

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Efeitos da Temperatura, Fósforo e Luz no crescimento da
cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska)
Seenayya et Subba Raju do reservatório de Alagados, Paraná**

Curitiba
2013

JULIANA WOJCIECHOWSKI

**Efeitos da Temperatura, Fósforo e Luz no crescimento da
cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska)
Seenayya et Subba Raju do reservatório de Alagados, Paraná**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, linha de pesquisa em Taxonomia, biologia e diversidade de algas e líquens, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador

Prof. Dr. Luciano F. Fernandes

Curitiba

2013

*Dedico a Josefina Bricci Manzotti
que, em vida, não pode ver mais
esse sonho realizado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo, Dr. Luciano F. Fernandes, por estar comigo desde o início dessa jornada, despertando em mim a paixão pelas algas tóxicas. Agradeço a especial confiança e por ter aceitado o desafio de cultivar comigo as cianobactérias. Minha admiração e gratidão.

Ao meu pai, William J. Wojciechowski, por sempre me incentivar e sofrer junto comigo.

A toda minha família, em especial a minha irmã, Amanda Wojciechowski, minha grande companheira.

Ao meu melhor amigo e namorado, Lincon M. Nasser, que esteve comigo em todos os momentos, não só de alegria, mas de tristeza, de angústia e mau humor. Pelas perguntas desafiadoras, pelas conversas sobre como mudar o mundo, por fingir estar acordado nas minhas apresentações e por todo amor e carinho.

Aos colegas de laboratório Emanuela Castro, Kaoli Cavalcante, Arielli K. Straube, Flávia E. Miranda, Priscila Tremarin e Eduardo Freire, assim como Mariana C. Feres e Denise M. Faria (ainda considero), pelo convívio, almoços, sugestões, conselhos e divertidos congressos. Ao Carlos E. J. A. Tibiriça por estar sempre empolgado, disposto a ajudar e a discutir minhas estatísticas. A Fernanda V. B. Fonseca e Kathleen L. Kolb pelos finais de semana passados na UFPR, feriados, férias e todo o trabalho que tivemos.

A Vinicius S. Richardi, Vanessa M. Ribeiro, Luísa P. Miranda e Ligia Strey que estão sempre comigo nos momentos importantes da minha vida.

A Dra. Thelma V. Ludwig pelas correções e pelo incentivo.

Aos colegas de mestrado que estiveram comigo dividindo as angústias de escrever uma dissertação, pelas conversas, pelas risadas e pelo companheirismo.

Aos amigos “não biólogos”, Yuri Missau Capobianco, Nayana Urnau, Marcella Lazarini, Robson Missau Olbertz e Surya Martins, por compreender a ausência involuntária durante esses dois anos (espero que aguentem mais quatro).

A banca composta pelo Dr. Luis Aubriot, Dr. André A. Padiã e, sempre ela, Dra. Priscila Tremarin, pelo tempo dedicado, correções e sugestões.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Botânica pela oportunidade e pelo orgulho de fazer parte dessa história.

A Capes pela bolsa de mestrado.

A Dra. Marguerite Quoirin por nos permitir utilizar as instalações do laboratório de Micropropagação Vegetal e aos colegas que trabalham lá, especialmente João H. Delfrate, Rodrigo Cordeiro e Cristina Batista Franceschi, pela imensa ajuda.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, agradecimento especial a Marilina.

A SANEPAR pela experiência de estágio durante a graduação, que ajudou a despertar minha paixão pela limnologia. Em especial ao Dr. Cleverton V. Andreoli, minha admiração, a Dra. Kelly Gutseit, sem palavras por tudo, ao querido chefe Dr. Charles Carneiro, pela atenção sempre que preciso de dados sobre os reservatórios paranaenses, e ao Dr. Mauricio B. Scheer, por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação. Em especial a unidade da SANEPAR em Ponta Grossa pela acolhida, a todo o pessoal do laboratório, ao gerente regional Leandro Ricardo Marcondes Ribas por nos receber e pela atenção dispendida e ao seu Carlos pela imensa ajuda nas coletas.

A PETROBRAS pelo financiamento dos materiais necessários para a realização desse e outros estudos através do “Projeto Interdisciplinar sobre Eutrofização na Bacia do Rio Verde, Araucária, PR”.

E a Deus por me colocar nesse caminho, sem nunca desanimar, e me dar a oportunidade de conhecer essas pessoas que fizeram de mim o que eu sou.

Meu muito obrigada!

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor” (Goethe)

RESUMO

A dominância das cianobactérias na comunidade fitoplanctônica depende de um conjunto de fatores ambientais reguladores do seu crescimento, como temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes. Quando as condições ambientais são favoráveis, pode ocorrer um crescimento intensivo dessas microalgas, originando uma floração. Os gatilhos ambientais que promovem esses fenômenos podem ser determinados por meio de estudos laboratoriais, a fim de entender as estratégias ecológicas, bem como controlar as causas e os efeitos da deterioração ambiental. *Cylindrospermopsis raciborskii* é um cianobactéria filamentosa que possui comportamento altamente invasivo e está entre as espécies tóxicas que mais causam problemas em reservatórios destinados ao abastecimento público por todo o mundo. O objetivo central deste trabalho foi investigar os efeitos de fatores reguladores (temperatura, luz, fósforo reativo) sobre o crescimento da cianobactéria *C. raciborskii* isolada do reservatório de Alagados, PR, em condições de cultivo laboratorial. Para isso foram realizados experimentos de crescimento de *C. raciborskii* em nove intensidades luminosas, quatro temperaturas e quatro concentrações de fósforo. A taxa de crescimento da cepa de *C. raciborskii* foi calculada em cada um dos tratamentos e, além disso, a morfologia dos tricomas foi acompanhada. A partir dos resultados concluiu-se que (1) a cepa responde morfologicamente as condições ambientais as quais é submetida, demonstrando grande plasticidade morfofisiológica e capacidade de adaptação; (2) o crescimento da cepa pode ser acelerado em condições de temperaturas mais elevadas, podendo ser favorecida pelo aquecimento global em detrimento das outras espécies do fitoplâncton; (3) o fósforo reativo pode desempenhar um importante papel na regulação do crescimento de *C. raciborskii* em temperatura e luminosidade altas; (4) a cepa do reservatório de Alagados parece estar adaptada às concentrações de fósforo que ocorrem no ambiente do qual foi isolada.

Palavras-chave: Fatores reguladores, experimento, morfologia, cultivo, subtropical

ABSTRACT

The dominance of cyanobacteria in the phytoplankton community depends on a set of environmental factors regulating its growth like temperature, light intensity and nutrient concentration. When the environmental conditions are favourable an intensive growth of these microalgae can occur originating a bloom. The environmental triggers that promote these phenomena can be determined by laboratorial studies in order to understand its ecological strategies, as well as to control the causes and the effects of environmental deterioration. *Cylindrospermopsis raciborskii* is a filamentous cyanobacterium that possesses highly invasive behavior and is among the toxic species that cause most of the problems in reservoirs destined to the public supplying in the whole world. The central aim of this work was determine the effects of regulatory factors (temperature, light, reactive phosphorus) on the growth of the cyanobacterium *C. raciborskii* isolated from the Alagados reservoir, PR. For growth experiments *C. raciborskii* was cultured in nine light intensities, four temperatures and four concentrations of phosphorus. The growth rate was calculated in each one of treatments and, moreover, the trichome morphology was accompanied. Results showed that (1) the strain responded morphologically to the controlled environmental conditions, demonstrating great morphophysiological plasticity and adaptability, (2) the strain growth can be accelerated in conditions of higher temperatures, and favored *C. raciborskii* in detriment to the other phytoplankton species; (3) reactive phosphorus can play an important role in the growth regulation of *C. raciborskii* in both high temperature and luminosity, and that (4) the strain of Alagados reservoir seems to be adapted to the phosphorus concentrations occurring in the environment from which it was isolated.

Key words: *Cylindrospermopsis*, regulating factors, experiment, morphology, culture, subtropical.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	OCORRÊNCIA DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> POR CONTINENTE.	5
TABELA 2	OCORRÊNCIA DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> EM RESERVATÓRIOS BRASILEIROS POR ESTADOS.	5
TABELA 3	COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS RESERVATÓRIOS PARANAENSES UTILIZADOS PARA O ABASTECIMENTO PÚBLICO.	18
TABELA 4	DIMENSÕES DOS TRICOMAS DE CEPAS DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> DE DIFERENTES REGIÕES DO GLOBO.	46
TABELA 5	DIMENSÕES DOS HETERÓCITOS E ACINETOS DE CEPAS DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> DE DIFERENTES REGIÕES DO GLOBO.	47
TABELA 6	INTENSIDADES LUMINOSAS UTILIZADAS DURANTE O EXPERIMENTO DE LUZ VARIÁVEL E CÓDIGOS REFERENTES AOS CULTIVOS SUBMETIDOS A CADA UMA DELAS.	57
TABELA 7	CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, INTENSIDADE LUMINOSA E CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO REATIVO ÀS QUAIS FORAM SUBMETIDOS OS CULTIVOS DURANTE O EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> E OS CÓDIGOS REFERENTES A CADA UM DOS TRATAMENTOS.	75
TABELA 8	RESULTADO DO TESTE DE TUKEY HSD.	77
TABELA 9	TAXA DE CRESCIMENTO ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) DOS CULTIVOS SUBMETIDOS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS ORGANIZADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO REATIVO.	82
TABELA 10	COEFICIENTES DE TEMPERATURA ($Q_{10 \ 16-27}$) CALCULADOS PARA A CEPA DE <i>C. raciborskii</i> CYL04 CULTIVADA SOB DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS E CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO REATIVO.	82
TABELA 11	TAXAS DE CRESCIMENTO MÁXIMO ($\mu_{\text{máx}}$) DE CEPAS DE <i>C. raciborskii</i> ISOLADAS DE DIFERENTES LOCAIS.	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MAPA DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS EM PONTA GROSSA, PARANÁ, COM INDICAÇÃO DO PONTO DE COLETA.	14
FIGURA 2	DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS (célis.mL ⁻¹) NO PONTO DE CAPTAÇÃO (ANTES DO TRATAMENTO) DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2006 A FEVEREIRO DE 2011.	15
FIGURA 3	CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO TOTAL E REATIVO (mg.L ⁻¹) NA BARRAGEM DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS ENTRE 2008 E 2011.	16
FIGURA 4	TEMPERATURA (°C) DA ÁGUA SUPERFICIAL DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS ENTRE FEVEREIRO DE 2008 E ABRIL DE 2010.	17
FIGURA 5	CONDIÇÕES DE pH NO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS DE 2008 A 2011.	17
FIGURA 6	RADIAÇÃO SOLAR (W.m ⁻²) INCIDENTE NA REGIÃO DO RESERVATÓRIO (LATITUDE 25° 25' 40" S) DURANTE UM DIA DE VERÃO E OUTRO DE INVERNO.	19
FIGURA 7	VISTA INTERNA DA INCUBADORA.	22
FIGURA 8	MORFOLOGIA DO ÁPICE DO TRICOMA DA CEPA DE <i>C. raciborskii</i> CYL04.	39
FIGURA 9	DETALHES DOS TRICOMAS DE <i>C. raciborskii</i> .	39
FIGURA 10	PORCENTAGEM DE TRICOMAS COM HETERÓCITOS PRESENTE OU AUSENTE EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE TRICOMAS POR AMOSTRA A PARTIR DO INÍCIO DO CULTIVO.	40
FIGURA 11	TRICOMAS DA CEPA CYL04 COM MORFOLOGIAS DIFERENTES.	41
FIGURA 12	DIFERENTES MORFOLOGIAS DOS TRICOMAS DE <i>C. raciborskii</i> CYL04 DURANTE AS FASES DE CRESCIMENTO DO CULTIVO.	42
FIGURA 13	MORFOLOGIA DOS TRICOMAS COLETADOS NO INÍCIO DA FASE DE CRESCIMENTO EXPONENCIAL.	43
FIGURA 14	MORFOLOGIA DE TRICOMAS DE <i>C. raciborskii</i> PROVENIENTES DE UM CULTIVO EM FASE DE ESTABILIZAÇÃO.	43
FIGURA 15	CORES DOS CULTIVOS DE <i>C. raciborskii</i> EM DIFERENTES FASES DO CRESCIMENTO.	44
FIGURA 16	FORMAÇÃO DE NATA NOS CULTIVOS DE <i>C. raciborskii</i> EM FASE DE DECAÍMENTO.	44
FIGURA 17	CRESCIMENTO DOS CULTIVOS DE <i>C. raciborskii</i> MANTIDOS EM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS COM BASE NA DENSIDADE ÓTICA (ABSORBÂNCIA A 750 nm).	59
FIGURA 18	TAXA DE CRESCIMENTO (μ.dia ⁻¹) DE <i>C. raciborskii</i> QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS, COM A INDICAÇÃO DO I_k CALCULADO PARA A CEPA CYL04.	60

FIGURA 19	COMPARAÇÃO ENTRE O TAMANHO MÉDIO (μm) DOS TRICOMAS DE <i>C. raciborskii</i> QUANDO SUBMETIDA A INTENSIDADE LUMINOSA BAIXA ($L_9 = 9 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), MÉDIA ($L_{100} = 100 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) E ALTA ($L_{250} = 250 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$).	61
FIGURA 20	CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	77
FIGURA 21	CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS.	78
FIGURA 22	CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E INTENSIDADES LUMINOSAS.	79
FIGURA 23	CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO REATIVO.	79
FIGURA 24	MORFOLOGIA DOS TRICOMAS DA CEPA CYL04 CULTIVADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SRP.	80
FIGURA 25	CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO REATIVO.	81
FIGURA 26	TAXAS DE CRESCIMENTO ($\mu.\text{dia}^{-1}$) DA CEPA CYL04 SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.	82
FIGURA 27	ALEATORIZAÇÃO DA POSIÇÃO DOS FRASCOS NA INCUBADORA.	105
FIGURA 28	CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM BASE EM DIFERENTES METODOLOGIAS DE ACOMPANHAMENTO.	107
FIGURA 29	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ABUNDÂNCIA CELULAR ($\text{c\acute{e}lulas.mL}^{-1}$) A PARTIR DA LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm).	109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Cianobactérias	1
1.2 O gênero <i>Cylindrospermopsis</i>	2
1.3 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e toxicidade	2
1.4 Distribuição geográfica	4
1.5 Ecologia	6
1.6 Expansão geográfica de <i>C. raciborskii</i>	9
1.7 Estudos laboratoriais com cepas brasileiras de <i>C. raciborskii</i>	10
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 Local de coleta das cepas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	14
3.2 Florações de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e produção de toxinas no reservatório de Alagados	15
3.3 Características físico-químicas do reservatório	16
3.4 Comparação com outros reservatórios paranaenses destinados ao abastecimento público	18
3.5 Modificação do meio de cultivo	21
3.6 Isolamento das cepas	22
3.7 Análises estatísticas	23
4 REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS TRICOMAS DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> CYL04 ISOLADA DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS, PARANÁ	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODO	37
3 RESULTADOS	38
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÕES	50
6 REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO DE UMA CEPA DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ISOLADA DE UM RESERVATÓRIO SUBTROPICAL	55
1 INTRODUÇÃO	56

2 MATERIAL E MÉTODO	57
3 RESULTADOS	59
4 DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÕES	66
5 REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA TEMPERATURA, INTENSIDADE LUMINOSA E CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO REATIVO NO CRESCIMENTO DE <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju (Cyanobacteria)	70
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODO	73
3 RESULTADOS	76
4 DISCUSSÃO	83
5 CONCLUSÕES	98
5 REFERÊNCIAS	99
APÊNDICES	104
APÊNDICE 1 – Testes preliminares para a realização das curvas de crescimento	105
1 Curvas de crescimento	107
2 Considerações finais	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procariontes, fotoautotróficos e aeróbicos (GRAHAM; WILCOX, 2000; BICUDO; MENEZES, 2005) incluídos no grupo das algas (YOO *et al.*, 1995), porém bastante próximos das bactérias (CHORUS; BARTRAM, 1999; LEE, 2005). A classificação das cianobactérias segue a nomenclatura botânica, sendo conhecidas como Cyanophyceae. Esse grupo foi, provavelmente, o primeiro a liberar oxigênio na atmosfera primitiva. Atualmente, esses organismos são importantes produtores primários em ambientes de água doce, com alto valor nutritivo para níveis tróficos superiores (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Contudo, as cianobactérias podem causar também alguns prejuízos em diversas situações. Por exemplo, em ambientes que recebem grandes quantidades de nutrientes (especialmente fósforo e nitrogênio), pode ocorrer o desenvolvimento de densas populações desse grupo, que passa a dominar o ambiente. Esse crescimento intensivo origina um fenômeno denominado floração (ESTEVES, 1998). As florações em corpos de água levam a progressiva degradação do ambiente, além de causar severos problemas práticos para o abastecimento público (CHORUS; BARTRAM, 1999). Essas florações são frequentemente precedidas por enriquecimento de nutrientes, que coincidem com mudanças ambientais, como estratificação ou elevação da temperatura da água (PAERL, 1990; REYNOLDS, 1998).

A dominância de determinadas espécies na comunidade fitoplanctônica depende de um conjunto de fatores ambientais, como propriedades físicas (estabilidade da coluna de água, tempo de retenção, temperatura) e químicas (concentração de nutrientes, pH, oxigênio dissolvido) da água, assim como de interações biológicas (competição, herbivoria) (REYNOLDS, 1998; REYNOLDS *et al.*, 2002). As cianobactérias dominam a comunidade fitoplanctônica nos ecossistemas lacustres brasileiros, que possuem características adequadas ao desenvolvimento do grupo (HUSZAR; SILVA, 1999).

O problema das florações pode ser agravado pelo fato de que algumas cianobactérias são capazes de produzir toxinas (CARMICHAEL, 1992), em certos

casos, muito potentes. Além de causar intoxicação, as cianotoxinas podem levar à morte animais selvagens, rurais, domésticos e também o próprio homem (YOO *et al.*, 1995; AZEVEDO, 1996). Um severo episódio de intoxicação por cianotoxina ocorreu em 1996 em um centro de hemodiálise no estado de Pernambuco, quando 60 pacientes morreram devido ao uso de água contaminada por cianotoxina (AZEVEDO, 1996; JOCHIMSEN *et al.*, 1998; BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003).

1.2 O gênero *Cylindrospermopsis*

Entre as cianobactérias tóxicas, o gênero *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju [Ordem Nostocales, Família Nostocaceae, sistema de classificação de Komárek e Anagnostidis (2005)] possui nove espécies descritas (KOMÁREK; HAUER, 2004), todas planctônicas de águas continentais, sendo que algumas podem ser formadoras de florações tóxicas ou não tóxicas (MIHALI *et al.*, 2008). Representantes do gênero apresentam talo filamentosos, sem bainha mucilagínosa. Os tricomas são atenuados em direção às extremidades, podendo ser retos, curvos, sigmóides ou espiralados. Heterócitos terminais e acinetos subterminais podem ocorrer, sendo relacionados, respectivamente, à fixação de N₂ e à resistência as condições ambientais desfavoráveis. As células vegetativas possuem aerótopos e são cilíndricas (BICUDO; MENEZES, 2005).

1.3 *Cylindrospermopsis raciborskii* e toxicidade

Cylindrospermopsis raciborskii Seenayya et Subba Raju (1972) é a espécie com maior distribuição (PADISÁK, 1997), produzindo florações cada vez mais frequentes em reservatórios no mundo todo (BRIAND *et al.*, 2004). Representantes dessa espécie podem ser encontrados em rios ou reservatórios recém-construídos, indicando um alto nível de adaptações ecofisiológicas (PADISÁK, 1997).

Essa cianobactéria foi isolada pela primeira vez de lagos da Indonésia (KOMÁRKOVÁ, 1998) e descrita como um microorganismo tropical (WOLOSZYNSKA, 1912), sendo considerada não tóxica por um longo tempo, até

serem observadas cepas produtoras de diferentes grupos de toxinas (PADISÁK, 1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* pode produzir um conjunto de compostos potencialmente tóxicos, todavia nem todas as cepas os produzem (BURFORD; DAVIS, 2011). Entre os compostos produzidos estão o alcalóide hepatotóxico cilindrospermopsina (**CYL**) (HAWKINS *et al.*, 1985; PADISÁK, 1997; SAKER; THOMAS; NORTON, 1999) e os neurotóxicos saxitoxina (**SAX**) (LAGOS *et al.*, 1999; MOLICA *et al.*, 2002) e anatoxina-a (**ANA-a**) (CHORUS; BARTRAM, 1999), bem como outros análogos, muitos ainda não identificados (FASTNER *et al.*, 2003; SAKER *et al.*, 2003). Recentemente foram identificadas cepas portuguesas consideradas não tóxicas a partir dos métodos utilizados rotineiramente, mas que por outro lado demonstram toxicidade quando submetidas a bioensaio com ratos (SAKER *et al.*, 2003). Esse fato coloca em questão a suficiência das análises de rotina utilizadas para detectar a toxicidade das águas destinadas ao abastecimento público.

De maneira geral, algumas cepas australianas produzem CYL, enquanto algumas cepas brasileiras produzem SAX (NEILAN; SAKER; FASTNER, 2003). Uma cepa italiana de *C. raciborskii* também foi relacionada à produção de CYL (MESSINEO *et al.*, 2010). CYL pode ter sido a toxina responsável por um incidente ocorrido em Palm Island, Austrália, em 1979, quando cerca de 150 pessoas foram intoxicadas e muitas tiveram que ser hospitalizadas com sintomas de hepatoenterites (BOURKE *et al.*, 1983; HAWKINS *et al.*, 1985; MCGREGOR; FABBRO, 2000). *Cylindrospermopsis raciborskii* não é a única produtora de CYL, outras cianobactérias como *Anabaena bergii* Ostefeld, *Aphanizomenon ovalisporum* Forti e algumas espécies do gênero *Raphidiopsis* Fritsch et Rich também podem produzir essa toxina (GRIFFITHS; SAKER, 2003). Alguns autores sugerem que essa toxina pode ser também carcinogênica (FALCONER; HUMPAGE, 2001; MCGREGOR; FABBRO, 2000; HUMPAGE *et al.*, 2000).

A SAX é uma cianotoxina com alta toxicidade quando comparada a outras moléculas produzidas por *C. raciborskii*. Em bioensaio, a dose necessária de SAX para matar 50% da população de ratos (LD₅₀) em 24 horas é de 260 µg.kg⁻¹ em dose oral única. Outras toxinas produzidas, como a CYL (LD₅₀ de 2100 µg.kg⁻¹) (OHTANI *et al.*, 1992) e a ANA-a (LD₅₀ maior que 5000 µg.kg⁻¹), são relativamente menos tóxicas (CHORUS; BARTRAM, 1999).

A produção de toxina pode variar não somente entre cepas (SAKER; NEILAN, 2001), mas também em diferentes condições ambientais (OHTANI *et al.*, 1992; SAKER; GRIFFITHS, 2000; FABBRO *et al.*, 2001; HAWKINS *et al.*, 2001; SAKER; NEILAN, 2001). A fase em que se encontra a floração, da mesma maneira, pode influenciar na produção de cianotoxina (SAKER; GRIFFITHS, 2000; SAKER; GRIFFITHS, 2001; HAWKINS *et al.*, 2001). Como os mecanismos que disparam a produção de toxinas ainda não são bem conhecidos, o melhor método para evitar possíveis intoxicações é evitar a presença de florações em reservatórios destinados ao abastecimento público de água.

1.4 Distribuição geográfica

Além da potencial toxicidade, há um grande interesse pela ecologia da espécie devido ao fato de ser uma extraordinária competidora. A frequência de florações de *C. raciborskii* tem aumentado consideravelmente nos trópicos (BRANCO; SENNA, 1994; FABBRO; DUIVENVOORDEN, 1996), aliado à rápida invasão de novos habitats tanto em ambientes subtropicais (JONES; SAUTER, 2005; VIDAL; KRUK, 2008) como temperados (CHAPMAN; SCHELSKE, 1997; PADISÁK, 1997; FASTNER *et al.*, 2003; SAKER *et al.*, 2003). Sua presença já foi detectada na Europa, América do Norte, África, Ásia, Oceania e América do Sul (Tabela 1). Atualmente, essa cianobactéria forma extensas florações tóxicas em corpos de água pelo mundo todo (BRANCO; SENNA, 1994; DOKULIL; MAYER, 1996; SAKER *et al.*, 2003; BRIAND *et al.*, 2004), exceto na Antártica (PADISÁK *et al.*, 2003), podendo ser considerada uma espécie de distribuição cosmopolita (PADISÁK, 1997; BRIAND *et al.*, 2004).

Cylindrospermopsis raciborskii tende a dominar em regiões tropicais e subtropicais da África, na Austrália, em Cuba, na Índia, Indonésia e América do Sul, podendo também ser encontrada em regiões temperadas da Europa, Ásia Central e América do Norte (CHRISWELL *et al.*, 1997).

