-249, 2005.

VALIENTE, E. F., LEGANES, F. Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in the Cyanobacterium *Nostoc* UAM 205. **Journal of Plant Physiology**, v. 135, p. 623-627, 1989.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1985.

WOLK, C. P. Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. **Journal of Bacteriology**, v. 96, p. 2138–2143, 1968.

WOLK, C. P., ERNST, A., ELHAI, I. Heterocyst metabolism and development. In: BRYANT, D. A. (editor). *The molecular Biology of cyanobacteria*. Kluwer, Boston, p. 769-823, 1994.

WOOD, P., PEAT, A., WHITTON B. A. Influence of phosphorus status on fine structure of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*. **Cytobios**, v. 47, p. 89-99, 1986.

WYMAN, M., FAY, P. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria). II. The influence of light quality. **Proceedures of the Royal Society. London B**, v. 227, p. 381-393, 1986.

WU, X., ZARKA, A., BOUSSIBA, S. A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 385-392, 2000.

ZHANG, C, LAURENT, S., SAKR, S., PENG, L., BÉDU, S. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. **Molecular Microbiology**, v.59 (2), p. 367-375, 2006.