TABELA 1 – OCORRÊNCIA DE *C. raciborskii* POR CONTINENTE.

Continente	Referências
África	Berger <i>et al.</i> (2006); Dufour <i>et al.</i> (2006); Mohamed (2007)
América do Norte	Chapman e Schelske (1997); Hamilton <i>et al.</i> (2005); Hong <i>et al.</i> (2006)
América do Sul	Branco e Senna (1994); Sant'anna (1991); Bouvy <i>et al.</i> (2000); Huszar <i>et al.</i> (2000); Vidal e Kruk (2008); Figueredo e Giani (2009)
Ásia	Chonudomkul <i>et al.</i> (2004); Zohary (2004); Zohary e Shlichter (2009); Alster <i>et al.</i> (2010)
Europa	Krienitz e Hegewald (1996); Wiedner <i>et al.</i> (2002); Fastner <i>et al.</i> (2003); Stuken <i>et al.</i> (2006); Dokulil e Mayer (1996); Dokulil e Teubner (2000); Padišák (1997); Couté, Leitão e Martin (1997); Briand <i>et al.</i> (2002); Bernard <i>et al.</i> (2003); Tóth e Pádisak (1986); Presing <i>et al.</i> (1996); Borics <i>et al.</i> (2000); Saker <i>et al.</i> (2003); Valério <i>et al.</i> (2005); Freitas (2009); Leao, Vasconcelos e Vasconcelos (2009); Kokocinski <i>et al.</i> (2011); Cvijan e Fužinato (2011)
Oceania	Fabbro e Duivenvoorden (1996); Saker e Griffiths (2001); Ryan, Hamilton e Barnes (2003); Moore, Mcgregor e Shaw (2004); Posselt, Burford e Shaw (2009)

TABELA 2 – OCORRÊNCIA DE *C. raciborskii* EM RESERVATÓRIOS BRASILEIROS POR ESTADOS.

Estado	Referências
Minas Gerais	Taniguchi, Rocha e Senna (2003); Garcia (2007); Figueredo, Giani e Bird (2007)
Pernambuco	Bouvy <i>et al.</i> (2000); Azevedo <i>et al.</i> (2002); Molica <i>et al.</i> (2002)
Rio Grande do Norte	Chellappa e Costa (2003)
Rio Grande do Sul	Branco e Senna (1994); Conté <i>et al.</i> (2000)
São Paulo	Lagos <i>et al.</i> (1999); Tucci e Sant'anna (2003); Carvalho <i>et al.</i> (2007); Gemelgo <i>et al.</i> (2008)
Paraná	Ventura <i>et al.</i> (2003); Fernandes <i>et al.</i> (2005a); Yunes <i>et al.</i> (2005); Lagos (2008)

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* foi feito por Palmer (1969) para o Lago Paranoá em Brasília, DF. De lá pra cá, florações dessa espécie têm sido registradas em diversos reservatórios brasileiros (Tabela 2). A produção de neurotoxinas por *C. raciborskii* é um problema crescente em toda a região sul do país (YUNES *et al.*, 2005; SANEPAR, relatórios internos).

1.5 Ecologia

Algumas características de *C. raciborskii* têm sido sugeridas como responsáveis pelo sucesso ecológico da espécie, como, por exemplo, a sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, combinada à alta afinidade e habilidade de estocar fósforo (PADISÁK; REYNOLDS, 1998; ISVÁNOVICS *et al.*, 2000), superior tolerância ao sombreamento (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000; BRIAND *et al.*, 2002), controle da posição na coluna de água, formação de acinetos (PADISÁK, 1997) e tolerância à grande variação de temperatura (BRIAND *et al.*, 2004). As características que favorecem a dominância da espécie dependem do ambiente, da região do globo, bem como da adaptação da cepa às condições ambientais. Os estudos que determinaram as características responsáveis pelo sucesso ecológico da espécie foram realizados, em sua maioria, em região temperada.

Estudos realizados em campo sugerem que fatores como alta temperatura da água superficial (SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; BOUVY *et al.*, 1999; 2000; MCGREGOR; FABBRO, 2000; TUCCI; SANT'ANNA, 2003), turbidez (TUCCI; SANT'ANNA, 2003), alto pH [entre 7,8 e 8,5 (BRANCO; SENNA, 1994; BOUVY *et al.*, 1999; 2000)] e oxigênio dissolvido (SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; TUCCI; SANT'ANNA, 2003), grande disponibilidade de nitrogênio na forma de íon amônio (BRANCO; SENNA, 1994; 1996; TUCCI; SANT'ANNA, 2003), baixos valores de transparência da água (TUCCI; SANT'ANNA, 2003) e razão N:P (BOUVY *et al.*, 1999), ausência de macrófitas aquáticas (TUCCI; SANT'ANNA, 2003) e predadores eficientes (BRANCO; SENNA, 1994; BOUVY *et al.*, 1999; 2000) ou alelopatia (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007) estão diretamente relacionados à dominância de *C. raciborskii*. Alguns autores afirmam ainda que a estratificação pode ser um fator importante para a ocorrência da espécie, já que os picos de densidade celular muitas vezes coincidem com períodos de maior estabilidade da coluna de água

(PADISÁK, 1997; SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; TUCCI; SANT'ANNA, 2003). Porém, a dependência da estratificação da coluna de água para o desenvolvimento de *C. raciborskii* é contraditória. Por exemplo, no Brasil, a espécie domina também em sistemas rasos e misturados (BOUVY *et al.*, 1999; SAKER; GRIFFITHS, 2001).

A maioria dos autores sugere ainda que reservatórios que sofrem estratificações estáveis da coluna de água (DOKULIL; MAYER, 1996; PADISÁK, 1997; SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; MCGREGOR; FABBRO, 2000; TUCCI; SANT'ANNA, 2003), localizados em regiões com luminosidade baixa (BRIAND *et al.*, 2004), são locais que podem favorecer o crescimento de *C. raciborskii*. Na maioria dos lagos, um conjunto dessas características é que pode levar a dominância da espécie (PADISÁK, 1997) que parece obedecer a um padrão sazonal de ocorrência, com maiores densidades tendendo a ocorrer após o esgotamento de nutrientes (FERNANDES *et al.*, 2005a).

Em laboratório foi estabelecido que a espécie é capaz de crescer entre 15 e 35°C, com crescimento ótimo entre 25 e 30°C, dependendo da cepa (SAKER; GRIFFITHS, 2000; BRIAND *et al.*, 2004), tanto para região temperada quanto para tropical. É provável que a faixa de temperatura de crescimento conhecida venha a ser ampliada em consequência da realização de novos estudos com cepas isoladas de diferentes localidades. *Cylindrospermopsis raciborskii* já foi encontrada densamente durante o inverno em um lago subtropical uruguaio em temperaturas próximas a 11°C (FABRE *et al.*, 2010). Essa ampla faixa de crescimento da espécie tem sido apontada como uma possível explicação para a sua recente invasão de áreas temperadas (FASTNER *et al.*, 2003; BRIAND *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2006; MESSINEO *et al.*, 2010).

Quando comparada com outras espécies do fitoplâncton, a dominância de *C. raciborskii* é favorecida pela baixa luminosidade e pelo aprofundamento da camada de mistura (REYNOLDS *et al.*, 2002) entre outros fatores ambientais. Como outras cianobactérias, a necessidade de luz para o crescimento de *Cylindrospermopsis* é menor quando comparada a de outros grupos de algas (REYNOLDS *et al.*, 2002). Alguns estudos confirmam que essa espécie não necessita de altas intensidades luminosas para crescer (SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2006), além de possuir alta tolerância ao sombreamento (BRIAND *et al.*, 2002). A espécie já foi encontrada em lagos rasos e túrbidos no Brasil sob intensidade luminosa próxima a 14 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (BOUVY *et al.*, 1999; BOUVY

et al., 2000). Por outro lado, algumas cepas são capazes de tolerar altas intensidades de luz, acima de $500 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (BRIAND *et al.*, 2004). A intensidade luminosa \u00f3tima para o crescimento da esp\u00e9cie, estabelecida em laborat\u00f3rio, varia de 80 a $200 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (SAKER *et al.*, 1999; SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004).

O sucesso de *C. raciborskii* \u00e9 tamb\u00e9m atribu\u00eddo \u00e0 not\u00e1vel caracter\u00edstica das cianobact\u00e9rias de estocar nutrientes essenciais em seu citoplasma (REYNOLDS, 1984; PADIS\u00c1K, 1997). Essas reservas de produtos s\u00e3o acumuladas em condi\u00e7\u00f5es de excesso de nutrientes particulares e, nesse caso, inclus\u00f5es citoplasm\u00e1ticas proeminentes podem ser observadas em seu citoplasma. Algumas cianobact\u00e9rias possuem a habilidade de fixar nitrog\u00eanio atmosf\u00e9rico (REYNOLDS, 1984) quando esse nutriente n\u00e3o se encontra dispon\u00edvel na forma preferencialmente assimil\u00e1vel na \u00e1gua (BRIAND *et al.*, 2004). Essa caracter\u00edstica permite que as cianobact\u00e9rias sobrevivam em ambientes com concentra\u00e7\u00f5es limitantes de nitrog\u00eanio para outras esp\u00e9cies, conferindo uma vantagem adaptativa (REYNOLDS, 1984). O aparecimento de heter\u00f3citos em *C. raciborskii* \u00e9 utilizado como um indicador da fixa\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio, j\u00e1 que s\u00e3o essas c\u00e9lulas especializadas que permitem os processos de fixa\u00e7\u00e3o desse elemento da atmosfera (PADIS\u00c1K, 1997).

Tanto o f\u00f3sforo inorg\u00e2nico quanto o f\u00f3sforo total variam largamente nos lagos dominados por *C. raciborskii*. Segundo Isv\u00e1novics *et al.* (2000) a concentra\u00e7\u00e3o de f\u00f3sforo que limita o crescimento da esp\u00e9cie \u00e9 $0,3 \mu\text{g}$ de f\u00f3sforo por μg de clorofila-a ou $2,5 \mu\text{g}$ de f\u00f3sforo por mg de clorofila-a, valores relativamente baixos. A alta afinidade e capacidade de estocar f\u00f3sforo, relativamente a outras cianobact\u00e9rias (ISV\u00c1NOVICS *et al.*, 2000; SHAFIK *et al.*, 2001), desempenha importante papel no desenvolvimento das flora\u00e7\u00f5es dessa esp\u00e9cie (PADIS\u00c1K, 1997).

Al\u00e9m disso, a habilidade de regular a posi\u00e7\u00e3o na coluna de \u00e1gua \u00e9 uma importante vantagem seletiva que permite que a esp\u00e9cie utilize recursos em diferentes profundidades, como camadas ricas em nutrientes (PADIS\u00c1K, 1997). Essas adapta\u00e7\u00f5es tamb\u00e9m permitem que *C. raciborskii* cres\u00e7a em baixas concentra\u00e7\u00f5es de fosfato (BRANCO; SENNA, 1994; PRESING *et al.*, 1996; BRIAND *et al.*, 2002), que seriam limitantes para outras algas.

A resposta da esp\u00e9cie as diferentes condi\u00e7\u00f5es de temperatura, luminosidade e nutrientes parece variar entre cepas (JUNQUEIRA-MELGA\u00c7O, 2007), demonstrando a import\u00e2ncia de se realizar estudos sobre a ecologia da esp\u00e9cie com

cepas isoladas de diferentes locais de ocorrência. Além disso, sugere-se fortemente um trabalho de revisão sobre os fatores que promovem as florações de *C. raciborskii* em ecossistemas aquáticos pelo mundo todo, levando em consideração as diferenças extremas que podem ocorrer entre cepas isoladas de diferentes regiões.

1.6 Expansão geográfica de *C. raciborskii*

O aquecimento global parece ser o fator mais aceito para explicar o recente aparecimento e desenvolvimento de *C. raciborskii* em latitudes médias (MCGREGOR; FABBRO, 2000; BRIAND *et al.*, 2002; 2004), aliado à alta tolerância fisiológica (BRIAND *et al.*, 2004) e à consequente seleção de clones adaptados ao clima temperado (SAKER; NEILAN, 2001; BRIAND *et al.*, 2004; CHONUDOMKUL *et al.*, 2004; PICCINI *et al.*, 2011). Essa recente discussão sobre a proliferação da espécie em corpos de água de regiões temperadas levantou a questão sobre a alta capacidade de adaptação dessa espécie às condições locais.

A temperatura e a luminosidade características de regiões temperadas são exemplos de fatores ambientais bastante diferentes daqueles presentes nas regiões onde essa espécie costumava dominar (KISS *et al.*, 2002; BERNARD *et al.*, 2003). Em função da temperatura, populações podem persistir em altas densidades durante todo o ano em ecossistemas aquáticos com temperaturas constantemente altas, como os localizados em regiões tropicais (KOMÁRKOVÁ; LAUDARES-SILVA; SENNA, 1999; BOUVY *et al.*, 1999; MCGREGOR; FABBRO, 2000). Essa cianobactéria pode, ainda, dominar durante os meses mais quentes em regiões subtropicais (BOUVY *et al.*, 2000; MCGREGOR; FABBRO, 2000; BURFORD; O'DONOHUE, 2006; BURFORD *et al.*, 2007). Mais recentemente, *C. raciborskii* tem ocorrido restritamente no período de verão em regiões temperadas (TÓTH; PÁDISAK, 1986; DOKULIL; MAYER, 1996; BRIAND *et al.*, 2002; SAKER *et al.*, 2003; BRIAND *et al.*, 2004). O aumento da temperatura global pode ser considerado um fator responsável pelo aparecimento e desenvolvimento de *C. raciborskii* nessas regiões (MCGREGOR; FABBRO, 2000; BRIAND *et al.*, 2002; 2004; CHONUDOMKUL *et al.*, 2004). Além disso, alguns autores afirmam que o crescimento da espécie em ampla faixa de intensidade luminosa seria uma pré-adaptação da espécie (BOUVY *et al.*, 1999; BOUVY *et al.*, 2000; SHAFIK *et al.*,

2001; BRIAND *et al.*, 2004). Essa característica facilita a ampliação de sua distribuição, quando outros fatores, como o aumento da temperatura, estão presentes.

Em baixas latitudes essa espécie ocorre caracteristicamente em lagos profundos (> 50 m) e estratificados, sendo raramente observada a presença de acinetos. Já em altas latitudes a ocorrência da espécie é mais comum em lagos rasos (< 10 m), sendo que as células de resistência são frequentemente observadas (PADISÁK, 1997; SAKER; GRIFFITHS, 2001). Segundo Briand *et al.* (2004) a habilidade de produzir acinetos pode explicar essa característica. Em altas latitudes a ocorrência da espécie fica restrita ao período quente, quando o lago atinge temperaturas mais altas por pelo menos algumas semanas. Essas células de resistência podem sobreviver ao inverno e germinar quando a temperatura da água ou do sedimento alcança 22-23°C, o que em regiões frias apenas ocorre em lagos rasos (PADISÁK, 1997; MOORE, MCGREGOR; SHAW, 2004; BRIAND *et al.*, 2004). A população é controlada no final do verão quando o lago torna-se pobre em fósforo. Em águas ricas em fósforo a população pode persistir por longos períodos (PADISÁK, 1997).

1.7 Estudos laboratoriais com cepas brasileiras de *C. raciborskii*

No XII Congresso Brasileiro de Limnologia (XII CBL, 2009) foram apresentados oito trabalhos abordando distintos aspectos de *C. raciborskii*, desde sua ocorrência (1), alelopatia (2), toxicidade (1) e correlação com variáveis experimentais (4). Durante o XIII Congresso Brasileiro de Limnologia (XIII CBL, 2011) foram apresentados seis trabalhos sobre *C. raciborskii*, desde sua ocorrência causando florações (2), correlações com variáveis ambientais dos ecossistemas aquáticos onde ocorre (1) e experimentais (3).

Essa revisão destaca o interesse pelos estudos laboratoriais utilizando cepas de *C. raciborskii*. Devido ao seu comportamento invasivo e à capacidade de formar florações tóxicas, os trabalhos sobre a autoecologia da espécie têm aumentado nos últimos anos. Esses trabalhos são de extrema importância, já que as florações vêm aumentando a cada ano e encarecendo cada vez mais o tratamento da água por parte dos órgãos responsáveis pelo abastecimento público. Os estudos laboratoriais

podem auxiliar na identificação dos fatores ambientais que promovem as florações e fornecer uma importante ferramenta para o gerenciamento efetivo de reservatórios destinados ao abastecimento público (BOUVY *et al.*, 1999).

Entre os estudos laboratoriais realizados com cepas brasileiras destaca-se o de Lagos *et al.* (1999) que documentou pela primeira vez a produção de SAX, uma ciatoxina do grupos das *paralytic shellfish poisoning* (PSP), por uma cepa brasileira de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Essa foi também a primeira evidência da produção dessa toxina por cianobactéria em toda a América do sul. As cepas utilizadas neste estudo foram isoladas do estado de São Paulo e a toxicidade confirmada através de bioensaio com ratos. A concentração da toxina determinada por HPLC foi alta, comparável à produção por *Anabaena circinalis* Bornet e Flahault (1886).

Briand *et al.* (2004) estudaram o crescimento de 10 cepas de *C. raciborskii*, entre elas duas cepas brasileiras, cultivadas em diferentes temperaturas e intensidades luminosas. Todas as cepas exibiram taxa de crescimento positivo em uma ampla faixa de temperatura (entre 20 e 35°C) e luminosidade (30 a 400 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As maiores taxas de crescimento das cepas brasileiras ocorreram próximas a 30°C e a 100 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os autores concluíram que a colonização de latitudes médias por *C. raciborskii* pode ser resultado da sua tolerância à ampla faixa de condições climáticas (principalmente temperatura e luminosidade), aliada ao progressivo aquecimento global que fornece melhores condições para seu crescimento nessas regiões.

A produção de PSP por uma cepa de *C. raciborskii* isolada de um reservatório de São Paulo foi também estudada por Castro *et al.* (2004) sob duas temperaturas medianas (19 e 25°C). Uma das características mais marcantes da cepa de *C. raciborskii* estudada foi a alta capacidade de produzir PSP durante o desenvolvimento inicial da cultura em baixa temperatura. A síntese de metabólitos secundários deveria iniciar durante a fase estacionária, todavia, a cepa iniciou a produção de toxinas muito cedo. Além de sugerir a exportação de saxitoxina (SAX) para o meio extracelular, os autores demonstraram o potencial de biotransformação dessas toxinas, já que foi observada uma clara diminuição na concentração de SAX e um concomitante aumento de epímeros. Os autores detectaram pela primeira vez a produção de dcSAX, um derivado da SAX.

Carneiro *et al.* (2009) estudaram o efeito da intensidade e da qualidade da luz na produção de SAX e neoSAX por uma cepa de *C. raciborskii* isolada da represa Billings, em São Paulo. Três intensidades luminosas (50, 100 e 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e três qualidades de luz (branca e azul a 470 nm e vermelha a 630 nm) foram utilizadas. As taxas de crescimento foram maiores nos cultivos expostos a 100 e 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, que tamb\u00e9m apresentaram as maiores concentra\u00e7\u00f5es de toxina. O ritmo circadiano da produ\u00e7\u00e3o de SAXs, sincronizado com o fotoper\u00edodo utilizado, foi confirmado, sendo que a luz vermelha induz a perda desse ritmo. Os autores demonstraram que o crescimento de *C. raciborskii* e sua produ\u00e7\u00e3o de SAXs podem ser regulados n\u00e3o apenas pela intensidade, mas tamb\u00e9m pela qualidade da fonte luminosa.

Baseado nessa revis\u00e3o fica claro que *C. raciborskii* \u00e9 capaz de tolerar ampla varia\u00e7\u00e3o ambiental e que diferentes cepas podem possuir prefer\u00eancias divergentes, incluindo a temperatura \u00f3tima para seu crescimento ou necessidades de luz e nutrientes. Todavia, n\u00e3o existem estudos sobre os fatores reguladores do crescimento de cepas de *C. raciborskii* de reservat\u00f3rios paranaenses. Essa esp\u00e9cie causa problemas constantes em reservat\u00f3rios utilizados para o abastecimento p\u00fablico no Paran\u00e1, como o Ira\u00ed (FERNANDES *et al.*, 2005a), localizado em Pinhais, e o Alagados (IAP, 2009), em Ponta Grossa, foco do presente estudo. Outro reservat\u00f3rio paranaense, o Rio Verde, localizado em Arauc\u00e1ria, apesar de possuir boa qualidade da \u00e1gua, em 2005, sofreu com uma flora\u00e7\u00e3o de *C. raciborskii* com densidade superior a 90.000 c\u00e9ls.mL⁻¹ (FERNANDES *et al.*, 2011). A \u00e1gua do reservat\u00f3rio abastece a Refinaria Presidente Get\u00falio Vargas, da Petrobr\u00e1s, al\u00e9m de j\u00e1 existir uma outorga para que a Companhia de Saneamento do Paran\u00e1 (SANEPAR) possa utiliz\u00e1-la para o abastecimento de \u00e1gua de parte de Curitiba. Preocupada com a qualidade da \u00e1gua utilizada nos processos industriais da sua refinaria, a Petrobr\u00e1s investiu no financiamento do “Projeto Interdisciplinar de Pesquisa sobre Eutrofiza\u00e7\u00e3o no Reservat\u00f3rio Rio Verde, Arauc\u00e1ria, PR”, entre 2008 e 2010. O projeto Rio Verde foi composto por vinte subprojetos distribu\u00eddos em n\u00facleos tem\u00e1ticos que estudaram as caracter\u00edsticas f\u00edsicas, econ\u00f4micas e sociais da bacia, assim como as propriedades qu\u00edmicas e f\u00edsicas e as comunidades biol\u00f3gicas do reservat\u00f3rio.

O presente trabalho \u00e9 produto de um desdobramento do subprojeto “Efeitos de eventos meteorol\u00f3gicos sobre a comunidade fitoplanct\u00f4nica”, inserido no projeto

interdisciplinar descrito acima, que teve por objetivo estudar os fatores controladores do fitoplâncton no reservatório Rio Verde, assim como discutir as causas da floração de 2005 (FERNANDES *et al.*, 2011). A partir desse estudo, sugeriu-se que a concentração de fósforo no reservatório poderia ser um fator importante para o desenvolvimento de *C. raciborskii*. Então, houve uma prorrogação do projeto inicial para que pudesse ser realizado um estudo laboratorial sobre as necessidades específicas de fósforo em *C. raciborskii*.

Por meio desse estudo laboratorial, visa-se investigar a influência de fatores ambientais, como temperatura, luminosidade e concentração de fósforo, no crescimento de uma cepa de *C. raciborskii* isolada do reservatório de Alagados, em Ponta Grossa, Paraná. O reservatório foi selecionado por sofrer com intensas florações dessa cianobactéria e possuir condições de temperatura e luz característica da região subtropical, além de concentração média de fósforo intermediária dentre os reservatórios da região.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos dos fatores reguladores temperatura, luz e fósforo reativo sobre o crescimento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* do reservatório de Alagados, Ponta Grossa, Paraná, em condições de cultivo.

Comparar a dinâmica de crescimento da cepa de *C. raciborskii* desse reservatório subtropical com as de outros reservatórios em diferentes latitudes, a fim de determinar diferenças adaptativas quanto aos parâmetros investigados, em condições de laboratório.

Acompanhar a variabilidade morfológica da cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados durante uma curva de crescimento padrão e comparar com a disponível na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local de coleta das cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Os tricomas de *Cylindrospermopsis raciborskii* foram obtidos a partir de amostras coletadas com auxílio de rede de plâncton (abertura de malha de 20 µm), provenientes do reservatório de Alagados (Figura 1), uma barragem artificial localizada entre os municípios de Ponta Grossa e Carambeí, no sudeste do Estado do Paraná, Brasil (YUNES *et al.*, 2005; IAP, 2009). Esse reservatório é utilizado pela Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) para o abastecimento público de parte da população do município de Ponta Grossa, além de gerar energia elétrica para a Companhia Paranaense de Energia (COPEL). O reservatório é polimítico, a profundidade média é de 8,1 metros e o tempo de residência da água é de aproximadamente 40 dias (IAP, 2009). O Instituto Ambiental do Paraná (IAP) monitora os reservatórios da região desde 1995 e classifica o reservatório de Alagados como moderadamente degradado (IAP, 2004; IAP, 2009). Levando-se em conta os valores de clorofila-a, o reservatório pode ser considerado de eutrófico a hipereutrófico (IAP, 2009).

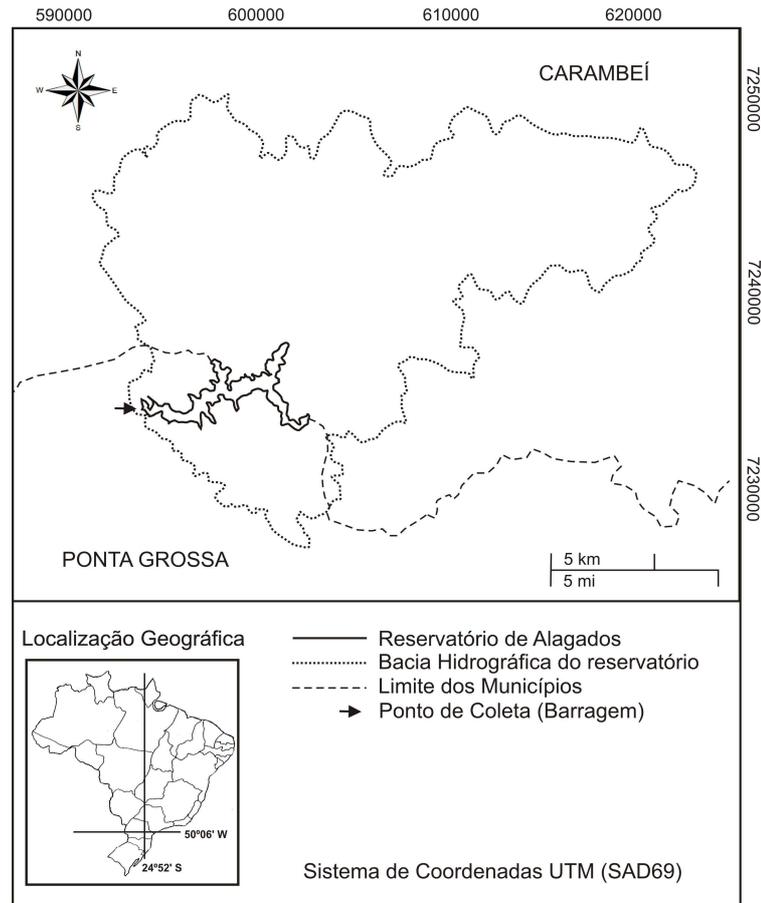


FIGURA 1 – MAPA DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS EM PONTA GROSSA, PARANÁ, COM INDICAÇÃO DO PONTO DE COLETA.

O mapa inferior esquerdo refere-se à localização geográfica do reservatório.

FONTE: baseado em mapas do Google e em dados de georreferenciamento do INPE (2012).

3.2 Florações de *Cylindrospermopsis raciborskii* e produção de toxinas no reservatório de Alagados

Uma floração praticamente permanente de cianobactérias ocorre na barragem do reservatório de Alagados desde 2002, sendo *Cylindrospermopsis raciborskii* a espécie dominante (IAP, 2009). Outra cianobactéria que ocorre no reservatório de Alagados, mas não chega a formar florações é *Dolichospermum planctonicum* (Brunnth.) Wacklin, Hoffmann e Komárek. A cepa de *C. raciborskii* desse reservatório ocorre exclusivamente na forma reta e é comum que a maioria da população apresente um ou dois heterócitos terminais. As florações seguem um padrão característico, com densidades mais elevadas entre janeiro e julho (Figura 2) (SANEPAR, relatórios internos). Essas florações causam problemas no tratamento

da água pela SANEPAR (YUNES *et al.*, 2005) e já foram responsáveis por diversas interrupções no abastecimento público da região.

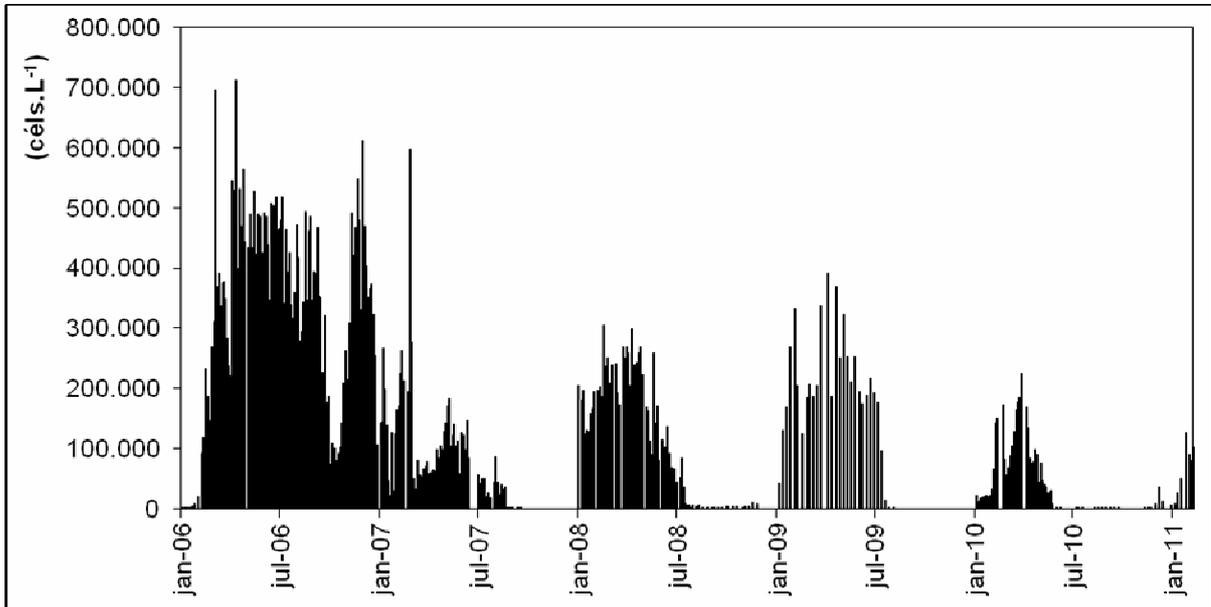


FIGURA 2 – DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS (células.mL⁻¹) NO PONTO DE CAPTAÇÃO (ANTES DO TRATAMENTO) DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2006 A FEVEREIRO DE 2011.

FONTE: SANEPAR (relatórios internos)

Até 2007, essa floração de cianobactérias costumava manter-se durante praticamente todo o ano acima de 100.000 células.mL⁻¹, chegando a densidades máximas de pouco mais de 700.000 células.mL⁻¹ (Figura 2). A partir de 2008, as maiores densidades de cianobactérias começaram a ocorrer apenas no primeiro semestre do ano, sendo que no segundo as cianobactérias quase que desaparecem, sendo substituídas por uma clorófito (*Mougeotia* sp.). As densidades máximas alcançadas pelas cianobactérias também vêm baixando, não ultrapassando 400.000 células.mL⁻¹ (Figura 2).

3.3 Características físico-químicas do reservatório

A concentração de fósforo total à sub-superfície na água da barragem do reservatório de Alagados varia entre 0,01 e 0,17 mg.L⁻¹ (dados referentes aos anos de 2008 e 2011, com média de 0,04 mg.L⁻¹ para o período) (SANEPAR, relatórios internos). O fósforo reativo (SRP) no mesmo local varia entre 0,01 e 0,07 mg.L⁻¹,

com média de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figuras 3) (SANEPAR, relatórios internos). De maneira geral, a concentração de SRP na barragem do reservatório fica em torno da média durante o ano (Figura 3), com picos após o término das florações de *C. raciborskii*, entre julho e setembro.

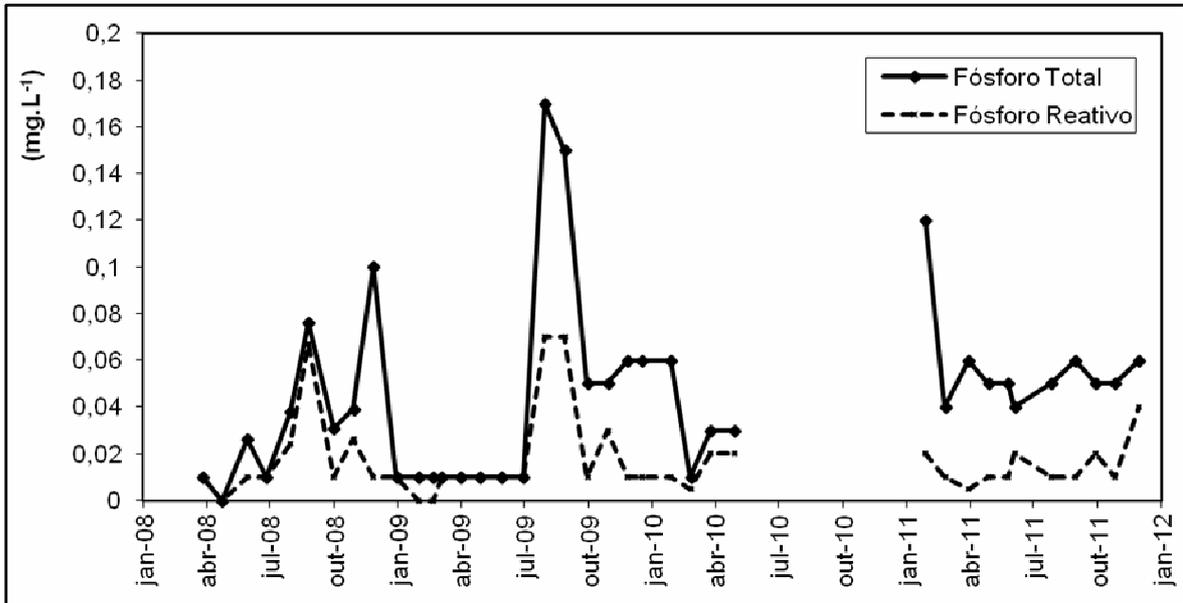


FIGURA 3 – CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO TOTAL E REATIVO (mg.L^{-1}) NA BARRAGEM DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS ENTRE 2008 E 2011.
 FONTE: SANEPAR (relatórios internos)

A temperatura superficial da água do reservatório de Alagados varia entre 12°C (durante invernos mais frios) e 27°C (temperatura máxima de verão) com média anual de 20°C (Figura 4) (dados referentes ao período entre 2008 e 2010) (SANEPAR, relatórios internos). Quedas de temperaturas para valores mais baixos que 25°C parecem influenciar diretamente a abundância de cianobactérias no reservatório (Figura 4).

O pH da água do reservatório varia de 6,5 a 9, com média anual de 7,8 (Figura 5). A tendência são aumentos de pH em janeiro (início das florações) e diminuição em julho (final das florações). Os valores de pH que ocorrem no reservatório em períodos em que *C. raciborskii* domina o fitoplâncton giram em torno de 9, enquanto na ausência dessa cianobactéria ficam em torno de 7.

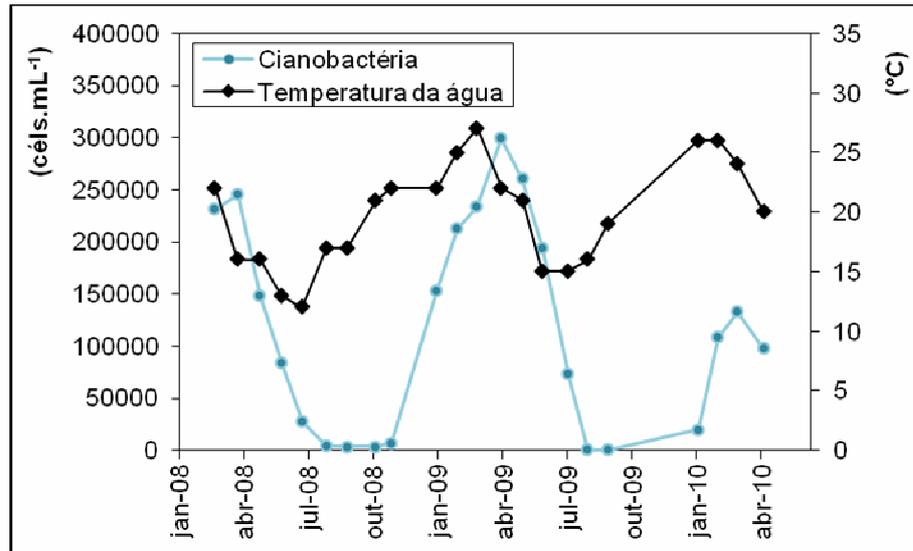


FIGURA 4 – TEMPERATURA (°C) DA ÁGUA SUPERFICIAL DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS ENTRE FEVEREIRO DE 2008 E ABRIL DE 2010.

FONTE: SANEPAR (relatórios internos)

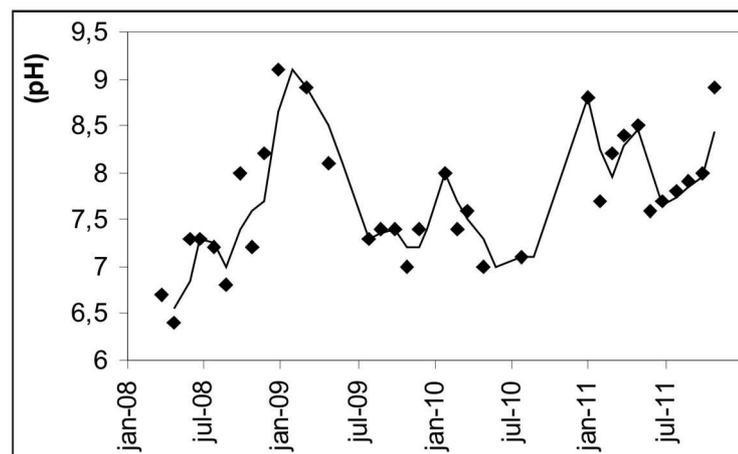


FIGURA 5 – CONDIÇÕES DE pH NO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS DE 2008 A 2011.

FONTE: SANEPAR (relatórios internos)

3.4 Comparação com outros reservatórios paranaenses destinados ao abastecimento público

Entre os principais reservatórios destinados ao abastecimento público no Paraná estão o reservatório de Alagados, Iraí, Passaúna e Piraquara I (IAP, 2009), que são monitorados pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP). Recentemente, passou a ser utilizado o recém-construído reservatório Piraquara II e concedeu-se uma outorga para que a SANEPAR possa passar a utilizar também o reservatório

Rio Verde, utilizado anteriormente para fins industriais pela Petrobrás. Esses dois últimos se encontram em bom estado de conservação.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS RESERVATÓRIOS PARANAENSES UTILIZADOS PARA O ABASTECIMENTO PÚBLICO.

Os dados de temperatura superficial da água, fósforo total, amônia e profundidade do Disco de Secchi são apresentados na forma de média (mínimo – máximo).

Reservatório	IQAR	PARÂMETRO			
		Temperatura superficial da água	Fósforo Total	Amônia	Secchi
		(°C)	(mg. L ⁻¹)	(mg. L ⁻¹)	(m)
Alagados (Polimítico)	3,3 - Pouco a moderadamente degradado	19,6 (15,2 – 27)	0,04 (0,01 – 0,13)	0,05 (0,02 – 0,31)	0,8 (0,4 – 1,1)
Iraí (Polimítico)	4 - Criticamente degradado a poluído	23,2 (15,4 – 27,8)	0,03 (0,01 – 0,05)	0,07 (0,02 – 0,24)	1,4 (0,5 – 3,4)
Passaúna (Monomítico)	3,1 - Moderadamente degradado	20,9 (16,1 – 25,9)	0,02 (0,002 – 0,08)	0,22 (0,03 – 1,1)	2,6 (1,6 – 3,8)
Piraquara I (Monomítico)	3,2 - Moderadamente degradado	21,3 (15,9 – 26,1)	0,03 (0,005 – 0,29)	0,15 (0,002 – 0,46)	2,2 (1,2 – 3,2)
Rio Verde (Monomítico)	3,5 - Moderadamente degradado	20,9 (15,9 – 25,8)	0,02 (0,004 – 0,11)	0,15 (0,02 – 0,41)	1,6 (1,1 – 2,5)

FONTE: IAP, (2004); IAP, (2009).

Os reservatórios paranaenses destinados ao abastecimento público possuem diversas características semelhantes. Na tabela 3 são apresentadas algumas variáveis selecionadas para comparação entre os reservatórios. Em sua maioria, os mananciais são classificados como moderadamente degradados, exceto o reservatório Iraí, que é considerado de criticamente degradado a poluído (IAP, 2009) (Tabela 3). A condição presente no Iraí deve-se a alta taxa de produção primária do fitoplâncton, sustentada pela elevada carga de nutrientes e matéria orgânica provenientes dos rios contribuintes que se encontram com a qualidade da água comprometida. A baixa profundidade média do reservatório e seu alto tempo de residência também são fatores que favorecem altas biomassas do fitoplâncton.

Florações dominadas por *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing e *Aphanizomenon* spp. são frequentes, excluindo esse manancial dos padrões aceitáveis para os reservatórios destinados ao abastecimento público (IAP, 2004; IAP, 2009).

A temperatura da água superficial dos reservatórios, de maneira geral, varia entre 15 e 27°C (Tabela 3). A concentração de fósforo total (única forma de fósforo incluída nas análises do monitoramento do IAP) média varia de 0,02 mg. L⁻¹, no Rio Verde, a 0,04 mg. L⁻¹, no Alagados (Tabela 3). A concentração média de amônia, fonte de nitrogênio preferencial de *C. raciborskii* (BRIAND *et al.*, 2002), fica entre 0,05 mg. L⁻¹, no Alagados, e 0,22 mg. L⁻¹, no Passaúna (Tabela 3).

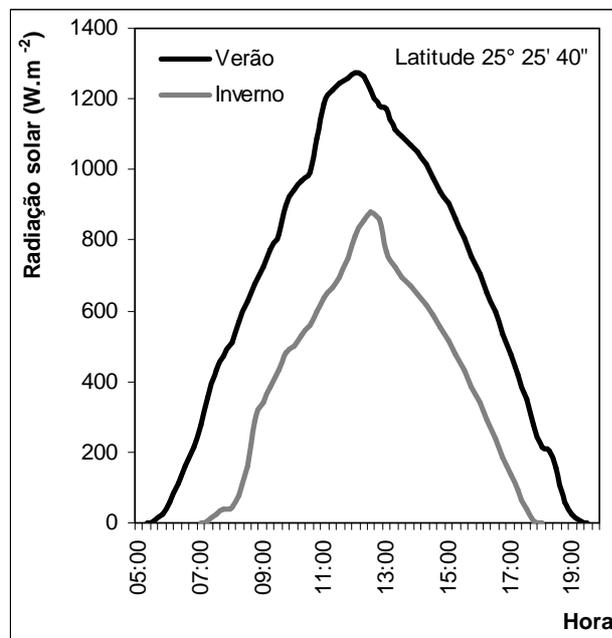


FIGURA 6 – RADIAÇÃO SOLAR (W.m⁻²) INCIDENTE NA REGIÃO DO RESERVATÓRIO (Latitude 25° 25' 40'') DURANTE UM DIA DE VERÃO E OUTRO DE INVERNO.

Fonte: SIMEPAR

A luminosidade incidente na região dos reservatórios é semelhante e característica da região subtropical do globo (Latitude 25° 25' 40''). Durante o inverno a radiação solar máxima (aproximadamente 800 W.m⁻²) chega apenas próximo da metade da radiação solar máxima incidente durante o verão (1300 W.m⁻²) (Figura 6).

A média da profundidade do Disco de Secchi nos reservatórios paranaenses fica entre 0,8 m, no Alagados, e 2,6 m, no Passaúna (Tabela 3).

3.5 Modificação do meio de cultivo

O meio de cultura selecionado para cultivar a cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados foi o ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964). Duas alternativas de meio de cultivo foram utilizadas durante o estudo. A primeira alternativa foi preparada adicionando-se as soluções estoque em água Milli-Q, como recomendado no protocolo de preparo do meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964). Essa alternativa de meio de cultivo foi denominada “meio sintético”. Uma segunda alternativa foi modificada substituindo-se a água Milli-Q pela água do próprio reservatório de Alagados filtrada em filtro Millipore de Acetato de Celulose (porosidade 0,22 µm). Essa alternativa foi denominada “meio natural”.

O meio de cultivo natural mostrou-se mais eficiente no isolamento da cepa quando comparado ao meio sintético. Isolados em meio natural tiveram 100% (12 de 12 poços) de sobrevivência contra 67,7% (8 de 12 poços) em meio sintético. Por isso, um experimento foi realizado para verificar se o tipo de meio (natural e sintético) tem influência na taxa de crescimento da cepa. As taxas de crescimento da cepa cultivada, a 20°C, em meio natural ($0,19 \pm 0,01$) foram idênticas quando cultivada simultaneamente, sob as mesmas condições, em meio sintético ($0,19 \pm 0,04$).

A cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados parece não ter se adaptado ao pH recomendado para o meio de cultura ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964). Após a realização de testes com meios de diferentes pHs, o pH do meio de cultivo natural foi alterado de 8, como recomendado, para 7,8 devido a melhor adaptação da cepa. O isolamento da cepa em meios de cultivos com pHs menores que 7,5 e maiores que 8,5 apresentaram baixa eficiência. O pH 7,8 é a média anual do pH da água superficial do reservatório (SANEPAR, relatórios internos). Porém, assim como o tipo de meio (natural/sintético), o pH não tem influência na taxa de crescimento da cepa. O pH foi regulado pela adição de NaOH 1N ou HCl 1N antes da autoclavagem.

A partir de então, em todos os cultivos foi utilizado o meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) modificado pela preparação com água do próprio reservatório e pH alterado para 7,8.

3.6 Isolamento das cepas

As amostras obtidas para o isolamento de *C. raciborskii* foram coletadas em maio de 2011 durante floração no reservatório de Alagados. As alíquotas foram acondicionadas em frascos de polietileno com capacidade de 5 litros e transportadas, protegidas do calor e da luz, para o Laboratório de Ficologia da Universidade Federal do Paraná para o isolamento dos tricomas no mesmo dia da coleta.

O isolamento foi realizado com auxílio de micropipeta e a cepa do reservatório de Alagados foi denominada CYL04. Cada tricoma isolado foi lavado pelo menos cinco vezes em meio de cultivo ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) modificado antes de ser transferido para placas Corning de cultivo celular com 24 poços contendo meio ASM-1 modificado (Figura 7 C). As placas de cultivo foram mantidas em incubadora Eletrolab EL202 (Figura 7 C), sob iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes Sylvania 20 W, com intensidade luminosa em torno de $100 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, temperatura constante de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h:12h (claro-escuro), sem aeração. A luminosidade foi mensurada com auxílio de um fotômetro LI-COR, equipado com sensor esférico, modelo LI-193, a fim de se obter a intensidade luminosa fotossinteticamente ativa (PAR).

Repicagens sucessivas foram realizadas até se obter uma cultura unialgal das cepas. Os isolados foram gradativamente transferidos para recipientes contendo maior volume de meio de cultivo (Figura 7 A, B) até serem estabelecidas culturas estoque em Erlenmeyers com capacidade de 500 mL contendo 300 mL de cultura. Os estoques foram mantidos nas mesmas condições dos isolados iniciais (Figura 7 B).



FIGURA 7 – VISTA INTERNA DA INCUBADORA.

À esquerda, nas prateleiras A e B podem ser observadas culturas estoque mantidas em Erlenmeyers contendo de 150 a 400 mL de meio ASM-1 modificado; Na prateleira C, isolados iniciais crescendo em placas de cultivo. À direita, um detalhe dos frascos Erlenmeyers com capacidade de 500 mL contendo dois cultivos estoque, uma cultura mais antiga, do lado esquerdo da foto, e uma mais recente, à direita da foto.

3.7 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados na forma de mínimos, máximos, média e desvio padrão. No capítulo 2 utilizamos uma análise de variância do tipo ANOVA unifatorial para verificar diferenças significativas entre as médias de crescimento da cepa quando submetida a diferentes intensidades luminosas. No capítulo 3 utilizamos uma análise de variância do tipo ANOVA tri-fatorial para verificar diferenças significativas entre as médias de crescimento da cepa em diferentes tratamentos (ou fatores): temperaturas, intensidades luminosas e concentrações de fósforo reativo. O teste de *Tukey HSD* foi utilizado após cada análise para verificar quais os tratamentos tiveram crescimento significativamente diferente. As diferenças foram consideradas significativas quando possuíram intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados foram testados e transformados ($\log x+1$) quando necessário para atender às premissas de normalidade e homocedasticidade das variâncias previstas nos testes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software livre R e do programa STATISTICA versão 6.0.

4 REFERÊNCIAS

- ALSTER, A.; KAPLAN-LEVY, R. N.; SUKENIK, A.; ZOHARY, T.. Morphology and phylogeny of a non-toxic invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* from a Mediterranean Lake. **Hydrobiologia**, vol. 639, p. 115-128, 2010.
- AZEVEDO, S. M. F. O.. Toxic Cyanobacteria and the Caruaru Tragedy. In: **Anais do IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia**. Recife, 83 pp., 1996.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SAHW, G. R.; EAGLESHAM, G. K.. Human intoxications by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, vol. 181, 2002, p. 441-446.
- BERGER C.; BA, N.; GUGGER, M.; BOUVY, M.; RUSCONI, F.; COUTÉ, A.; TROUSSELLIER, M.; BERNARD, C.. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Guiers (Senegal, West Africa). **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 57, p. 355-366, 2006.
- BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J. F.; KRYS, S.; FONTAINE, J. J.. Toxicological Comparison of Diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains: Evidence of Liver Damage Caused by a French *C. raciborskii* Strain. **Environmental toxicology**, vol. 18, n. 3, p. 176-186, 2003.
- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M.. **Gêneros de Algas continentais do Brasil**. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Ed. Rima, 489 pp., 2005.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R.. Cianobactéria invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, vol. 30, p. 82-90, 2003.
- BORICS, G.; GRIGORSZKY, I.; SZABÓ, S.; PADISÁK, J.. Phytoplankton associations in a small hypertrophic fishpond in East Hungary during a change from bottom-up to top-down control. **Hydrobiologia**, vol. 424, p. 79-90, 2000.
- BOURKE, A. T. C.; HAWES, R. B.; NEILSON, A.; STALLMAN, N. D.. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. **Toxicon**, vol. 3, p. 45-48, 1983.
- BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A.. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 15, p. 122-164, 2000.
- BOUVY, M.; MOLICA, R.; DE OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B.. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast, Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 20, p. 285-297, 1999.

BORNET, É.; FLAHAULT, C.. Revision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France. **Annales des Sciences Naturelles**, Botanique, Septième, v. 7, p. 177-262, 1886.

BRANCO, C. W. C.; SENNA, P. A. C.. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Algological Studies**, vol. 75, p. 85-96, 1994.

BRIAND, J. F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, vol. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.

BRIAND, J. F.; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBERAS, C.; HUMBERT, J.F.; COUTÉ, A.; BERNARD, C.. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, vol. 36, p. 3183-92, 2002.

BURFORD, M. A.; O'DONOHUE, M. J.. A comparison of phytoplankton community assemblages in artificially and naturally mixed subtropical water reservoirs. **Freshwater Biology**, Oxford, vol. 51, p. 2143-2153, 2006.

BURFORD, M. A.; JOHNSON, S. A.; COOK, A. J.; PACKER, T. V.; TAYLOR, B. M.; TOWNSLEY, E. R.. Correlations between watershed and reservoir characteristics, and algal blooms in subtropical reservoirs. **Water Research**, vol. 41, n. 18, p. 4105-4114, 2007.

BURFORD, M.A.; DAVIS, T. W.. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, vol. 29, 883-891, 2011.

CARMICHAEL, W. W.. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, vol. 72, p. 445-459, 1992. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x/pdf>> Acesso em: Out. 2010.

CARNEIRO, R. L.; SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, vol. 31, n. 5, p. 481-488, 2006.

CARVALHO, L. R.; SANT'ANNA, C. L.; GEMELGO, M. C. P.; AZEVEDO, M. P.. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 26, p. 97-112, 2007.

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VÁSQUEZ, M.. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, vol. 44, p. 483-489, 2004.

CHAPMAN, A. D.; SCHELSKE, C. L.. Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. **Journal of Phycology**, vol. 33, p. 191-195, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-3646.1997.00191.x/pdf>> Acesso em: Nov. 2011.

CHELLAPPA, N. T.; COSTA, M. A. M.. Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande Norte State, Brazil. **Acta Oecologica**, vol. 24, p. 3-10, 2003.

CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; KAWACHI, M.; KASAI, M.; KAYA, K.; WATANABE, M. M.. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 48, p. 345-355, 2004.

CHORUS, I.; BARTRAM, J.. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon E & EN, 1999.

CHISWELL, R.; SMITH, M.; NORRIS, R.; EAGLESHAM, G.; SHAW, G.; SEAWRIGHT, A.; MOORE, M.. The cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, and its related toxin, Cylindrospermopsin. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, vol. 3, p. 7-23, 1997.

CONTÉ, S. M.; RABELO, I. M. M.; GIORDANI, A. T.; DEWES, W.. Ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* nas bacias hidrográficas dos rios dos Sinos e Caí, Rio Grande do Sul - Brasil. **Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2000. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/v-025.pdf>> Acesso em: Out. 2010.

COUTÉ, A.; LEITAO, M.; MARTIN, C.. Première observation du genre *Cylindrospermopsis* (Cyanophyceae, Nostocales) en France. **Cryptogamie: Algologie**, vol. 18, p. 57-70, 1997.

CVIJAN, M.; FUŽINATO, S. The first finding of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszińska) Seenayya et Subba Raju, 1972 (Cyanoprokaryota) in Serbia. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, vol. 63, n. 2, p. 507-510, 2011.

DOKULIL, M. T.; MAYER, J.. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna. **Algological Studies**, vol. 83, p. 179-95, 1996.

DOKULIL, M. T.; TEUBNER, K.. Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiologia**, vol. 438, p. 1-12, 2000.

DUFOUR, P.; SARAZIN, G.; QUIBLIER, C.; SANE, S.; LEBOULANGER, C.. Cascading nutrient limitation of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Sahelian lake (North Senegal). **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 44, p. 219-230, 2006.

DYBLE, J.; PAERL, H. W.; NEILAN, B. A.. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on nifH and cpcBA-IGS nucleotide sequence analysis. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 68, n. 5, p. 2567-2571, 2002.

ESTEVEES, F. A.. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FABBRO, L. D.; DUIVENVOORDEN, L. J.. Profile of a bloom of the cyanobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical central Queensland. **Marine Freshwater Research**, v. 47, n. 5, p. 685-694, 1996.

FABBRO, L.; BAKER, M.; DUIVENVOORDEN, L.; PEGG, G.; SHIEL, R.. The effects of the ciliate *Paramecium cf. caudatum* Ehrenberg on toxin producing *Cylindrospermopsis* isolate from the Fitzroy River, Australia. **Environmental Toxicology**, vol. 16, p. 489-497, 2001.

FABRE, A.; CARBALLO, C.; HERNÁNDEZ, E.; PIRIZ, P.; BERGAMINO, L.; MELLO, L.; GONZÁLEZ, S.; PÉREZ, G.; LEÓN, J. G.; AUBRIOT, L.; BONILLA, S.; KRUK, C.. El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, vol. 5, n. 1, p. 112-125, 2010.

FALCONER, R.; HUMPAGE, A. R.. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, vol. 16, n. 2, p. 192-195, 2001.

FERNANDES, L. F.; GUTSEIT, K. C.; WOJCIECHOWSKI, J.; LAGOS, P. E. D.; XAVIER, C. F.; WOSIACK, A. C.. Ecologia do fitoplâncton no reservatório Rio Verde. In: CUNHA, C. L. N.; CARNEIRO, C.; GOBBI, E. F.; ANDREOLI, C. V.. **Eutrofização em Reservatórios: Gestão Preventiva. Estudo Interdisciplinar na Bacia do Rio Verde**, PR. ISBN 978-85-7335-286-3, Curitiba: Ed. da UFPR, 2011, 515 p.

FERNANDES, L. F.; LAGOS, P. e. D.; WOSIACK, A. C.; PACHECO, C. V.; DOMINGUES, L.; ZENHDER-ALVES, L.; COQUEMALA, V.. Comunidades fitoplanctônicas em ambientes lênticos. IN: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C.. (Eds). **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. Curitiba: Sanepar-Finep, 500 pp., 2005a.

FERNANDES, L. F.; WOSIACK, A. C.; DOMINGUES, L.; PACHECO, C. V.; LAGOS, P. E. D.. Cianobactérias e cianotoxinas. IN: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C.. (Eds). **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. Curitiba: Sanepar-Finep, 500 pp., 2005b.

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

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F.. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **Journal of Phycology**, vol. 43, p. 256-265, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.2007.00333.x/pdf>> Acesso em: Out. 2010.

FREITAS, M.. **Monitorização de cianobactérias e cianotoxinas nas lagoas Portuguesas de Mira e Vela comparando métodos moleculares, imunológicos e volumes de amostragem**. Tese (Mestrado) - University of Porto, Portugal, 2009.

GARCIA, F. C.. **Estudos ecológicos da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju no Lago Dom Helvécio, Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais, 82 pp., 2007.

GEMELGO, M. C. P.; SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A.; BARBOSA, H. R.. Population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, a Cyanobacteria toxic species, in water supply reservoirs in São Paulo, Brazil. **Hoehnea**, vol. 35, n. 2, p. 297-307, 2008.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J. R.; HAMMER, V. T.; KIM, W. K.. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. Verhandlungen. **Internationale Vereinnigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie**, vol. 15, p. 796-804, 1964.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W.. **Algae**. New Delhi, Prentice Hall, 2000, 640 pp.

GRIFFITHS, D. J.; SAKER, M. L.. The Palm Island Mystery Disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, vol. 18, p. 79-93, 2003.

HAMILTON, P. B.; LEY, L. M.; DEAN, S.; PICK, F. R.. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. **Phycologia**, vol. 44, p. 17-25, 2005.

HAWKINS, P. R.; RUNNEGAR, M. T. C.; JACKSON, A. R. B.; FALCONER, I. R.. Severe Hepatotoxicity Caused by the Tropical Cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju Isolated from a Domestic Water Supply Reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1292-1295, 1985.

HAWKINS, P. R.; CHANDRASENA, I. N. R.; JONES, I. G. J.; HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I. R.. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 341-346, 1997.

HAWKINS, P. R.; ELIZABETH, P.; FALCONER, I.; HUMPAGE, A.. Phenotypical Variation in a Toxic Strain of the Phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii*

(Nostocales, Cyanophyceae) During Batch Culture. **Environmental Toxicology**, vol. 16, n. 6, p. 460-7, 2001.

HONG, Y. A.; STEINMAN, A.; BIDDANDA, B.; REDISKE, R.; FAHNENSTIEL, G.. Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. **J. Great Lakes Res.**, vol. 32, p. 645-652, 2006.

HUSZAR, V. L. M.; SILVA, L. H.. Estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudos. **Limnotemas**, vol. 2, p. 17, 1999.

HUSZAR, V. L. M.; SILVA, L. H. S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P.; SANT'ANNA, C. L.. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. **Hydrobiologia**, vol. 424, p. 67-77, 2000.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. **Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do Estado do Paraná no período de 2005 a 2008**. Curitiba. 120 pp., 2009. Disponível em: <www.iap.pr.gov.br> Acesso em: Out. 2010.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. **Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do Estado do Paraná no período de 1999 a 2004**. Curitiba. 120 pp., 2005. Disponível em: <www.iap.pr.gov.br> Acesso em: Out. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). CPTEC. Ponta Grossa: Relevô. Estado - Paraná. Ponta Grossa, 2012. Imagem de satélite CBERS 2 CCD2PAN, BAND5, 27 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.dgi.inpe.br/CDSR/>> Acesso em: Fev. 2012.

ISVÁNOVICS, V.; SHAFIK, H. M.; PRÉSING, M.; JUHOS, S.. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. **Freshwater Biology**, vol. 43, p. 257-275, 2000.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W. J.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, B. C.; MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R.. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal Medicine**, vol. 338, p. 873-878, 1998.

JONES, W. W.; SAUTER, S.. Distribution and Abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana Lakes and Reservoirs. **SPEA-Indiana University**, 2005. Disponível em: <<http://www.spea.indiana.edu/clp/FinalCylindro%20Web.pdf>> Acesso em: Fev. 2012.

JUNQUEIRA-MELGAÇO, M.. **Efeitos da disponibilidade de luz e limitação de nutrientes sobre a competição entre cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais, Juiz de Fora, 64 pp., 2007.

KISS, T.; VEHOVSZKY, A.; HIRIPI, L.; KOVACS, A.; VOROS, L.. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurons. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology**, vol. 131C, n. 2, p. 167-176, 2002.

KOKOCINSKI, M.; STEFANIAK, K.; MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; IZYDORCZYK, K.; SOININEN, J.. The ecology of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) in two hypereutrophic lakes dominated by *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyta). **European Journal of Phycology**, vol. 45, n. 4, p. 365-374, 2011.

KOMÁREK, J.; HAUER, T.. **CyanoDB.cz** - On-line database of cyanobacterial genera, 2004. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz>> Acesso em: Out. 2011.

KOMÁRKOVÁ, J.. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In: Azevedo, T.. (ed.) **Anais dos IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia**, vol. I, São Paulo, Brazil, p. 327-340, 1998.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P. A. C.. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. **Algological Studies**, vol. 94, p. 207-222, 1999.

KRIENITZ, L.; HEGEWALD, E.. Über das Vorkommen von warmeliebenden blaugalgenarten in einem norddeutschen. **Lauterbornia**, vol. 26, p. 55-64, 1996.

Kützing, F. T.. Tabulae phycologicae. **Abbildungen der Tange**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 1846.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. Q.; OSHIMA I.. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, vol. 37, p. 1359-1373, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101019900080X>> Acesso em: Out. 2010.

LAGOS, P. E. D.. **Cianobactérias no Reservatório Iraí, PR: Variação temporal e forçantes ambientais**. Dissertação (Mestrado) Departamento de Botânica – Universidade Federal do Paraná, 2008.

LEAO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M.. Allopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. **European Journal of Phycology**, vol. 44, n. 3, p. 347-355, 2009.

LEE, R.E.. **Phycology**. Cambridge: University Press, 2005.

MCGREGOR, G. B.; FABBRO, L. D.. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, vol. 5, p. 195-205, 2000.

MESSINEO, V.; MELCHIORRE, S.; DI CORCIA, A.; GALLO, P.; BRUNO, M.. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, central Italy. **Environmental Toxicology**, vol. 25, p. 18-27, 2010.

MIHALI, T. K.; KELLMANN, R.; MUENCHHOFF, J.; BARROW, K. D.; NEILAN, B. A.. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 74, p. 716-722, 2008.

MOHAMED, Z. A.. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprocariota) in Egyptian fresh water. **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 59, p. 749-761, 2007.

MOLICA, R. J. R.; ONODERA, H.; GARCÍA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S. M.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LAGOS, N.. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, vol. 41, p. 606-611, 2002.

MOORE, D.; MCGREGOR, G. B.; SHAW, G.. Morphological changes during akinete germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, vol. 40, p. 1098-1105, 2004.

NEILAN, B. A.; SAKER, M. L.; FASTNER, J.. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, vol. 12, p. 113-140, 2003.

OHTANI, R. E.; MOORE, M. T. C.. Runnegar Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **J. Am. chem. Soc.**, vol. 114, p. 7941-7942, 1992.

PADISÁK, J.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, and expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives Hydrobiology**, vol. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.

PADISÁK, J.; REYNOLDS, C. S.. Selection of phytoplankton associations in lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokariotes. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 384, p. 41-53, 1998.

PADISÁK, J.; BÓRICS, G.; FEHER, G.; GRIGORSZKY, I.; OLDA, I.; SCHMIDT, A.; ZAMBONE-DOMA, Z. Dominant species, functional assemblages and frequency of equilibrium phases in late summer phytoplankton assemblages in Hungarian small shallow lakes. **Hydrobiologia**, vol. 502, p. 157-168, 2003.

PAERL, H.. **Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria)**. Oxford: Cambridge University Press, 441 pp., 1990.

- PALMER, C. M.. Report on the algae in relation to water quality of Paranoa Lake, Brasilia. **Pan American Health Organization/WHO**, Brasília, 1969.
- PICCINI, C.; AUBRIOT, L.; FABRE, A.; AMARAL, V.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; GIANNI, A.; FIGUEREDO, C. C.; VIDAL, L.; KRUK, C.; BONILLA, S.. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, vol. 10, p. 644-653, 2011.
- POSSELT, A. J.; BURFORD, M. A.; SHAW, G. Pulses of phosphate promote dominance of the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. **Journal of Phycology**, 45(3): 540-546, 2009.
- PRESING, M.; HERODEK, S.; VOROS, L.; KOBOR, I.. Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Balaton. **Archived Hydrobiology**, vol. 136, p. 553-562, 1996.
- REYNOLDS, C. S.. Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. **Freshwater Biology**, vol. 14, p. 111-142, 1984.
- REYNOLDS, C. S.. What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes limitation in hypereutrophic waters. **Hydrobiologia**, vol. 369/370, p. 11-26, 1998.
- REYNOLDS, C. S.; HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S.. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of plankton research**, vol. 24, n. 5, p. 417-428, 2002.
- RYAN, E. F.; HAMILTON, D. P.; BARNES, G. E.. Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waikato lakes of New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, vol. 37, p. 829-836, 2003.
- SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J.. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, vol. 39, n. 4, p. 349-354, 2000.
- SAKER, M. L.; NEILAN, B. A.. Varies Diazotrophies, Morphologies and Toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Austrália. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 67, n. 4, p. 1839-1845, 2001.
- SAKER, M. L.; NOGUEIRA, I. C. G.; VASCONCELOS, V. M.; NEILAN, B. A.; EAGLESHAN, G. K.; PEREIRA, P.. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 55, p. 243-250, 2003.
- SAKER, M. L.; THOMAS, A. D.; NORTON, J. H.. Cattle mortality attributed to the toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of the North Queensland. **Environmental Toxicology**, vol. 14, n. 1, p. 179-182, 1999.

SANEPAR, relatórios internos de 2006 a 2010. Sanepar: Curitiba.

SANT'ANNA, C. L.. Two new taxa of *Anabaena* and other Nostocaceae (Cyanophyceae) from the State of São Paulo, southeastern Brazil. **Algological Studies**, 6:527-545, 1991.

SHAFIK, H. M.; HERODEK, M.; PRESSING, M.; VÖRÖS, L.. Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju. Archiv fur Hydrobiologia supplement 140, **Algological Studies**, vol. 103, p. 75-94, 2001.

SINGH, R. N.. Seasonal variants of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz.. **Hydrobiologia**, vol. 20, n. 1, p. 87-91, 1962.

SOUZA, R. C. R.; CARVALHO, M. C.; TRUZZI, A. C.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) Dominance and a Contribution to the Knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings Reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**, vol. 13, n. 1, p. 73-81, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291098-2256%281998%2913:1%3C73::AID-TOX5%3E3.0.CO;2-4/pdf>> Acesso em: Out. 2010.

STUKEN, A.; RUCKER, J.; ENDRULAT, T.; PREUSSEL, K.; HEMM, M.; NIXDORF, B.; KARSTEN, U.; WIEDNER, C.. Distribution of three alien cyanobacterial species (Nostocales) in northeast Germany: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* and *Aphanizomenon aphanizomenoides*. **Phycologia**, vol. 45, p. 696-703, 2006.

TANIGUCHI, G. M.; ROCHA, O.; SENNA, P. A. C.. A comunidade fitoplanctônica de um lago tropical no sudeste do Brasil (lago Dom Helvécio, Estado de Minas Gerais). **Caderno de Pesquisa Sér. Bio.**, Santa Cruz do Sul, vol. 15, n. 1, p. 29-55, 2003. Disponível em: <<https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/5365>> Acesso em: Out. 2010.

TÓTH, L. G.; PÁDISAK, J.. Meteorological factors affecting the bloom of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. (Cyanophyta: Hormogonales) in the shallow Lake Balaton, Hungary. **Journal of Plankton Research**, vol. 8, p. 353-63, 1986.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil, **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 26, n. 1, p. 97-112, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbb/v26n1/v26n1a11.pdf>> Acesso em: Out. 2010.

VALÉRIO, E.; PEREIRA, P.; SAKER, M. L.; FRANCA, S.; TENREIRO, R.. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. **Harmful Algae**, vol. 4, p. 1044-1052, 2005.

VENTURA, C.; LAGOS, P.; FERNANDES, L. F.; GOBBI, E. F.; GOBBI, M. F.; RECKSIDER, R.; CARNEIRO, C.. Distribuição horizontal das cianobactérias no Reservatório do Iraí, Pinhais, Paraná. IN: **IX Congresso Brasileiro de Limnologia**,

Resumo expandido, Juiz de Fora, 2003. Disponível em: <http://fundacaosanepar.com.br/Sanepar/gecip/congressos_seminarios/eutrofizacao/tra009.pdf> Acesso em: Out. 2010.

VIDAL, L.; KRUK, C.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, vol. 3, p.142-151, 2008.

WIEDNER, C.; NIXDORF, B.; HINZE, R.; WIRSING, B.; NEUMANN, U.; WECKESSER, J.. Regulation of cyanobacteria and microcystin dynamics in polyimittics shallow lakes. **Archiv für Hydrobiologie**, vol. 155, p. 383-400, 2002.

WOLOSZYNSKA, J.. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des sawa-planktons. **Bulletin of the Inter-national Academy of Science Cracoviae**, Series B, vol. 6, p. 649-709, 1912.

XII CBL, **Anais do XII Congresso Brasileiro de Limnologia**, Gramado, RS. CD-ROM, 2009.

XIII CBL, **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Limnologia**, Natal, RN. CD-ROM, 2011.

YOO, R. S.; CARMICHEL, W. W.; HOEHN, R. C.; HRUDEY, S. E.. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide. **AWWA Research Foundation and American Water Works Association**, 229 pp., 1995.

YUNES, J. S.; MATTHIENSEN, A.; CARNEIRO, C.; OROSKI, F.; BECKER, V.; CARVALHO, M. C.. Florações de Cianobactérias Tóxicas: Mãos à obra ao problema. In: MARINHO, M.; ROLAND, F.; CESAR, D.. (Eds.) **Lições de Limnologia**. RiMa: São Carlos, 2005, p. 299-323.

ZOHARY, T.. Changes to the phytoplankton assemblage of Lake Kinneret after decades of a predictable, repetitive pattern. **Freshwater Biology**, vol. 49, p. 1355-1371, 2004.

ZOHARY, T.; SHLICHTER, M.. Invasion of Lake Kinneret by the N₂-fixing cyanobacterium *Cylindrospermopsis cuspis* Komárek and Kling. **Verhandlungen der Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie**, vol. 30, n. 8, p. 1251-1254, 2009.

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS TRICOMAS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* CYL04 ISOLADA DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS, PARANÁ

1 INTRODUÇÃO

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju é uma cianobactéria da ordem Nostocales. Os tricomas de *C. raciborskii* podem ser retos, curvos, sigmóides ou espiralados. As células vegetativas possuem aerótopos e são cilíndricas, sendo as apicais atenuadas. Os tricomas podem apresentar células especializadas entre as células vegetativas, como os acinetos, e terminais, como os heterócitos (BICUDO; MENEZES, 2005). Essa cianobactéria foi coletada pela primeira vez de um lago na Indonésia (WOLOSZYNSKA, 1912; KOMÁRKOVÁ, 1998; KOMÁRKOVÁ; LAUDARES-SILVA; SENNA, 1999) e descrita como *Anabaena raciborskii* Woloszynska, um microorganismo tropical (PADISÁK, 1997). Atualmente, *C. raciborskii* é uma espécie com ampla distribuição geográfica (PADISÁK, 1997), produzindo extensas florações cada vez mais frequentes em reservatórios no mundo todo (BRIAND *et al.*, 2004). Essa cianobactéria invasora pode ser produtora de um conjunto de compostos potencialmente tóxicos (BURFORD; DAVIS, 2011).

Cylindrospermopsis raciborskii apresenta uma ampla plasticidade fenotípica (BRIAND *et al.*, 2004), sendo que podem ocorrer diferenças morfofisiológicas extremas entre cepas isoladas de diferentes regiões do globo (SAKER *et al.*, 1999). As características fenotípicas dos organismos podem ser modificadas pela evolução para melhorar o desempenho do indivíduo em condições específicas as que a população é exposta (RICKLEFS, 2003). A diferenciação das populações permite que alguns indivíduos se saiam melhor em seu próprio ambiente (RICKLEFS, 2003) e podem ter capacitado *C. raciborskii* a invadir diferentes locais do globo (BRIAND *et al.*, 2004). As principais variações que ocorrem em nessa cianobactéria são fisiológicas e morfológicas.

Cylindrospermopsis raciborskii é uma espécie de difícil identificação por, entre outros motivos, crescer normalmente sem heterócitos e acinetos, que são os principais caracteres utilizados na identificação. São realizadas muitas identificações errôneas devido às semelhanças entre morfotipos, com outras espécies do gênero *Cylindrospermopsis* e até mesmo com outras cianobactérias, como *Raphidiopsis* F.E.Fritsch e M.F.Rich. Indivíduos de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Raphidiopsis mediterrânea* Skuja, por exemplo, são muito semelhantes filogeneticamente e considerados, atualmente, apenas diferentes fases do ciclo de vida de *C. raciborskii* (MOUSTAKA-GOUNI *et al.*, 2009). Além disso, a variação no tamanho das células é

uma característica comum em populações naturais de *C. raciborskii* (SAKER *et al.*, 1999; HAWKINS *et al.*, 2001) e podem ocorrer até mesmo entre isolados genéticos muito semelhantes (SAKER; NEILAN; GRIFFITHS, 1999; SAKER; NEILAN, 2001; SHAFIK *et al.*, 2003). Essas diferenças morfológicas são relacionadas tanto as condições ambientais quanto a diferenças genéticas (HAWKINS *et al.*, 1997; NEILAN *et al.*, 2003; BRIAND *et al.*, 2004).

As variações morfofisiológicas apresentadas por *C. raciborskii* são consideradas uma importante característica que possibilitou o avanço da espécie para latitudes mais altas. As variações morfológicas dentro e entre morfotipos complicam a sua diferenciação de outras espécies de Nostocales. Nesse sentido, uma melhor compreensão do alcance de suas preferências ecológicas e variabilidade morfológica se fazem necessárias (KOMÁREK, 2002), especialmente em áreas com escassez de estudos (VIDAL; KRUK, 2008). As propriedades observadas em culturas contínuas podem fornecer resultados que ajudem a compreender a variabilidade morfológica de *C. raciborskii* em campo (SHAFIK *et al.*, 2003). Dessa maneira, testamos a hipótese de que há variação na morfologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* dentro de uma curva de crescimento padrão. O objetivo deste capítulo foi acompanhar essa variabilidade morfológica, em cultivo, da cepa de *C. raciborskii* isolada do reservatório de Alagados e comparar com a disponível na literatura.

2 MATERIAL E MÉTODO

A cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* do reservatório de Alagados, Ponta Grossa, Sul do Brasil, foi identificada através da dimensão e forma da célula, além da morfologia e posição dos heterócitos e acinetos, com base nos trabalhos de Komárková (1998), Saker *et al.* (1999), Branco e Senna (1991) e Komárek e Komárková (2003). A morfologia da cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados foi acompanhada durante uma curva de crescimento padrão. Trinta tricomas vivos foram medidos (comprimento total em μm) e fotografados em microscópio Olympus BX40 com equipamento de captura Olympus DP71 acoplado (aumento de 100 vezes) a cada 2-3 dias durante 50 dias. Após esse período, os cultivos foram medidos e fotografados uma vez por semana. As amostras foram

conservadas com lugol acético, numeradas e armazenadas em tubos de microcentrífuga com capacidade para 2 mL.

3 RESULTADOS

A cepa de *C. raciborskii* CYL04 isolada do reservatório de Alagados possui morfologia de reta a curva (Figura 8 A, B). Indivíduos do morfotipo espiralado não foram encontrados. O comprimento médio dos tricomas ($n = 5400$) foi 117,4 (15 - 939) μm . As células vegetativas, normalmente cilíndricas, mediram 9,3 (3,4 - 25,5) μm de comprimento por 4,5 (2,3 - 7,2) μm de largura. Pouca ou nenhuma constrição foi observada entre as células dos tricomas no início do crescimento, com tendência a se tornarem relativamente mais constritos nos cultivos antigos. As células vegetativas apicais, normalmente, possuem uma das extremidades afiladas, mas os ápices dos tricomas apresentam grande variação na morfologia, podendo ocorrer ambos arredondados, um ápice afilado e outro arredondado ou ambos afilados nos tricomas mais antigos (Figura 8 C - G). Em média, estão presentes 12,6 células por tricoma.

Um ou dois heterócitos cônicos foram frequentemente observados nos ápices dos tricomas, tanto na amostra coletada de campo quanto nas coletadas das culturas estoque (Figura 9 A). Os heterócitos mediram, em média, 13,5 (8,5 - 16) μm de comprimento por 4,5 (2,5 - 6,5) μm de largura. A cepa CYL04 forma heterócitos nos primeiros dias de crescimento em cultivo. A formação dessas células se inicia entre o terceiro e o quinto dia a partir da inoculação em cerca de até 90% dos tricomas. Quando o cultivo entra em fase log de crescimento, os tricomas perdem os heterócitos devido a fragmentações sucessivas, sendo que em 15 dias todos os indivíduos podem aparecer sem heterócitos (Figura 10).

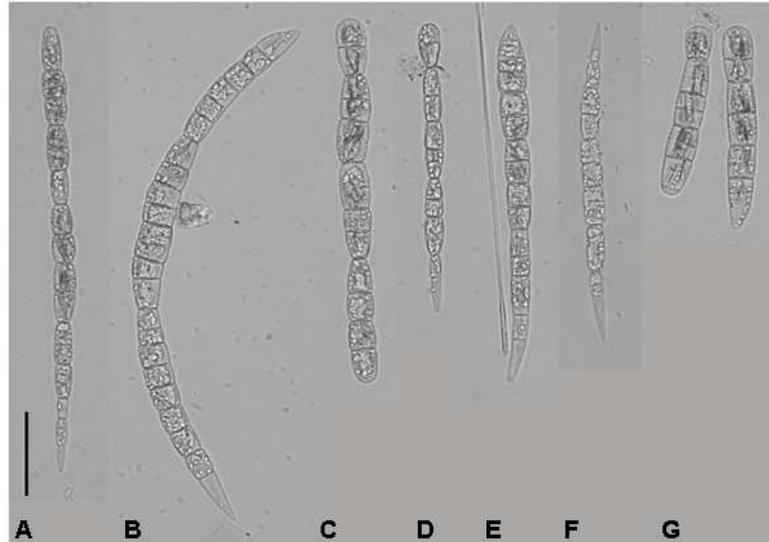


FIGURA 8 – MORFOLOGIA DO ÁPICE DO TRICOMA DA CEPA DE *C. raciborskii* CYL04.

A) Tricoma reto, B) Tricoma curvo.

A morfologia do ápice pode ser: C) ambos os ápices arredondados, D) um ápice arredondado e outro afilado, E) ápice superior afilando-se, ou F) ambos os ápices afilados; G) dois indivíduos provenientes da divisão de um tricoma mais antigo.

Um cultivo em fase adiantada de estabilização foi utilizado para ilustrar diferentes estágios do desenvolvimento da cepa.

Escala = 10 μ m.

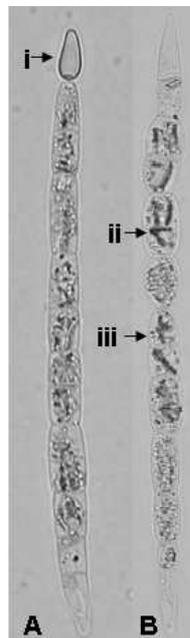


FIGURA 9 – DETALHES DOS TRICOMAS DE *C. raciborskii*.

A) Tricoma de *C. raciborskii* contendo um i) heterócito; B) detalhes do conteúdo celular: ii) vesícula de gás e iii) grânulo de polifosfato.

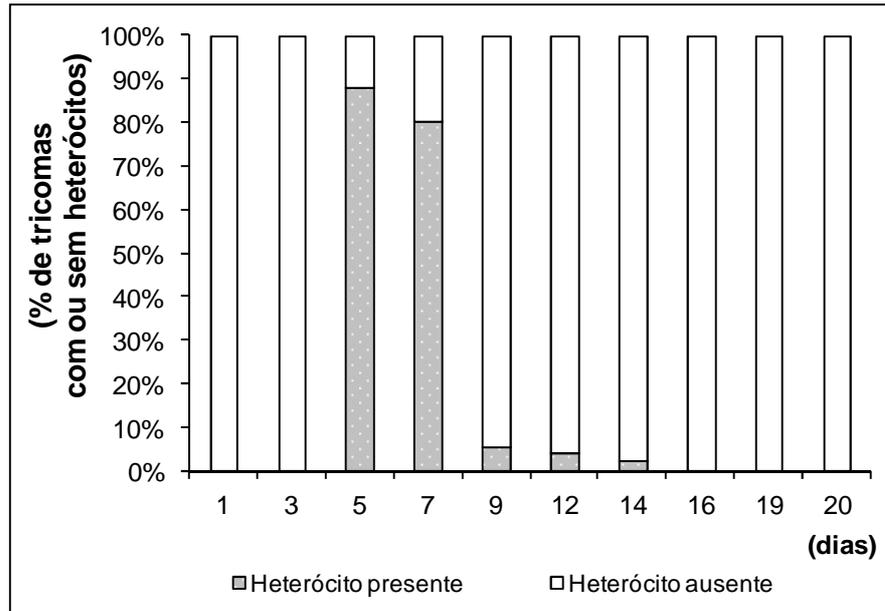


FIGURA 10 – PORCENTAGEM DE TRICOMAS COM HETERÓCITOS PRESENTE OU AUSENTE EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE TRICOMAS POR AMOSTRA A PARTIR DO INÍCIO DO CULTIVO.

Média de 30 amostras analisadas.

Não foram observados acinetos entre as células vegetativas nas amostras obtidas de campo, aparecendo em pequena quantidade apenas nas amostras obtidas de cultivos em fase de declínio. Quando presentes, essas células apresentaram-se isoladas ou em grupos de duas a três células, cada uma delas medindo 4,0 (3,0 - 5,5) μm de comprimento por 2,5 (2,0 - 3,8) μm de largura.

A presença das vesículas de gás e dos grânulos de polifosfato, estruturas características do conteúdo celular das espécies do grupo, pode ser observada, como na figura 9 B. Todas essas características morfológicas concordam com a descrição da espécie proposta por Seenayya e Subba Raju (1972).

Durante o crescimento da cepa de *C. raciborskii* CYL04 isolada do reservatório de Alagados foi possível observar que os tricomas sofrem modificações morfológicas dependendo da fase de crescimento em que se encontram. Na Figura 11 são apresentados tricomas com morfologias bem diferentes, à esquerda, um tricoma típico, compatível com a descrição da espécie e, à direita, um tricoma mais antigo e também mais largo e com maior constrição entre as células vegetativas.



FIGURA 11 – TRICOMAS DA CEPA CYL04 COM MORFOLOGIAS DIFERENTES.
Escala = 50 μm .

Durante a fase lag, os tricomas parecem bem característicos como nas descrições da espécie disponíveis na literatura (Figura 12, morfologia tipo I). Nesse caso, os tricomas apresentam os ápices afilados, a parede celular entre as células inconspícuas (difícil visualização) e poucas inclusões citoplasmáticas. Após 5 dias a partir da inoculação, inicia-se a formação dos heterócitos e as células começam a acumular granulações citoplasmáticas. Quando a cultura entra em fase log de crescimento, os tricomas apresentam morfologia tipo II (Figura 12). Nessa fase formam-se diversos locais de quebra preferencial nos tricomas e células vazias que também favorecem a fragmentação (Figura 13). Os ápices dos tricomas se tornam arredondados nos locais onde ocorreu a divisão. Os heterócitos desaparecem devido às fragmentações sucessivas dos tricomas. As granulações citoplasmáticas se tornam bem visíveis. No final dessa fase os ápices dos tricomas começam a afilar novamente e aparecem nas duas formas, afilados e arredondados. Após um período entre 10 e 15 dias de crescimento intensivo a cultura entra em fase estacionária do crescimento. Os tricomas presentes nessa fase de crescimento da cultura possuem diferentes morfologias (morfologia III) (Figura 12). Após 50 dias a partir da inoculação (fase de declínio do cultivo), pode-se observar tricomas de morfologia tipo IV, com maior constrição entre as células e inclusões citoplasmáticas grandes e

refringentes. Alguns desses tricomas podem conter heterócitos. Em tricomas provenientes da fase de declínio dos cultivos, as células diminuem de tamanho e se tornam mais arredondadas, em forma de barril (Figura 12).

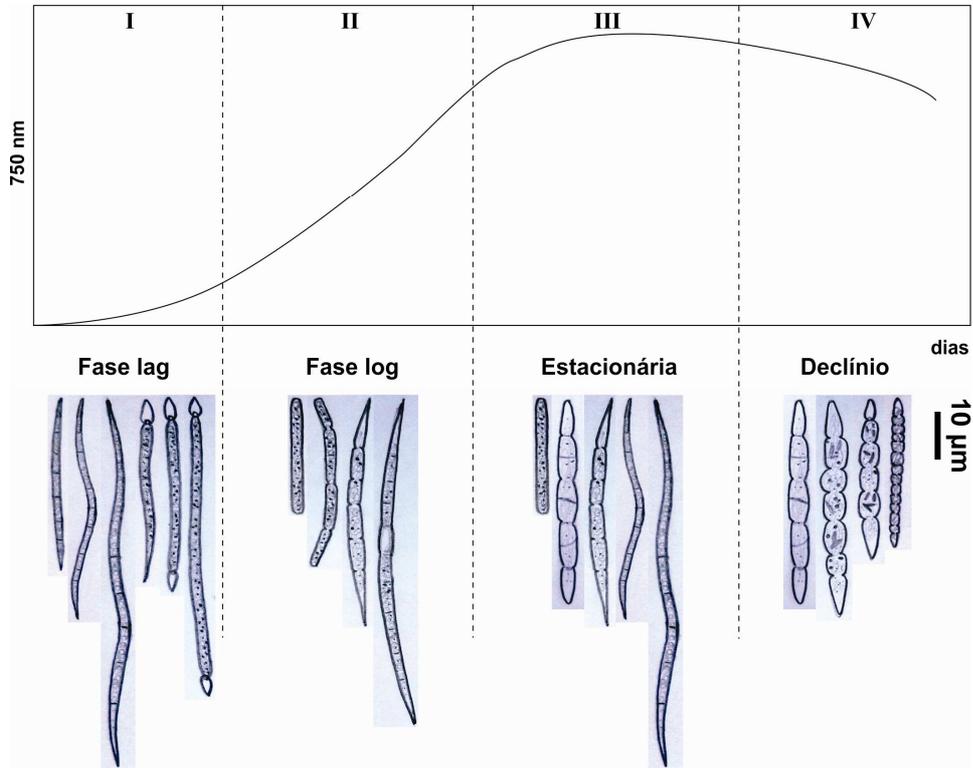


FIGURA 12 – DIFERENTES MORFOLOGIAS DOS TRICOMAS DE *C. raciborskii* CYL04 DURANTE AS FASES DE CRESCIMENTO DO CULTIVO.

Não foram adicionados valores específicos aos eixos, pois tanto a densidade óptica (750 nm) quanto a duração da curva de crescimento padrão (dias) depende da cepa cultivada, das condições de cultivo, do inóculo inicial, entre outros parâmetros.

Durante a fase de maior crescimento (fase log) do cultivo, *C. raciborskii* formou múltiplos locais de fragmentação ao longo do comprimento dos tricomas (Figura 13). Além disso, a fragmentação ocorreu também a partir de células que parecem vazias ao serem observadas em microscópio óptico (Figura 13). Já durante a fase de estabilização (crescimento mais lento) do cultivo, a fragmentação do tricoma ocorreu, de maneira geral, formando apenas dois novos indivíduos (Figura 14).

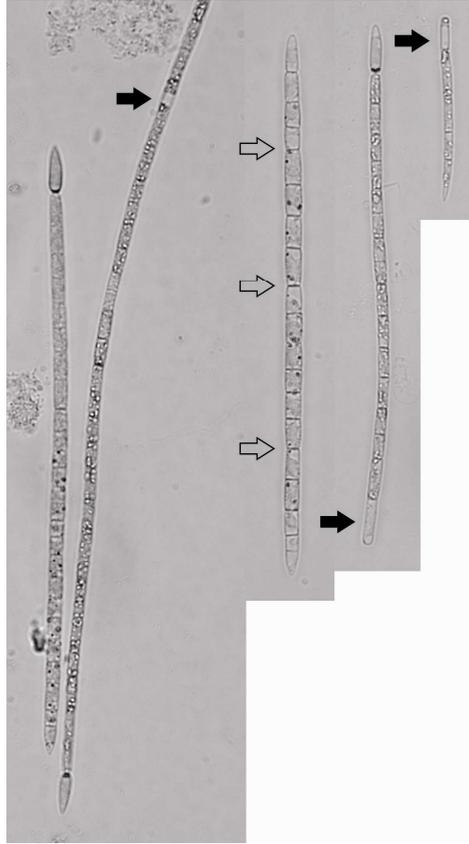


FIGURA 13 – MORFOLOGIA DOS TRICOMAS COLETADOS NO INÍCIO DA FASE DE CRESCIMENTO EXPONENCIAL.

Setas preenchidas indicam "células vazias" que aparecem antes da fragmentação dos tricomas; Setas não preenchidas indicam a formação de locais de constrição entre as células onde preferencialmente ocorrerá a fragmentação.

Escala = 50 μ m.

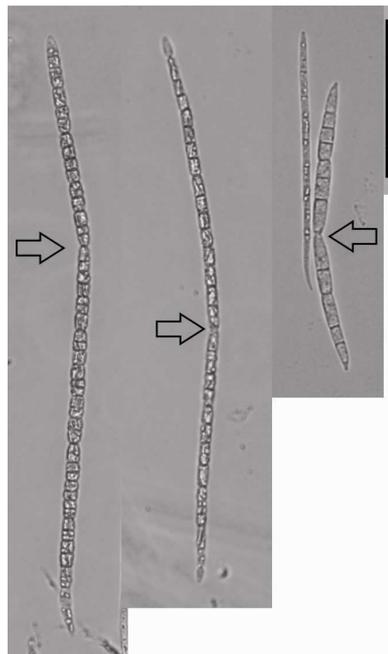


FIGURA 14 – MORFOLOGIA DE TRICOMAS DE *C. raciborskii* PROVENIENTES DE UM CULTIVO EM FASE DE ESTABILIZAÇÃO.

Escala = 50 μ m.

As culturas de *C. raciborskii* CYL04 apresentam cores diferentes dependendo da fase de crescimento. Os cultivos partem do verde claro, na fase log vão de verde oliva a verde escuro, quando entram em fase de estabilização os cultivos apresentam cor marrom e na fase de decaimento chegam ao alaranjado (Figura 15). Em culturas em fase adiantada de decaimento foi observada a formação de uma espécie de nata na superfície do meio de cultivo (Figura 15), diferente do observado durante as fases de maior crescimento, quando os tricomas tendem a sedimentar e permanecer no fundo do Erlenmeyer.



FIGURA 15 – CORES DOS CULTIVOS DE *C. raciborskii* EM DIFERENTES FASES DO CRESCIMENTO.

A diferença entre os cultivos é de um mês, resultante de repicagens mensais. O mais recente é o frasco à esquerda, seguido por cultivos repicados com um mês de antecedência. O frasco utilizado como inoculo inicial da repicagem é sempre mantido como backup.

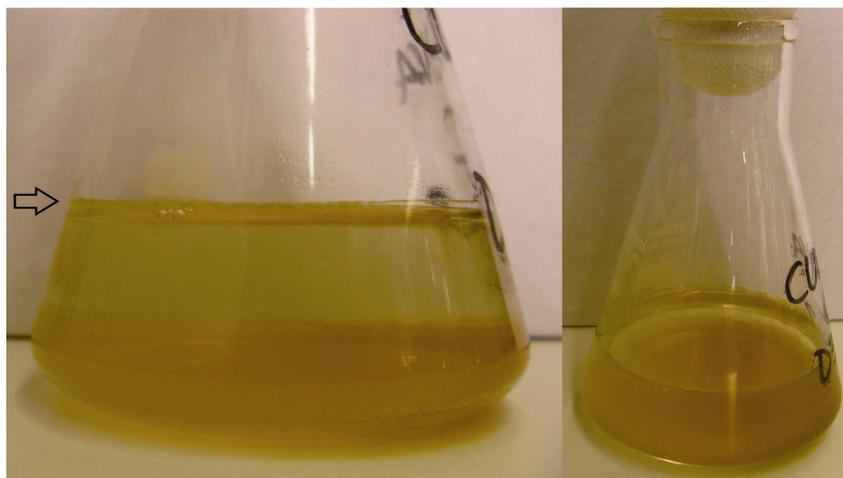


FIGURA 16 – FORMAÇÃO DE NATA NOS CULTIVOS DE *C. raciborskii* EM FASE DE DECAIMENTO.

A seta indica a formação de nata na superfície do meio de cultivo.

4 DISCUSSÃO

As principais características diacríticas do gênero *Cylindrospermopsis* são, segundo Komárková (1998): (1) os tricomas são isopolares, solitários, planctônicos, cilíndricos e ligeiramente atenuados em direção aos ápices, podendo apresentar forma reta ou espiralada. Essa descrição é idêntica à do gênero *Aphanizomenon* Bornet et Flahault, do qual *Cylindrospermopsis* difere, no entanto, pelo modo de desenvolvimento do heterócito; (2) os heterócitos desenvolvem-se apenas a partir de células terminais; (3) os acinetos desenvolvem-se facultativamente ao lado ou ligeiramente distante dos heterócitos, solitariamente, em pares ou em séries curtas. O desenvolvimento dos acinetos em combinação com os heterócitos dá aos filamentos de *Cylindrospermopsis* uma aparência típica subsimétrica. Entre os gêneros relacionados, apenas *Aphanizomenon* apresenta tricomas subsimétricos, mas os heterócitos desenvolvem-se intercaladamente entre as células vegetativas. O gênero *Anabaenopsis* (Woloszyńska) Miller, por sua vez, possui uma estrutura tipicamente metamérica. Outro gênero em que os heterócitos se desenvolvem em ambas as extremidades dos tricomas (mas não após divisão celular assimétrica) é *Cylindrospermum* Kützing ex Bornet et Flahault. No entanto, esse gênero apresenta tricomas tipicamente simétricos, com heterócitos e acinetos terminais que se desenvolvem um ao lado do outro (KOMÁRKOVÁ, 1998).

O comprimento dos tricomas da cepa CYL04 foi muito variável. As células individuais apresentaram-se, muitas vezes, difíceis de distinguir, pois raramente há constrição nas paredes celulares entre as células. Maiores constrições nas paredes transversais dos tricomas da cepa de *C. raciborskii* CYL04 foram observadas apenas em indivíduos mais antigos, em cultivos em fase de decaimento. As células apicais apresentaram grande variação na morfologia quando observados em cultivo, podendo ocorrer: ambos os ápices arredondados nos indivíduos mais novos, provavelmente provenientes da divisão múltipla dos tricomas; um ápice afilado (mais antigo) e outro arredondado (proveniente de divisão); ou ambos afilados nos tricomas mais antigos, que tiveram tempo de assumir a morfologia original. As células apicais atenuadas variaram entre 4 - 20 μm de comprimento e 2 - 4 μm e largura.

TABELA 4 – DIMENSÕES DOS TRICOMAS DE CEPAS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* DE DIFERENTES REGIÕES DO GLOBO.

País	Morfotipo	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Tipo de estudo	Autor
Brasil (PR)	Reto	15 - 939	2,3 - 6,5 (7,2)	Laboratorial	Presente estudo
Brasil (PB)	Reto	72,5	1,2	Laboratorial	Santos, 2009
Austrália	Reto	119	2,9	Laboratorial	Saker <i>et al.</i> , 1999
Austrália	Espiralado	141	3	Laboratorial	Saker <i>et al.</i> , 1999
EUA	Reto	51 - 311	1,7 - 4,2	Laboratorial	Hong <i>et al.</i> , 2006
Uruguai	Reto	127,1	2,3	Laboratorial	Piccini <i>et al.</i> , 2011
Uruguai	Reto	154,8	2,7	Laboratorial	Piccini <i>et al.</i> , 2011
Uruguai	Reto	12 - 300	1 - 4,8	Campo	Vidal e Kruk, 2008
Hungria	Reto	40 - 300	2,4 - 2,6	Campo	Padisák <i>et al.</i> , 2003

A cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados apresentou grande variação de tamanho quando cultivada em laboratório. Os tricomas provenientes das fases estacionária e de declínio dos cultivos apresentaram-se mais largos e mais compridos do que as descrições de outros autores (Tabela 4). Tricomas longos, com até 939 µm de comprimento, foram encontrados, muito maiores comparativamente ao registrado na literatura (Tabela 4). Tricomas com células vegetativas mais largas (até 7,2 µm) na região central foram encontrados em cultivos em fase de decaimento. Outros autores registram dimensões bem menores para cepas cultivadas de diferentes regiões do globo. Vidal e Kruk (2008) encontraram tricomas largos em um lago eutrófico uruguaio, com aproximadamente 5 µm de largura, mesmo assim, menores que os observados no presente estudo. Segundo Hawkins *et al.* (2001) as células de *C. raciborskii* em cultura são tipicamente mais largas do que as de populações selvagens. O estreitamento das células em populações selvagens pode ser um indicador morfológico da menor concentração de nutrientes em águas naturais quando comparada a concentração presente nos meios de cultura (HAWKINS *et al.*, 2001). Essas diferenças entre o tamanho das células é uma característica comum em populações naturais de *C. raciborskii* (HAWKINS *et*

al., 2001; KOMÁREK; KOMARKOVÁ, 2003), sendo que a morfologia das espécies cultivadas pode, de fato, se tornar extremamente modificada (SHAFIK *et al.*, 2003).

TABELA 5 – DIMENSÕES DOS HETERÓCITOS E ACINETOS DE CEPAS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* DE DIFERENTES REGIÕES DO GLOBO.

País	Heterócitos		Acinetos		Autor
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento (µm)	Largura (µm)	
Brasil	8,5 - 16,0	2,5 - 6,5	3,0 - 5,5	2,0 - 3,8	Presente estudo
Austrália	5,8	2,6	11,4	3,9	Saker <i>et al.</i> , 1999
EUA	5,0 - 11,0	2,0 - 5,0	8,0 - 16,0	2,0 - 5,0	Hong <i>et al.</i> , 2006
Japão e Tailândia	3,3 - 11,9	1,9 - 7,0	8,5 - 17,8	2,8 - 7,0	Chonudomkul <i>et al.</i> , 2004
Uruguai	2,0 - 12,0	1,4 - 3,0	2,5 - 18	2,0 - 4,8	Vidal e Kruk, 2008

Os heterócitos e acinetos apresentaram-se dentro das medidas observadas por outros autores (Tabela 5) e da descrição de Komárek e Komarková (2003).

Cylindrospermopsis raciborskii tem sido identificada erroneamente como *Anabaenopsis*, *Raphidiopsis* e *Cylindrospermum* (HAWKINS *et al.*, 1997). A dificuldade na identificação da espécie se deve, em partes, ao fato de que a morfologia do tricoma varia amplamente, dependendo do morfotipo, da fase de crescimento da população, da condição ambiental, entre outros.

A cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados é do morfotipo reto. Há tipicamente dois morfotipos principais de *C. raciborskii*: reto e espiralado (MCGREGOR; FABBRO, 2000; SAKER; NEILAN; GRIFFITHS, 1999). Dentro de cada morfotipo há uma grande variabilidade de tamanho e número de células por tricoma. O morfotipo reto tende a ser maior e, também, produzir mais toxina por célula (SAKER; NEILAN; GRIFFITHS, 1999). A variabilidade entre morfotipos também tem sido relatada variando com a idade da floração. Segundo Padisák *et al.* (2003), em campo, os tricomas derivados diretamente dos acinetos são principalmente do morfotipo reto, mesmo presentes em uma população composta, em sua maioria, por morfotipos espiralados. Saker e Griffiths (2001) observaram que o morfotipo espiralado tende a aumentar durante ou imediatamente após florações do morfotipo reto. O morfotipo apresentado pela cepa parece não ter relação com a

região geográfica, mas com as condições locais (VIDAL; KRUK, 2008). Briand *et al.* (2004) encontraram morfologias distintas da mesma cepa de *C. raciborskii* sob temperaturas e intensidades luminosas diferentes. A morfologia pode refletir a resposta funcional da população a mudanças ambientais (KRUK *et al.*, 2010).

A morfologia de *C. raciborskii* pode variar também conforme a fase de crescimento da população. Os tricomas medidos durante esse estudo apresentaram grande variação de tamanho durante a curva de crescimento padrão. As populações naturais, por sua vez, podem consistir de tricomas com diferentes idades (KOMÁRKOVA; LAUDARES-SILVA; SENNA, 1999). Além disso, a mesma cianobactéria crescendo em diferentes condições ambientais pode possuir distintas características, dificultando ainda mais a identificação (CHISWELL *et al.*, 1997). Em cultivos não contínuos, como o utilizado durante esse estudo, as condições no meio de cultivo, como de luz e nutrientes, podem mudar drasticamente durante uma curva de crescimento padrão. Segundo Alster *et al.* (2010), em campo, o comprimento dos filamentos apresenta um ciclo sazonal típico, sendo que filamentos mais curtos tendem a ocorrer durante o pico da floração. Pádisak *et al.* (2003) acompanharam uma população de *C. raciborskii* durante um ciclo anual de desenvolvimento no Lago Balaton, na Hungria, e observaram algumas variações morfológicas, como, por exemplo, no comprimento dos tricomas. Os tricomas originados de divisões a partir de outros tricomas apresentaram-se mais curtos e com apenas um ápice acuminado. Os tricomas germinados diretamente dos acinetos apresentaram-se mais estreitos que os mais antigos (PADISÁK *et al.*, 2003). Komárková, Laudares-Silva e Senna (1999) estudaram a morfologia de uma população de *C. raciborskii* de uma lagoa costeira brasileira durante dois anos e encontraram quatro morfologias distintas dependendo da idade da população e da condição ambiental.

Até mesmo cepas isoladas de locais muito próximos geograficamente podem apresentar características extremamente diferentes (VIDAL; KRUK, 2008). Piccini *et al.* (2011), estudando duas cepas uruguaias, encontraram diferenças significativas entre valores médios de características morfológicas, como comprimento e largura dos tricomas. É possível que esses tricomas com diferentes morfologias, referentes a cada fase de crescimento ou condição ambiental, sejam descritos como espécies distintas (CHISWELL *et al.*, 1997).

Ainda dependendo da condição ambiental, os acinetos e heterócitos podem permanecer ausentes (CHISWELL *et al.*, 1997; PADISÁK, 1997; SAKER; NEILAN,

2001), o que dificulta o reconhecimento de *Cylindrospermopsis* e facilita a identificação errônea como *Raphidiopsis*. Ainda podem ocorrer variações de cor, presença de heterócitos, posição e forma dos acinetos, largura dos tricomas (FABBRO *et al.*, 1996), entre outros.

Da mesma forma, em cultivo, a espécie parece mudar sua morfologia conforme a fase de crescimento ou a condição na qual se encontra. Em laboratório, é possível acompanhar diariamente as mudanças morfológicas das cepas de *C. raciborskii* e fornecer uma importante ferramenta para evitar identificações errôneas. A correta identificação de *C. raciborskii* é pertinente tanto do ponto de vista ecológico quanto toxicológico (SHAFIK *et al.*, 2003), pois se trata de uma espécie que pode ser produtora de toxina. A fim de minimizar esse problema, caracterizamos, em laboratório, as fases do crescimento de *C. raciborskii* e as distintas morfologias que os tricomas podem apresentar. Observamos uma tendência de diminuição das células que podem assumir uma forma mais arredondada. Essa morfologia do tricoma proveniente da fase de declínio do cultivo poderia estar relacionada não somente a idade do indivíduo, mas a condição ambiental (KOMÁRKOVÁ *et al.*, 1999), como o esgotamento de nutrientes. Komárková, Laudares-Silva e Senna (1999) também correlacionaram esse tipo de morfologia semelhante com a falta de nutrientes na lagoa de origem da população estudada, o que certamente ocorre em culturas não contínuas (como as do presente estudo) em laboratório.

Em culturas em fase de declínio e morte foi observada a formação de uma espécie de nata na superfície do meio de cultivo, devido a maior produção de vacúolos de gás durante a fase de decaimento da população, assim como observado também em uma população natural de *C. raciborskii* por Komárková, Laudares-Silva e Senna (1999). Essas culturas em fase de decaimento apresentaram coloração alaranjada, fato que pode estar relacionado ao aumento da concentração de pigmentos acessórios no interior das células, como os carotenóides (BONILLA *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÕES

A cepa de *C. raciborskii* CYL04 exibe grande variabilidade em sua morfologia. Em laboratório, caracterizamos quatro fases do crescimento, cada uma com tricomas apresentando distintas morfologias.

A correta identificação de *C. raciborskii* é pertinente tanto do ponto de vista ecológico quanto toxicológico, pois se trata de uma espécie que pode ser produtora de toxina. A caracterização das distintas morfologias que podem ser assumidas por *C. raciborskii*, em laboratório, pode fornecer uma ferramenta taxonômica útil, a fim de minimizar possíveis identificações errôneas em campo.

Em comparação com outras cepas isoladas de diferentes regiões do globo, CYL04 apresenta a maior largura e comprimento do tricoma.

Nossos resultados confirmam a grande plasticidade de *C. raciborskii* que pode capacitar a espécie a invadir ambientes aquáticos com as mais diversas características.

Sugerimos estudos morfológicos com cepas de *C. raciborskii* isoladas de diferentes regiões do globo, bem como cultivadas sob diferentes condições experimentais.

6 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, R. A.. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press: Oxford, UK, 2005.
- ALSTER, A.; KAPLAN-LEVY, R. N.; SUKENIK, A.; ZOHARY, T.. Morphology and phylogeny of a non-toxic invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* from a Mediterranean Lake. **Hydrobiologia**, vol. 639, p. 115-128, 2010.
- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M.. **Gêneros de Algas continentais do Brasil**. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Ed. Rima, 489 pp., 2005.
- BONILLA, S.; AUBRIOT, L.; SOARES, M. C. S.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; FABRE, A.; HUSZAR, V. L. M.; LÜRLING, M.; ANTONIADES, D.; PADISÁK, J.; KRUK, C.. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 79, p. 594-607, 2012.
- BRANCO, C. W. C.; SENNA, P. A. C.. The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.**, vol. 61, p. 85-91, 1991.
- BRIAND, J. F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, vol. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.
- BURFORD, M.A.; DAVIS, T. W.. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, vol. 29, 883-891, 2011.
- CARNEIRO, R. L.; SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, vol. 31, n. 5, p. 481-488, 2009.
- CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VÁSQUEZ, M.. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, vol. 44, p. 483-489, 2004.
- CHISWELL, R.; SMITH, M.; NORRIS, R.; EAGLESHAM, G.; SHAW, G.; SEAWRIGHT, A.; MOORE, M.. The cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, and its related toxin, Cylindrospermopsin. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, vol. 3, p. 7-23, 1997.
- CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; KAWACHI, M.; KASAI, M.; KAYA, K.; WATANABE, M. M.. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales,

Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 48, p. 345-355, 2004.

FABBRO, L. D.; DUIVENVOORDEN, L. J.. Profile of a bloom of the cyanobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical central Queensland. **Marine Freshwater Research**, v. 47, n. 5, p. 685-694, 1996.

HAANDE, S., ROHRLACK, T., BALLOT, A., RÓBERG, K., SKULBERG, R., BECK, M., WIEDNER, C.. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, vol. 7, p. 692-701, 2008.

HAWKINS, P. R.; CHANDRASENA N. R.; JONES, G. J.; HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I. R.. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, Vol. 35, No. 3, pp. 341 346, 1997.

HAWKINS, P. R.; ELIZABETH, P.; FALCONER, I.; HUMPAGE, A.. Phenotypical Variation in a Toxic Strain of the Phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) During Batch Culture. **Environmental Toxicology**, vol. 16, n. 6, p. 460-7, 2001.

HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C. D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, D.; ZOHARY, T.. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, vol. 35, p. 403-424, 1999.

HONG, Y.; STEINMAN, A.; BIDDANDA, B.; REDISKE, R.; FAHNENSTIEL, G.. Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. **Journal of Great Lakes Research**, vol. 32, p. 645-652, 2006.

KOMÁREK, J.. **Proceedings of Freshwater Harmful algal blooms: health risk and control management**. Istituto Superiore di Sanità. Serena Melchiorre, Emanuela Viaggiu and Milena Bruno (Eds). Rapporti ISTISAN 02/9. 103 p., 2002. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz/Cylindrospermopsis>> Acesso em: Fev. 2012.

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

KOMÁRKOVÁ, J.. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In: Azevedo, T.. (ed.) **Anais dos IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia**, vol. I, São Paulo, Brazil, p. 327-340, 1998.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P. A. C.. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. **Algological Studies**, vol. 94, p. 207-222, 1999.

KRUK, C.; HUSZAR, V. L. M.; PEETERS, E. T. H. M.; BONILLA, S.; COSTA, L.; LÜRLING, M.; REYNOLDS, C. S.; SCHEFFER, M.. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. **Freshwater Biology**, vol. 55, p. 614-627, 2010.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P. A. C.. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. **Algological Studies**, vol. 94, p. 207-222, 1999.

MOUSTAKA-GOUNI, M.; KORMAS, K.; VARDAKA, E.; KATSIAPI, M.; GKELIS, S.. *Raphidiopsis mediterranea* Skuja represents non-heterocytous life-cycle stages of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju in Lake Kastoria (Greece), its type locality: Evidence by morphological and phylogenetic analysis. **Harmful Algae**, vol. 8, p. 864-872, 2009.

NEILAN, B. A.; SAKER, M. L.; FASTNER, J.; TÖRÖKNÉ, A.; BURNS, B. P.. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, vol. 12, p. 113-140, 2003.

PADISÁK, J.; BÓRICS, G.; FEHER, G.; GRIGORSZKY, I.; OLDA, I.; SCHMIDT, A.; ZAMBONE-DOMA, Z. Dominant species, functional assemblages and frequency of equilibrium phases in late summer phytoplankton assemblages in Hungarian small shallow lakes. **Hydrobiologia**, vol. 502, p. 157-168, 2003.

PADISÁK, J.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, and expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives Hydrobiology**, vol. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.

PICCINI, C.; AUBRIOT, L.; FABRE, A.; AMARAL, V.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; GIANNI, A.; FIGUEREDO, C. C.; VIDAL, L.; KRUK, C.; BONILLA, S.. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, vol. 10, p. 644-653, 2011.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 5 ed.. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 501 p., 2003.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J.. Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. **Marine and Freshwater Research**, vol. 52, n. 6, p. 907-915, 2001.

SAKER, M. L.; THOMAS, A. D.; NORTON, J. H.. Cattle mortality attributed to the toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of the North Queensland. **Environmental Toxicology**, vol. 14, n. 1, p. 179-182, 1999.

SAKER, M. L.; NEILAN, B. A.. Varies Diazotrophies, Morphologies and Toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales,

Cyanophyceae) from Northern Austrália. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 67, n. 4, p. 1839-1845, 2001.

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

SANTOS, P. V.. **Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa***: implantação no crescimento de culturas e na reprodução de microcistinas. Tese de mestrado – Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento. São Carlos, 2009.

SHAFIK, H. M.; HERODEK, M.; PRESSING, M.; VÖRÖS, L.. Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju. Archiv fur Hydrobiologia supplement 140, **Algological Studies**, vol. 103, p. 75-94, 2001.

SHAFIK, H. M.; VÖRÖS, L.; SPRÓBER, P.; PRÉSING, M.; KOVÁCS, A.. Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. **Hydrobiologia**, vol. 506-509, n. 1-3, p. 163-167, 2003.

WOLOSZYNSKA, J.. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. **Bulletin of the International Academy of Science Cracoviae**, vol. 6, p. 649-709, 1912.

VENRICK, E. L.. How many cells to count? In: SOURNIA, A. (Ed.) **Phytoplankton manual**. Paris: Unesco, p. 167-180, 1978.

VIDAL, L.; KRUK, C.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, vol. 3, p.142-151, 2008.

CAPÍTULO 2

**EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA NO CRESCIMENTO DE UMA
CEPA DE *Cylindrospermopsis raciborskii* ISOLADA DE UM
RESERVATÓRIO SUBTROPICAL BRASILEIRO**

1 INTRODUÇÃO

Cylindrospermopsis raciborskii é uma cianobactéria potencialmente tóxica inicialmente descrita como uma espécie tropical (PADISÁK, 1997). Todavia, essa espécie vem produzindo florações cada vez mais frequentes em reservatórios no mundo todo, podendo ser considerada, atualmente, uma espécie de distribuição cosmopolita (BRIAND *et al.*, 2004). Essa cianobactéria foi primeiramente classificada como uma espécie adaptada a crescer em baixas intensidades luminosas (PADISÁK; REYNOLDS, 1998). No entanto, a espécie tem se revelado capaz de sobreviver em ampla faixa de intensidades luminosas. O ótimo de crescimento da espécie, segundo a literatura, ocorre entre 80 (BRIAND *et al.*, 2004) e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (DOKULIL; MAYER, 1996). Em alguns reservatórios brasileiros as florações de *C. raciborskii* ocorrem sob intensidades luminosas entre 14 e 830 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (BOUVY *et al.*, 1999; BOUVY *et al.*, 2003). Na Austrália, as florações de *C. raciborskii* em lagos ocorrem sob altas intensidades luminosas, maiores que 2500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (FABRO; DUIVENVOORDEN, 1996).

Alguns autores têm tentado elucidar a ecofisiologia da espécie em laboratório; por outro lado, poucos trabalhos analisam a intensidade luminosa como um fator isolado no crescimento de cepas de *C. raciborskii* (BRIAND *et al.*, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2009; BONILLA *et al.*, 2012). Alguns estudos foram realizados com cepas brasileiras isoladas do estado de Pernambuco (BRIAND *et al.*, 2004) e de São Paulo (CARNEIRO *et al.*, 2009), mas ainda não existem publicações sobre as preferências ecológicas de cepas paranaenses de *C. raciborskii*. A intensidade luminosa representa um regulador ambiental importante para o crescimento de *C. raciborskii*, todavia os efeitos desse parâmetro sobre o crescimento da cianobactéria ainda não estão bem investigados (DYBLE *et al.*, 2006). Além disso, cepas isoladas de regiões muito próximas podem responder de maneira extremamente diferente as condições as quais são submetidas, refletindo a importância de se realizar estudos específicos com cepas isoladas de diferentes regiões.

O objetivo desse capítulo foi avaliar as respostas morfofisiológicas de uma cepa de *C. raciborskii* isolada de um reservatório subtropical brasileiro, cultivada sob diferentes intensidades luminosas, a fim de caracterizar sua preferência ecológica no que diz respeito a esse fator ambiental. Assim como, discutir a elevada tolerância

fisiológica atribuída a *C. raciborskii* (BRIAND *et al.*, 2004), que permite que a espécie mantenha seu crescimento em uma ampla faixa de condições ambientais, nesse caso, intensidades luminosas.

2 MATERIAL E MÉTODO

Para verificar o efeito da intensidade luminosa no crescimento de *C. raciborskii*, a cepa CYL04 foi cultivada a 25°C sob nove intensidades luminosas (9, 20, 50, 80, 100, 125, 150, 200 e 250 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), em triplicata (Tabela 6). As respostas fisiológica e morfol\u00f3gica da cepa foram acompanhadas, a partir da medida do crescimento dos cultivos (densidade \u00f3ptica a 750 nm) e do tamanho dos tricomas, respectivamente. Antes do in\u00edcio do experimento, um pr\u00e9-cultivo foi aclimatado, a 25°C, em cada uma das intensidades luminosas. A temperatura utilizada nesse experimento foi determinada por ser, segundo a literatura espec\u00edfica, a temperatura \u00f3tima de crescimento da esp\u00e9cie (SAKER; GRIFFITHS, 2000; BRIAND *et al.*, 2004).

TABELA 6 – INTENSIDADES LUMINOSAS UTILIZADAS DURANTE O EXPERIMENTO DE LUZ VARI\u00c1VEL E C\u00d3DIGOS REFERENTES AOS CULTIVOS SUBMETIDOS A CADA UMA DELAS. Os c\u00f3digos das r\u00e9plicas foram adicionados entre par\u00eanteses.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	C\u00f3digo
9	L9 (1,2,3)
20	L20 (1,2,3)
50	L50 (1,2,3)
80	L80 (1,2,3)
100	L100 (1,2,3)
125	L125 (1,2,3)
150	L150 (1,2,3)
200	L200 (1,2,3)
250	L250 (1,2,3)

O in\u00f3culo inicial ($2,3 \times 10^6$ c\u00e9lulas.mL⁻¹; densidade \u00f3ptica a 750 nm = 0,199) foi colhido da pr\u00e9-cultura adaptada (10 dias) \u00e0s intensidades luminosas testadas em fase exponencial de crescimento (fase log) e inoculado em 200 mL de ASM-1 modificado (densidade \u00f3ptica inicial = 0,000). Os frascos Erlenmeyers contendo os

cultivos em condições experimentais foram agitados manualmente e aleatorizados uma vez por dia.

Amostras foram tomadas sob condições estéreis de cada um dos tratamentos uma vez por dia, durante 20 dias, sempre no mesmo horário. A densidade óptica (absorbância a 750 nm) (SHAFIK *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004) de cada uma das amostras foi medida em espectrofotômetro Hitachi U-2001. A abundância celular (células.mL⁻¹) de três tratamentos submetidos a intensidade luminosa considerada baixa, intermediária e alta (L9, L100 e L250, respectivamente) foi obtida a partir de contagem de pelo menos 1000 tricomas em câmara Sedgewick Rafter sob microscópio invertido Olympus IX70, como um método de controle da medida do crescimento dos cultivos a partir da densidade óptica (750 nm). Trinta tricomas vivos obtidos desses tratamentos (L9, L100 e L250) foram medidos em intervalos de 2 a 3 dias.

Um teste preliminar foi realizado a fim de comparar a abundância de células (células.mL⁻¹) e a densidade óptica (absorbância a 750 nm) dos cultivos. Os dois métodos apresentaram boa correlação (Correlação de Pearson, $r = 0,92$, com $p < 0,05$), por esse motivo, os dados apresentados nesse trabalho estão baseados na densidade óptica.

As taxas de crescimento dos cultivos foram calculadas diariamente (μ .dia⁻¹) segundo Andersen (2005), a fim de acompanhar as fases de crescimento de cada um deles. Ao final do experimento, uma reta foi ajustada aos dados iniciais (10 dias) das curvas de crescimento de cada uma das réplicas dos tratamentos (densidade óptica a 750 nm em escala logarítmica x tempo) (dados não apresentados), a fim de encontrar a taxa de crescimento intrínseca do tratamento (μ) dada pela inclinação da curva (a). Sendo a equação geral da reta: $y = a.x + b$. O ajuste da curva da taxa de crescimento versus l_k foi obtido segundo Jassby and Platt (1976).

Uma análise de variância do tipo *one-way* ANOVA foi utilizada para verificar diferenças entre as médias de crescimento da cepa quando cultivada sob diferentes intensidades luminosas, bem como entre o comprimento dos tricomas cultivados sob intensidades luminosas consideradas baixa, intermediária e alta.

3 RESULTADOS

De maneira geral, o crescimento da cepa de *C. raciborskii* (CYL04) foi intenso e aumentou de forma relativamente homogênea em todas as intensidades luminosas acima de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (L50) a partir do segundo dia de cultivo at\u00e9, pelo menos, o d\u00e9cimo primeiro dia (Figura 17).

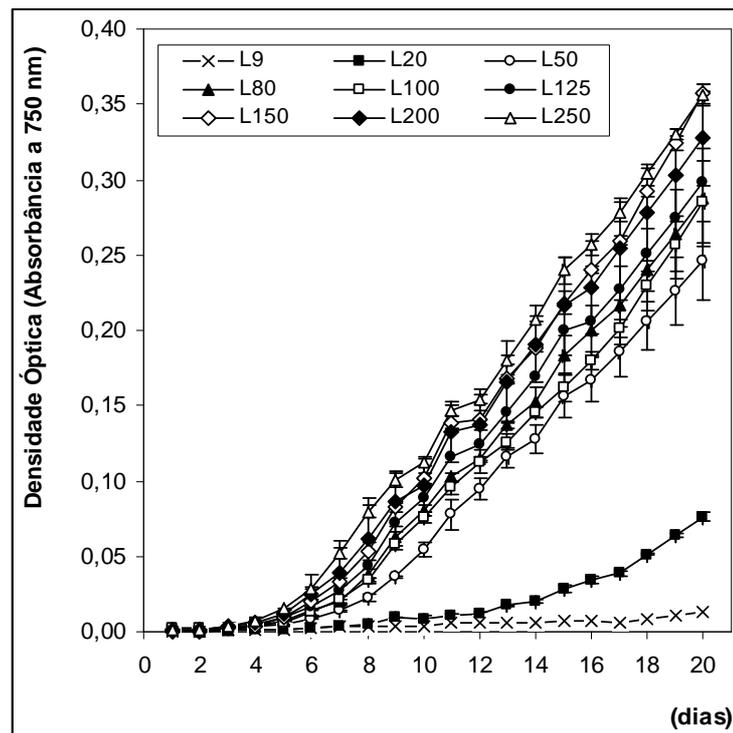


FIGURA 17 – CRESCIMENTO DOS CULTIVOS DE *C. raciborskii* MANTIDOS EM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS COM BASE NA DENSIDADE ÓPTICA (ABSORBÂNCIA A 750 nm). A média do crescimento das réplicas foi utilizada (n = 3). As barras de erros correspondem ao desvio padrão.

Os cultivos submetidos às intensidades luminosas de 9 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (L9) e 20 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (L20) apresentaram crescimento significativamente menor que os outros tratamentos ($F = 5.71$, $p < 0,001$) (Figura 17). O tratamento L9 chegou a densidade óptica máxima de 0,013 e o L20 a 0,080, sendo que ambos não chegaram a entrar em fase log de crescimento.

As culturas submetidas à intensidades luminosas maiores que 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (L50) chegaram a densidades ópticas máximas entre 0,250 (L50) e 0,350 (L250), no mínimo 20 vezes maior que a densidade óptica máxima do tratamento L9. Esses cultivos entraram em fase log de crescimento a partir do terceiro dia de experimento. Apenas a L50 (50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e L100 (100 μmol

fótons.m⁻².s⁻¹) começaram no quarto dia. O início da fase de maior crescimento na cultura submetida a 125 μmol fótons.m⁻².s⁻¹ iniciou já no segundo dia de cultivo. Em todas as culturas a partir da L50 essa fase durou entre 8 e 10 dias. Após esse período o crescimento dos cultivos diminuiu e começou a estabilizar.

A taxa de crescimento (μ) dos cultivos submetidos à intensidades luminosas baixas, L9 (9 fótons.m⁻².s⁻¹) e L20 (20 μmol fótons.m⁻².s⁻¹), foram 0,14 ± 0,01 e 0,24 ± 0,01 dia⁻¹, respectivamente (Figura 18). Os cultivos submetidos a intensidades luminosas mais altas, acima de 50 μmol fótons.m⁻².s⁻¹ (\geq L50), apresentaram maiores taxas de crescimento (μ), entre 0,26 e 0,30 dia⁻¹ (Figura 18).

O valor de I_k para a cepa CYL04 ficou próximo a 19 μmol fótons.m⁻².s⁻¹ (Figura 18) e o α foi igual a 0,0361.

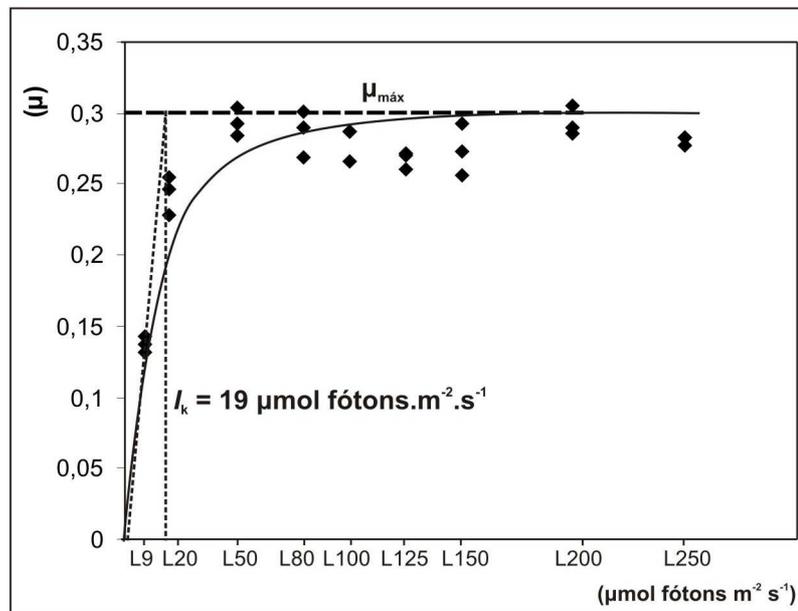


FIGURA 18 – TAXA DE CRESCIMENTO (μ .dia⁻¹) DE *C. raciborskii* QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS, COM A INDICAÇÃO DO I_k CALCULADO PARA A CEPA CYL04

A análise de variância do tipo *one-way* ANOVA verificou que houve diferença significativa entre as médias de crescimento da cepa (variável dependente = absorvância a 750 nm) cultivada sob diferentes intensidades luminosas (fator = luz em μmol fótons.m⁻².s⁻¹) ($F = 5.71$, $p = 0,02$). A comparação múltipla entre as médias a partir do teste de Tukey HSD revelou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a intensidade luminosa L9 e intensidades superiores a L80 (L80 a L250) e entre a intensidade luminosa L20 e intensidades superiores a L125 (L125 a L250).

Não houve diferença significativa entre as médias de crescimento dos cultivos acima de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\geq \text{L50}$).

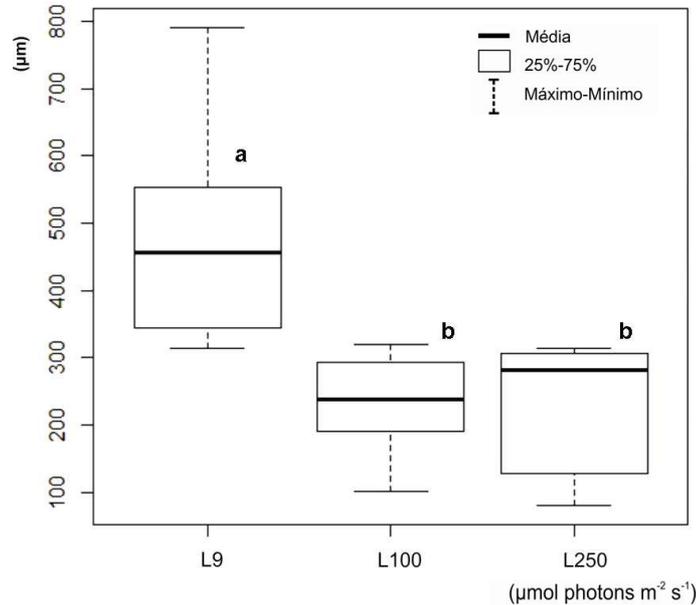


FIGURA 19 – COMPARAÇÃO ENTRE O TAMANHO MÉDIO (μm) DOS TRICOMAS DE *C. raciborskii* QUANDO SUBMETIDA À INTENSIDADE LUMINOSA BAIXA (L9 = 9 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), MÉDIA (L100 = 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) E ALTA (L250 = 250 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As letras indicam diferença estatística entre tratamentos ($p < 0,05$).

No tratamento L9 (cultivo submetido a 9 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) o comprimento médio dos tricomas (μm) foi significativamente maior que nos outros tratamentos acompanhados ($F = 13.103$, $p < 0,001$). Na figura 19 são apresentados os dados de tamanho médio desses tricomas, medidos em intervalos de 2 a 3 dias ao longo de todo o experimento, em comparação com o tamanho médio dos tricomas nos tratamentos L100 e L250, submetidos a maiores intensidades luminosas, 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 250 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. No tratamento submetido a menor intensidade luminosa (9 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) o comprimento dos tricomas variou de 313 a 790 μm enquanto nos tratamentos submetidos a 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 250 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ o comprimento dos tricomas variou de 80 a 320 μm .

4 DISCUSSÃO

Os cultivos da cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados submetidos a intensidades luminosas menores que 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (9 e 20 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

$^2 \cdot s^{-1}$) apresentaram baixa taxa de crescimento durante o período estudado, menores que 0,25. Mesmo sob essas intensidades luminosas consideradas muito baixas para outras espécies (REYNOLDS *et al.*, 2002; UNESCO, 2009), *C. raciborskii* é capaz de manter um crescimento estável, mesmo que lento. O parâmetro mais confiável para avaliar e comparar a exigência de luz é o I_k (BRIAND *et al.*, 2004). Esse parâmetro, que é a intensidade de luz que se aproxima da saturação do crescimento da espécie, foi calculado em $19 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\alpha = 0,0361$) para a cepa de *C. raciborskii* CYL04. Um valor muito baixo quando comparado a outras cianobact\u00e9rias. O valor de I_k calculado para *Microcystis* Lemmermann, por exemplo, \u00e9 superior a $200 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (UNESCO, 2009). Esse valor de I_k baixo \u00e9 t\u00edpico de cianobact\u00e9rias formadoras de flora\u00e7\u00f5es e adaptadas a pequenas intensidades luminosas como, al\u00e9m de *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis e Kom\u00e1rek, *Planktothrix rubescens* (De Candolle ex Gomont) Anagnostidis e Kom\u00e1rek e *Limnothrix redekei* (van Goor) M.E.Meffert (PADIS\u00c1K; REYNOLDS, 1998; BONILLA *et al.*, 2012). Por poss\u00faem esse atributo fisiol\u00f3gico em comum, Reynolds *et al.* (2002) incluiu essas cianobact\u00e9rias nos grupos funcionais **S** e **R** (esp\u00e9cies tolerantes a baixas intensidades luminosas). Esse valor de I_k \u00e9 semelhante ao observado por outros autores (SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004; DYBLE; TESTER; LITAKER, 2006) para outras cepas de *C. raciborskii*. De maneira geral, os valores relatados na literatura v\u00e3o de 15 a $26 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (PADIS\u00c1K; REYNOLDS, 1998; SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004; BONILLA *et al.*, 2012). Bonilla *et al.* (2012) encontraram I_k ainda menor do que o observado durante esse estudo ($8 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A caracter\u00edstica de toler\u00e2ncia a baixa intensidade luminosa \u00e9 encontrada tanto em cepas de *C. raciborskii* isoladas da regi\u00e3o tropical como temperada (BRIAND *et al.*, 2004).

Essa caracter\u00edstica permite que *C. raciborskii* continue a crescer mesmo quando a biomassa e a atenua\u00e7\u00e3o vertical da luz tornam-se extremamente altas (HAVENS *et al.*, 2003). No Brasil, essa cianobact\u00e9ria j\u00e1 foi encontrada em lagos rasos e eutr\u00f3ficos, sob intensidade luminosa pr\u00f3xima a $15 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (BOUVY *et al.*, 1999; 2000). A sua alta toler\u00e2ncia ao sombreamento (PADIS\u00c1K; REYNOLDS, 1998, ISV\u00c1NOVICS *et al.*, 2000; BRIAND *et al.*, 2002) pode estar relacionada ao sucesso nesses ambientes, que s\u00e3o mais t\u00fbrbidos que os oligotr\u00f3ficos. Por esses e outros motivos, Padis\u00e1k e Reynolds (1998) removeram *C. raciborskii* da assembl\u00e9ia que agrupa as cianobact\u00e9rias fixadoras de N_2 (**H**) e

propuseram uma assembléia específica (**Sn**), baseada na sua tolerância ao sombreamento. De maneira geral, as intensidades luminosas que chegam às profundidades onde *C. raciborskii* é abundante permanecem entre $15 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $200 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (HAVENS *et al.*, 1998; BOUVY *et al.*, 1999).

A diminuição da intensidade luminosa incidente é relevante no inverno da região subtropical do Brasil, onde está situado o reservatório de Alagados. Isto porque ela chega a quase a metade da intensidade luminosa incidente no verão (ver Figura 8). Portanto, a sazonalidade pronunciada da luz pode ser um dos fatores controladores da floração de *C. raciborskii* no reservatório de Alagados. Apesar da alta tolerância ao sombreamento exibida pela cepa isolada desse reservatório, intensidades luminosas inferiores a $20 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ desfavoreceriam o crescimento de *C. raciborskii* em relação à espécies mais tolerantes a essas condições. Por exemplo, *Mougeotia* sp. que é uma espécie perifítica e portanto tolerante a ambientes sombreados (REYNOLDS *et al.*, 2002). Essa clorófito praticamente substituiu *C. raciborskii* no reservatório de Alagados no final do outono (SANEPAR, relatórios internos). As menores densidades de *C. raciborskii* ocorrem no reservatório a partir do mês de julho (SANEPAR, relatórios internos), quando a intensidade luminosa chega à metade daquela incidente durante o verão (Figura 8), enquanto a concentração de nutrientes não difere tanto entre as estações (por exemplo, o Fósforo, Figura 5). A inibição do crescimento devido a redução sazonal de disponibilidade de luz na área de estudo, também pode ser intensificada devido ao menor fotoperíodo prevalente durante o inverno, de aproximadamente 10 a 11 horas de duração. Em comparação, no verão o período diário de insolação é de aproximadamente 13 a 14 horas (FERNANDES *et al.*, 2011). Evidentemente, outros fatores controladores têm importante papel no controle das florações, como a temperatura, por exemplo. Esse parâmetro foi demonstrado como efetivo regulador do crescimento de *C. raciborskii*, tanto para cepas fisiologicamente adaptadas a ambientes tropicais como temperados (BRIAND *et al.*, 2004).

Todavia, durante esse estudo a cepa CYL04 do reservatório de Alagados foi submetida a intensidades luminosas que chegaram a $250 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sem apresentar sinal de fotoinibição. Algumas cepas são capazes de tolerar intensidades luminosas acima de $500 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (BRIAND *et al.*, 2004). Em campo, a espécie parece tolerar intensidades luminosas mais altas do que as observadas em laboratório. Na Austrália tropical, valores muito elevados de luminosidade (até 2500

$\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) incidem na superf\i{cie da \u00e1gua do rio Fitzroy durante flora\c7\~{o}es de *C. raciborskii* (FABBRO; DUIVENVOORDEN, 1996). *Cylindrospermopsis raciborskii* prolifera em \u00e1guas austr\iacas com valores de intensidade luminosa incidente de 200 a 600 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (DOKULIL; MAYER, 1996). A partir dessas observa\c7\~{o}es fica claro que, al\েম de ser uma esp\ecie tolerante ao sombreamento (PADIS\u00c1K; REYNOLDS, 1998), *Cylindrospermopsis raciborskii* possui ampla toler\u00e2ncia fisiol\u00f3gica com rela\c7\~{o} a luz. Essa caracter\u00edstica \u00e9 uma das hip\u00f3teses formuladas para explicar a recente prolifera\c7\~{o} da esp\ecie para novos habitats em regi\u00f5es temperadas (BRIAND *et al.*, 2004; PICCINI *et al.*, 2011). O crescimento da cepa CYL04 foi acompanhado durante 50 dias (observa\c7\~{o} n\u00e3o publicada), tanto em intensidades de luz altas quanto baixas, e em nenhum momento ao longo do crescimento houve fotoinibi\c7\~{o}.

No entanto, Saker *et al.* (1999) observaram culturas clor\u00f3ticas com crescimento reduzido quando submetidas a intensidades luminosas acima de 118 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Durante o mesmo estudo, a ilumina\c7\~{o} cont\i{nua a 165 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ ou acima disso inibiu completamente o crescimento de uma cepa de *C. raciborskii* australiana (SAKER *et al.*, 1999). Esses dados refor\c7\~{a}m ainda mais as diferen\c7\~{a}s fisiol\u00f3gicas existentes entre cepas e justificam estudos regionais para determinar especificidades das popula\c7\~{o}es quanto aos requerimentos ambientais ideais para seu crescimento celular.

Diferente do observado por outros autores (por exemplo, SAKER *et al.*, 1999; SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2009), nossos resultados sugerem que n\u00e3o h\u00e1 uma intensidade luminosa \u00f3tima para o crescimento da cepa de *C. raciborskii* do reservat\u00f3rio de Alagados. A intensidade luminosa reportada na literatura como \u00f3tima para o crescimento da esp\ecie parece variar dependendo da cepa testada. O \u00f3timo de crescimento de uma cepa h\u00fangara ocorre sob intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (SHAFIK *et al.*, 2001). No experimento de Saker *et al.* (1999) a taxa de crescimento m\u00e1xima ocorreu sob luminosidade de 118 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. J\u00e1 a cepa CYL04, quando submetida a intensidades luminosas maiores ou iguais a 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ apresenta taxa de crescimento homog\eanea entre 0,26 e 0,30. Essa caracter\u00edstica indica que essa seria a taxa de crescimento m\u00e1xima da cepa sob as condi\c7\~{o}es estudadas (concentra\c7\~{o} padr\u00e3o de f\u00f3sforo do meio ASM-1, 0,02 mg.L^{-1} , fotoper\u00edodo 12h:12h e 20\u00b0C), que \u00e9 similar a de outras cepas brasileiras. Carneiro *et al.* (2009) encontraram taxas de

crescimento entre 0,13 e 0,30 dia⁻¹ para cepas brasileiras de *C. raciborskii*, sob intensidades luminosas entre 50 e 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a 24°C. Entretanto, a taxa de crescimento dessa cepa sob 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi significativamente menor quando comparada a intensidades luminosas de 100 e 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A taxa de crescimento dessas cepas subtropicais \u00e9 menor quando comparada a de cepas isoladas de diferentes regi\u00f5es do globo. Briand *et al.* (2004) encontraram taxa de crescimento de 0,7 dia⁻¹, a 25°C, em intensidades luminosas semelhantes para cepas de *C. raciborskii* isoladas de ecossistemas aqu\u00e1ticos da Austr\u00e1lia (150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), Fran\u00e7a, Hungria (100 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e Senegal (200 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para uma cepa brasileira, esse mesmo autor encontrou taxa de crescimento de 0,8 dia⁻¹ a 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Essa diferen\u00e7a poderia estar relacionada tamb\u00e9m ao fotoper\u00edodo (16h:8h) utilizado durante os experimentos, com fase clara maior que a do presente estudo (12h:12h). Entretanto, Saker e Neilan (2001) utilizaram o mesmo fotoper\u00edodo do presente estudo e, mesmo assim, encontraram taxa de crescimento maior (0,6 dia⁻¹) tanto para uma cepa australiana (a 25°C e 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) quanto para uma cepa uruguaia (a 25°C e 135 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Acredita-se que essa diferen\u00e7a entre cepas pode ser uma evid\u00eancia da exist\u00eancia de ec\u00f3tipos de *C. raciborskii* com diferentes toler\u00e2ncias a condi\u00e7\u00f5es ambientais, sugerida por Piccini *et al.* (2011). A exist\u00eancia desses ec\u00f3tipos est\u00e1 entre as hip\u00f3teses formuladas para explicar a expans\u00e3o de *C. raciborskii* para latitudes m\u00e9dias (PICCINI *et al.*, 2011), refor\u00e7ando o comportamento invasor da esp\u00e9cie e seu sucesso em diferentes condi\u00e7\u00f5es clim\u00e1ticas (BONILLA *et al.*, 2012). Essa grande variabilidade fisiol\u00f3gica demonstra a alta capacidade de *C. raciborskii* de se adaptar a diferentes condi\u00e7\u00f5es ambientais.

A variabilidade morfol\u00f3gica tamb\u00e9m \u00e9 muito comum entre as cianobact\u00e9rias, especialmente em *C. raciborskii* (MCGREGOR; FABBRO, 2000). Durante os experimentos realizados nesse estudo os tricomas de *C. raciborskii* responderam morfol\u00f3gicamente \u00e0s intensidades luminosas a que foram submetidos com aumento significativo no comprimento dos tricomas submetidos a intensidades luminosas baixas (9 e 20 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Ao contr\u00e1rio do encontrado nesse estudo, Bonilla *et al.* (2012) observaram aumento no comprimento m\u00e1ximo e no volume individual dos tricomas submetidos a intensidades luminosas maiores. J\u00e1 em campo, esses

mesmos autores não encontraram relação entre o biovolume de *C. raciborskii* e a disponibilidade de luz no ambiente (Zeu/Zmix).

Essa plasticidade morfofisiológica exibida por *C. raciborskii* e sua tolerância à ampla faixa de condições ambientais, como intensidades luminosas, pode explicar sua expansão para diferentes condições ambientais, assim como adiantar o aumento gradual de sua dominância nesses ambientes.

Nossos resultados suportam a hipótese sugerida por Briand *et al.* (2004) de que *C. raciborskii* é uma espécie tolerante a ampla faixa de condições ambientais, podendo dominar tanto em ambientes tropicais como temperados. O crescimento da cepa pode ser mantido em condições de baixa intensidade luminosa, favorecendo-a em detrimento de outras espécies do fitoplâncton. Nossos resultados sugerem também a adaptação da espécie a uma ampla faixa de intensidade luminosa.

5 CONCLUSÕES

Os dados elucidam o comportamento ecofisiológico da cepa de *C. raciborskii* CYL04 do reservatório de Alagados em diferentes intensidades luminosas, importante para compreender o sucesso da espécie nesse ambiente.

O crescimento de *C. raciborskii* no reservatório de Alagados pode ser regulado, entre outros parâmetros, pela redução da intensidade luminosa incidente no ambiente no fim do outono, sendo que o crescimento da cepa é sub-saturado em intensidades luminosas menores que $20 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A cepa responde morfológicamente às condições ambientais às quais é submetida, demonstrando a grande plasticidade morfofisiológica e capacidade de adaptação de *C. raciborskii*. Estudos ecofisiológicos com diferentes cepas de *C. raciborskii* são de extrema importância para elucidar os efeitos dos fatores ambientais no crescimento e sucesso da espécie em locais diferentes da sua origem.

6 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, R. A.. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press: Oxford, UK, 2005.
- BONILLA, S.; AUBRIOT, L.; SOARES, M. C. S.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; FABRE, A.; HUSZAR, V. L. M.; LÜRLING, M.; ANTONIADES, D.; PADISÁK, J.; KRUK, C.. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 79, p. 594-607, 2012.
- BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A.. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 15, 2000, p. 122-164. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/ame/23/a023p013.pdf>> Acesso em: Out. 2010.
- BOUVY, M.; MOLICA, R.; DE OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B.. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast, Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 20, p. 285-297, 1999.
- BOUVY, M.; NASCIMENTO, S. M.; MOLICA, R. J. R.; FERREIRA, A.; HUSZAR, V.; AZEVEDO, S. M. F. O.. Limnological features in Tapacurá reservoir (northeastern Brazil) during a severe drought. **Hydrobiologia**, vol. 493, p. 115-130, 2003.
- BRIAND, J. F.; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBERAS, C.; HUMBERT, J.F.; COUTÉ, A.; BERNARD, C.. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, vol. 36, p. 3183-92, 2002.
- BRIAND, J. F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, vol. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.
- CARNEIRO, R. L.; SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M. F. O.. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, vol. 31, n. 5, p. 481-488, 2009.
- CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VÁSQUEZ, M.. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, vol. 44, p. 483-489, 2004.
- DOKULIL, M. T.; MAYER, J.. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna. **Algological Studies**, vol. 83, p. 179-95, 1996.

- DYBLE, J.; TESTER, P. A.; LITAKER, R. W.. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. **African Journal of Marine Science**, vol. 28, p. 309-312, 2006.
- FABBRO, L. D.; DUIVENVOORDEN, L. J.. Profile of a bloom of the cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical central Queensland. **Marine Freshwater Research**, v. 47, n. 5, p. 685-694, 1996.
- HAVENS, K. E.; PHILIPS, E. J.; CICHRA, M. F.; LI, B. L.. Light availability as a possible regulator of cyanobacterial species composition in a shallow subtropical lake. **Freshwater Biology**, vol. 39, p. 547-556, 1998.
- HAVENS, K. E.; JAMES, R. T.; EAST, T. L.; SMITH, V. H.. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. **Environmental Pollution**, vol. 122, p. 379-390, 2003.
- ISVÁNOVICS, V.; SHAFIK, H. M.; PRÉSING, M.; JUHOS, S.. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. **Freshwater Biology**, vol. 43, p. 257-275, 2000.
- JASSBY, A. D.; PLATT, T.. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. **Limnol. Oceanogr.**, vol. 21, p. 540-547, 1976.
- LEWIS, W. M. Jr.. Evaluation of heat distribution in a South Carolina reservoir receiving heated water. In: GIBBONS, J. W.; SHARITZ, R. R. (eds.) **Thermal Ecology**, D.C., p. 1-27, 1974.
- LEWIS, W. M. Jr.. A compositional, phytogeographical and elementary structural analysis of the phytoplankton in a tropical lake: lake Lanao, Philippines. **Journal of Ecology**, 66: 213-226. 1978,
- MCGREGOR, G. B.; FABBRO, L. D.. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, vol. 5, p. 195-205, 2000.
- PADISÁK, J.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, and expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives Hydrobiology**, vol. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.
- PADISÁK, J.; REYNOLDS, C. S.. Selection of phytoplankton associations in lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokariotes. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 384, p. 41-53, 1998.
- PICCINI, C.; AUBRIOT, L.; FABRE, A.; AMARAL, V.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; GIANNI, A.; FIGUEREDO, C. C.; VIDAL, L.; KRUK, C.; BONILLA, S.. Genetic

and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, vol. 10, p. 644-653, 2011.

REYNOLDS, C. S.; HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S.. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of plankton research**, vol. 24, n. 5, p. 417-428, 2002.

SAKER, M. L.; THOMAS, A. D.; NORTON, J. H.. Cattle mortality attributed to the toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of the North Queensland. **Environmental Toxicology**, vol. 14, n. 1, p. 179-182, 1999.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J.. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, vol. 39, n. 4, p. 349-354, 2000.

SAKER, M. L.; NEILAN, B. A.. Varied Diazotrophies, Morphologies and Toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 67, n. 4, p. 1839-1845, 2001.

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

SHAFIK, H. M.; HERODEK, M.; PRESSING, M.; VÖRÖS, L.. Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju. Archiv fur Hydrobiologia supplement 140, **Algological Studies**, vol. 103, p. 75-94, 2001.

UNESCO. **Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión**. BONILLA, S. (ed.). Documento Técnico PHILAC, N° 16, 2009.

VENRICK, E. L.. How many cells to count? In: SOURNIA, A. (Ed.) **Phytoplankton manual**. Paris: Unesco, p. 167-180, 1978.

WETZEL, R. G.. **Limnology** - Lake and river ecosystems. 3 ed. Academic Press, San Diego, 2001.

CAPÍTULO 3

**EFEITOS DA TEMPERATURA, INTENSIDADE LUMINOSA E
CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO REATIVO NO CRESCIMENTO DA
CIANOBACTÉRIA *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska)
Seenayya et Subba Raju DO SUL DO BRASIL**

1 INTRODUÇÃO

As florações de cianobactérias nocivas estão se tornando cada vez mais frequentes em distintos corpos de água doce localizados em diferentes latitudes. Entre as cianobactérias que mais causam problemas em reservatórios destinados ao abastecimento público está *Cylindrospermopsis raciborskii* Seenayya et Subba Raju (BRIAND *et al.*, 2004). A espécie se destaca pela recente expansão e elevada dominância na comunidade fitoplanctônica por todo o mundo, que preocupa as autoridades sanitárias envolvidas com o abastecimento público de água potável. Algumas hipóteses tentam explicar esse aumento gradual da ocorrência de *C. raciborskii*, como alterações climáticas globais e presença de ecótipos com elevada plasticidade fisiológica (BRIAND *et al.*, 2004; PICCINI *et al.*, 2011). Estudos ecofisiológicos têm sido desenvolvidos visando elucidar os mecanismos fisiológicos de *C. raciborskii* influenciados por reguladores do crescimento como temperatura (CASTRO *et al.*, 2004; CHONUDOMKUL *et al.*, 2004), nutrientes (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000; AUBRIOT; BONILLA, 2012) e intensidade luminosa (CARNEIRO *et al.*, 2009; BRIAND *et al.*, 2004). Esses estudos, de maneira geral, têm por objetivo avaliar os efeitos de fatores isolados no crescimento de *C. raciborskii*. Por outro lado, a interação entre esses fatores ainda não foi estudada. Em campo, essas correlações podem ser difíceis de interpretar devido à interação de outros fatores físico-químicos e biológicos que ocorrem no ambiente (POSSELT; BURFORD; SHAW, 2009). Dessa forma, estudos laboratoriais são de extrema importância para determinar os efeitos desses fatores na promoção das florações de cianobactérias. Além disso, sabe-se que *C. raciborskii* apresenta cepas que respondem de modo específico às variáveis ambientais (BRIAND *et al.*, 2004). Como resultado, investigações sobre a ecologia dessa espécie em nível local são necessárias, de modo a permitir o completo entendimento de seu comportamento invasivo e a expansão geográfica recentemente observada.

As diferentes regiões geográficas do globo diferem em seus padrões de temperatura, disponibilidade de luz (LEWIS, 2000; MEHNERT *et al.*, 2010) e concentração de nutrientes (LEWIS, 2000). A temperatura da água é mais alta nos trópicos, onde há também uma menor variabilidade na intensidade da radiação solar e alta trofia dos ecossistemas aquáticos de água doce. Por outro lado, em lagos temperados há uma maior sazonalidade das condições ambientais e a

disponibilidade de nutrientes é um importante fator limitante do crescimento do fitoplâncton (LEWIS, 2000; WHITTON; POTTS, 2002). *Cylindrospermopsis raciborskii* foi descrita como um microrganismo tropical (PADISÁK, 1997), porém, atualmente, ocorre nas três regiões do globo (temperada, subtropical e tropical), sem diferença significativa em sua contribuição para o biovolume total entre a região tropical e temperada (BONILLA *et al.*, 2012).

A concentração de nutrientes tem papel fundamental sobre a produtividade primária do fitoplâncton. Entre os nutrientes mais importantes está o fósforo (P), um elemento essencial para o funcionamento dos organismos (SCHINDLER, 1977). Essa importância se deve à sua participação em diversos mecanismos vitais, como na síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana e na transferência de energia através dos nucleotídeos tri e bi-fosforilados, ATP e ADP, respectivamente (RIGLER, 1956; ESTEVES, 1998; FERNANDES *et al.*, 2005a). O fósforo das águas doces encontra-se na forma de fosfato (SRP) e, embora seja requerido em baixas concentrações, é igualmente essencial para os organismos (ESTEVES, 1998). A concentração de P pode variar amplamente nos ambientes aquáticos em função de alguns fatores, como a precipitação local e a magnitude do escoamento superficial desse elemento para o reservatório, da sua adsorção em partículas na coluna de água com conseqüente sedimentação, o próprio consumo pelo fitoplâncton no ambiente, entre outros (ESTEVES, 1998). Esse nutriente, geralmente, é o principal limitante da produtividade primária em águas continentais, pois se encontra sempre abaixo das concentrações necessárias para o crescimento rápido e sustentável da comunidade fitoplanctônica (SCHINDLER, 1977; TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Os organismos têm evoluído mecanismos ou adaptações para lidar com essas concentrações variáveis de P no ambiente (DYHRMAN *et al.*, 2007). No entanto, em muitas cianobactérias de água doce os mecanismos adaptativos adquiridos para lidar com as concentrações variáveis de P no ambiente têm recebido pouca atenção, sendo que os mecanismos através dos quais *C. raciborskii* responde a diferentes níveis desse elemento não são ainda bem estabelecidos (WU *et al.*, 2012). Por outro lado, esse nutriente parece desempenhar um fator chave na dominância de *C. raciborskii* (PADISÁK, 1997; ISVÁNOVICS *et al.*, 2000; POSSELT; BURFORD; SHAW, 2009; BURFORD; DAVIS, 2011). Além disso, características desse organismo como a alta afinidade e capacidade de estocar P, quando

comparado a outras cianobactérias (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000; SHAFIK *et al.*, 2001), desempenha importante papel no desenvolvimento das florações (PADISÁK, 1997).

A plasticidade fenotípica exibida por *C. raciborskii* é outra característica que confere uma vantagem adaptativa à espécie frente às variações ambientais. Ecótipos de *C. raciborskii* exibem diferentes faixas de tolerância às condições ambientais (PICCINI *et al.*, 2011), o que pode facilitar sua expansão para regiões com condições ambientais diversas (BONILLA *et al.*, 2012). Nesse sentido, compreender os efeitos de fatores ambientais chave, como temperatura, intensidade luminosa e concentração de fósforo reativo, no crescimento de algumas espécies de cianobactérias em diferentes ambientes é fundamental para prever futuras mudanças no comportamento das florações frente às mudanças climáticas globais. Apesar de causar diversos problemas na região, não existem estudos desse tipo com cepas de *C. raciborskii* isoladas do Sul do Brasil. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos dos fatores reguladores temperatura, luz e fósforo reativo sobre o crescimento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* do reservatório de Alagados, Ponta Grossa, Paraná. Os resultados foram comparados com cepas de outras latitudes e, além disso, os fatores mais relevantes para o crescimento da cepa, bem como seus possíveis papéis na promoção das florações no reservatório de Alagados, foram discutidos.

2 MATERIAL E MÉTODO

Previamente ao início dos experimentos toda a vidraria a ser utilizada permaneceu em HCl 10% durante 24 horas, depois foi enxaguada e rinsada com água destilada antes da autoclavagem para prevenir qualquer contaminação por fósforo (ANDERSEN, 2005).

A cepa de *C. raciborskii* (CYL04) foi mantida em meio ASM-1 livre de fósforo durante 20 dias (até atingir a fase estacionária de crescimento) antes do início dos experimentos com o objetivo de diminuir a influência da reserva interna desse elemento durante a fase experimental. Além disso, a cepa foi repicada e permaneceu sob as condições de temperatura e luminosidade utilizadas no experimento durante 15 dias. As condições de cultivo (Tabela 7) foram estabelecidas de acordo com as condições do ambiente do qual a cepa foi isolada e literatura

específica. As temperaturas utilizadas foram a temperatura média da água da zona fótica do reservatório durante o inverno (16°C) e a média anual (20°C) segundo dados históricos do IAP (2009), a temperatura ótima de crescimento segundo literatura específica (25°C) (SAKER; GRIFFITHS, 2000; BRIAND *et al.*, 2004) e a temperatura máxima da água da zona fótica do reservatório durante o verão (27°C) (IAP, 2009). Para determinar a intensidade luminosa de inverno e verão a serem utilizadas nos experimentos foram analisados dados do SIMEPAR para a região. Diferentes concentrações de fósforo foram selecionadas com base nos dados do monitoramento do reservatório de Alagados realizado pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP, 2004; IAP, 2009). A média anual da concentração de fósforo reativo no reservatório de Alagados é de 0,02 mg.L⁻¹. Os valores utilizados no experimento foram 0,02 mg.L⁻¹, 0,02 x 2 (0,04 mg.L⁻¹) e 0,02 x 4 (0,08 mg.L⁻¹). Um controle sem adição de fósforo (0,00 mg.L⁻¹ = P0) foi utilizado como uma forma de mensurar o crescimento da cepa a partir do armazenamento interno desse elemento. Outro controle com fósforo, porém sem cianobactérias, permitiu o monitoramento do possível consumo de fósforo por outras bactérias ou contaminantes. A cada tratamento foi atribuído um código com base na condição a qual cada um foi submetido, conforme tabela 7.

O inóculo utilizado para iniciar o experimento foi de 5 x 10⁶ tricomas.mL⁻¹ de *C. raciborskii* colhido das culturas adaptadas às condições experimentais em fase exponencial de crescimento (fase log). Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata.

Amostras foram tomadas sob condições estéreis a cada 2 a 3 dias de cada tratamento a fim de determinar a densidade óptica (absorbância a 750 nm) como forma de mensurar o crescimento do cultivo. Uma curva de crescimento padrão foi construída para cada tratamento. Os frascos Erlenmeyers contendo os cultivos em condições experimentais foram agitados manualmente uma vez por dia. Para diminuir os efeitos de diferenças de intensidade luminosa e/ou temperatura incidentes em cada um dos tratamentos, os frascos foram aleatorizados diariamente.

Uma análise de variância do tipo ANOVA tri-fatorial foi realizada a fim de verificar diferenças entre as médias de crescimento da cepa quando submetida a diferentes condições experimentais. O experimento durou 45 dias e foi encerrado quando a taxa de crescimento (μ .dia⁻¹) dos cultivos permaneceu estável por pelo menos 5 dias. A taxa de crescimento intrínseco da cepa sob cada uma das

condições experimentais foi calculada para os primeiros 10 dias de cultivo, a fim de evitar os efeitos de escassez de nutrientes e do auto-sombreamento, a partir do ajuste de uma reta aos dados das curvas de crescimento de cada uma das réplicas dos tratamentos (densidade óptica em escala logarítmica x tempo) (dados não apresentados). A taxa de crescimento do tratamento (μ) é dada pela inclinação da curva (a). Sendo a equação geral da reta: $y = a.x + b$.

TABELA 7 – CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, INTENSIDADE LUMINOSA E CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO REATIVO ÀS QUAIS FORAM SUBMETIDOS OS CULTIVOS DURANTE O EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO DE *Cylindrospermopsis raciborskii* E OS CÓDIGOS REFERENTES A CADA UM DOS TRATAMENTOS.

Temperatura (°C)	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$)	Concentração de P (mg.L^{-1})	Código (réplicas)
16	40	0,00	T1L1P0 (3)
		0,02	T1L1P2 (3)
		0,04	T1L1P4 (3)
		0,08	T1L1P8 (3)
	250	0,00	T1L1P0 (3)
		0,02	T1L1P2 (3)
		0,04	T1L1P4 (3)
		0,08	T1L1P8 (3)
20	40	0,00	T1L1P0 (3)
		0,02	T1L1P2 (3)
		0,04	T1L1P4 (3)
		0,08	T1L1P8 (3)
	250	0,00	T1L1P0 (3)
		0,02	T1L1P2 (3)
		0,04	T1L1P4 (3)
		0,08	T1L1P8 (3)
25	40	0,00	T1L1P0 (3)
		0,02	T1L1P2 (3)
		0,04	T1L1P4 (3)
		0,08	T1L1P8 (3)
	250	0,00	T1L2P0 (3)
		0,02	T1L2P2 (3)
		0,04	T1L2P4 (3)
		0,08	T1L2P8 (3)
27	40	0,00	T2L1P0 (3)
		0,02	T2L1P2 (3)
		0,04	T2L1P4 (3)
		0,08	T2L1P8 (3)
	250	0,00	T2L2P0 (3)
		0,02	T2L2P2 (3)
		0,04	T2L2P4 (3)
		0,08	T2L2P8 (3)

O coeficiente de temperatura (Q_{10}) foi calculado a partir da equação:

$$Q_{10} = (R_2/R_1)^{(10/T_2-T_1)}$$

Onde:

R_1 = taxa de crescimento da cepa quando submetida a 16°C

R_2 = taxa de crescimento da cepa quando submetida a 27°C

T_1 = 16°C

T_2 = 27°C

Esse coeficiente representa o fator de aumento de uma reação a cada elevação de 10 graus na temperatura. O Q_{10} (16 - 27°C), para cada intensidade luminosa e concentração de SRP, foi calculado utilizando a taxa de crescimento média ($n = 3$) da cepa quando submetida a esses tratamentos em cada uma das temperaturas (16 - 27°C).

Amostras para a análise da concentração de fosfato reativo (mg.L^{-1}) foram coletadas da água do reservatório (filtrada em Filtro Millipore de Acetato de Celulose com abertura de malha de 2 μm) utilizada para o preparo do meio de cultivo ASM-1. Ao final do experimento novas amostras foram coletadas para a determinação da concentração final de fosfato reativo (mg.L^{-1}). Essas análises foram realizadas de acordo com "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1995) pelo laboratório de Biogeoquímica Marinha do Centro de Estudos do Mar (CEM) em Pontal do Paraná, PR.

3 RESULTADOS

A análise de variância do tipo ANOVA tri-fatorial revelou que houve diferença significativa ($F = 71.59$, $p < 0,001$) entre as médias de crescimento da cepa quando submetida a diferentes temperaturas (16, 20, 25, 27°C) (Tabela 8, Figura 20), exceto entre 20 e 25°C. Não houve crescimento intensivo a 16°C, sendo que o crescimento da cepa sob essa temperatura foi significativamente inferior quando comparado às outras temperaturas testadas. A taxa de crescimento da cepa a 27°C foi superior,

mas a densidade óptica não superou a observada sob temperaturas medianas (20 e 25°C).

TABELA 8 – RESULTADO DO TESTE DE TUKEY HSD.

Fatores que revelaram diferença significativa entre as médias de crescimento na análise ANOVA tri-fatorial, diferença entre as médias (F) e os respectivos valores de p .

FATORES	F	p
Temperatura	71.59	< 0,001
Intensidade luminosa	59.61	< 0,001
Fósforo reativo	3.62	< 0,001
Temperatura: Intensidade luminosa	9.46	< 0,001
Temperatura: Fósforo reativo	5.70	< 0,001

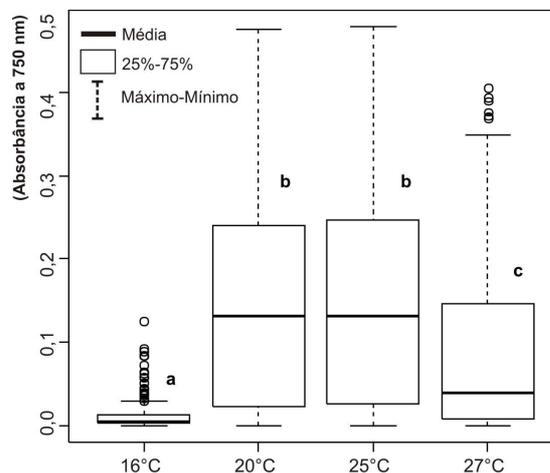


FIGURA 20 – CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

As letras **a**, **b** e **c** indicam diferença estatística entre os tratamentos.

A intensidade luminosa também teve influência no crescimento da cepa CYL04 (Tabela 8), sendo que houve diferença significativa ($F = 59.61$, $p < 0,001$) entre as médias de seu crescimento quando submetida a diferentes intensidades luminosas (40 e $250 \mu\text{mol f\acute{o}tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). O crescimento da cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados foi maior em intensidade luminosa mais alta (Figura 21).

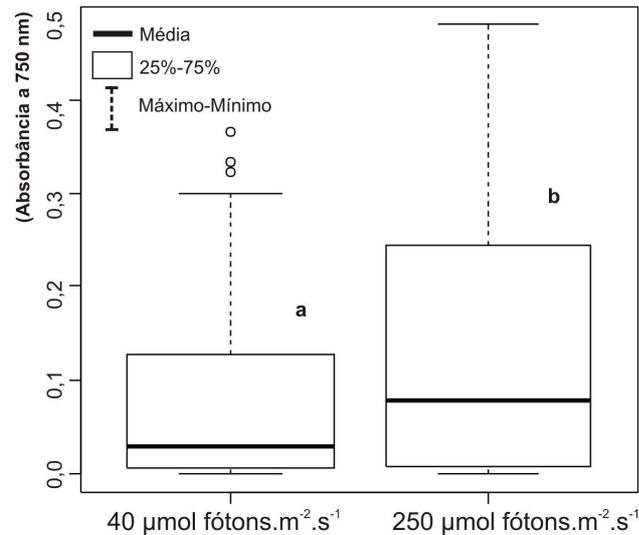


FIGURA 21 – CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS. As letras **a** e **b** ndicam diferença estatística entre os tratamentos.

Além disso, houve interação entre esses fatores (temperatura e intensidade luminosa) promovendo diferenças significativas ($F = 9.46$, $p < 0,001$) no crescimento da cepa (Tabela 8), ou seja, a influência da luz foi dependente da temperatura a qual foi submetida (Figura 22). Na temperatura de 16°C , não houve crescimento intensivo independente da intensidade luminosa a qual a cepa foi submetida. A intensidades luminosa alta ($250 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi responsável por um aumento significativo no crescimento da cepa em temperaturas medianas (20 e 25°C). A 27°C não houve diferença significativa entre as médias de crescimento da cepa entre as diferentes intensidades luminosas. Sob essa temperatura, o crescimento da cepa foi similar ao observado em temperaturas medianas e intensidade luminosa alta (Figura 22).

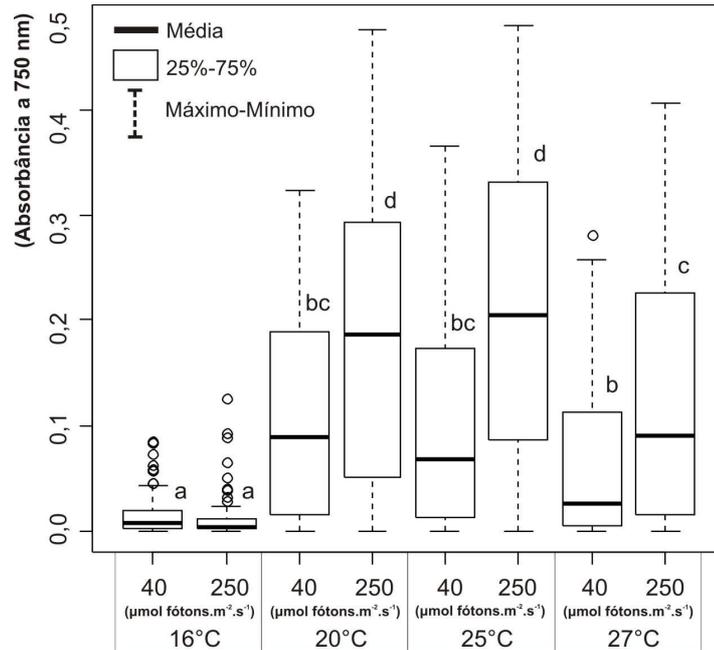


FIGURA 22 – CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E INTENSIDADES LUMINOSAS. As letras **a**, **b**, **c** e **d** indicam diferença estatística entre os tratamentos.

Também houve diferença significativa ($F = 3.62$, $p < 0,001$) entre as médias de crescimento da cepa quando submetida a diferentes concentrações de fósforo reativo (SRP) ($0,00$, $0,02$, $0,04$ e $0,08$ mg.L^{-1}) (Tabela 8, Figura 23). De maneira geral, maiores concentrações de fósforo reativo promovem um maior crescimento da cepa CYL04, sendo $0,04$ mg.L^{-1} a concentração ideal observada durante o experimento.

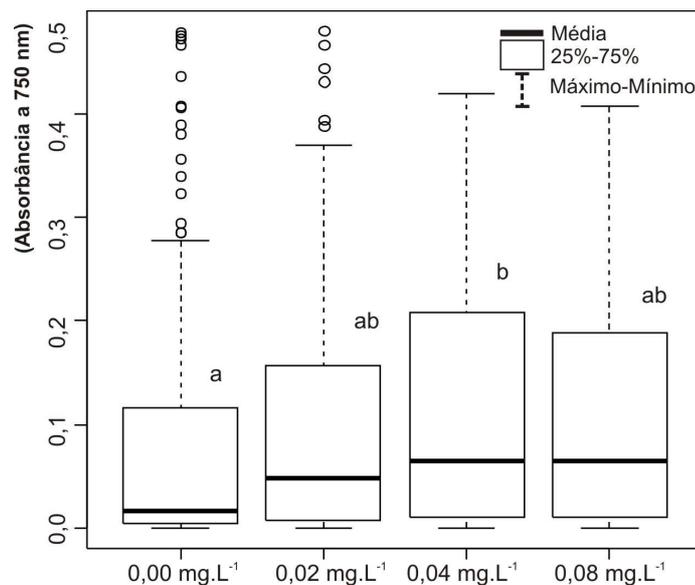


FIGURA 23 – CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO REATIVO. As letras **a** e **b** indicam diferença estatística entre os tratamentos.

Após permanecer em “starvation” por 20 dias a cepa CYL04 manteve a capacidade de crescimento, mesmo que reduzido, quando cultivada em sem adição de SRP ($0,00 \text{ mg.L}^{-1}$). Os tricomas cultivados em meio livre de SRP apresentaram citoplasma mais hialino (Figura 24 A - H) quando comparado ao dos tricomas cultivados com adição de SRP (Figura 27 I - L).

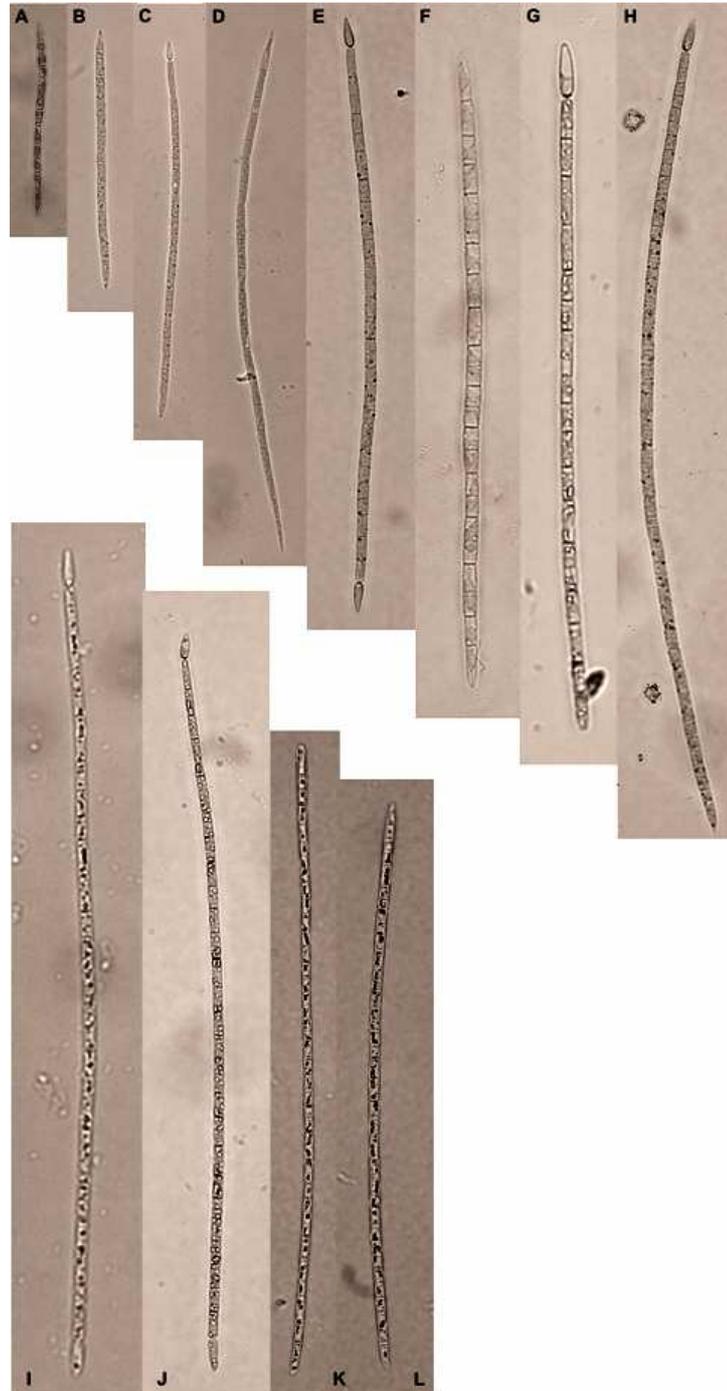


FIGURA 24 – MORFOLOGIA DOS TRICOMAS DA CEPA CYL04 CULTIVADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SRP.

(A – H) cultivados em meio livre de SRP; (I – L) com adição de SRP.

Condições de cultivo: Temperatura = 27°C ; Intensidade luminosa = $250 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Houve interação também entre os fatores temperatura e SRP (Tabela 8) promovendo diferença significativa no crescimento da cepa do reservatório de Alagados ($F = 5.70$, $p < 0,001$), sendo que a influência do SRP foi diferente entre as quatro temperaturas testadas (16, 20, 25 e 27°C) (Figura 25). Sob 20 e 25°C não houve diferença significativa no crescimento da cepa independente da concentração de SRP a qual foi submetida. Já em temperaturas extremas, 16 e 27°C, maiores concentrações de SRP levaram a um aumento significativo do crescimento da cepa.

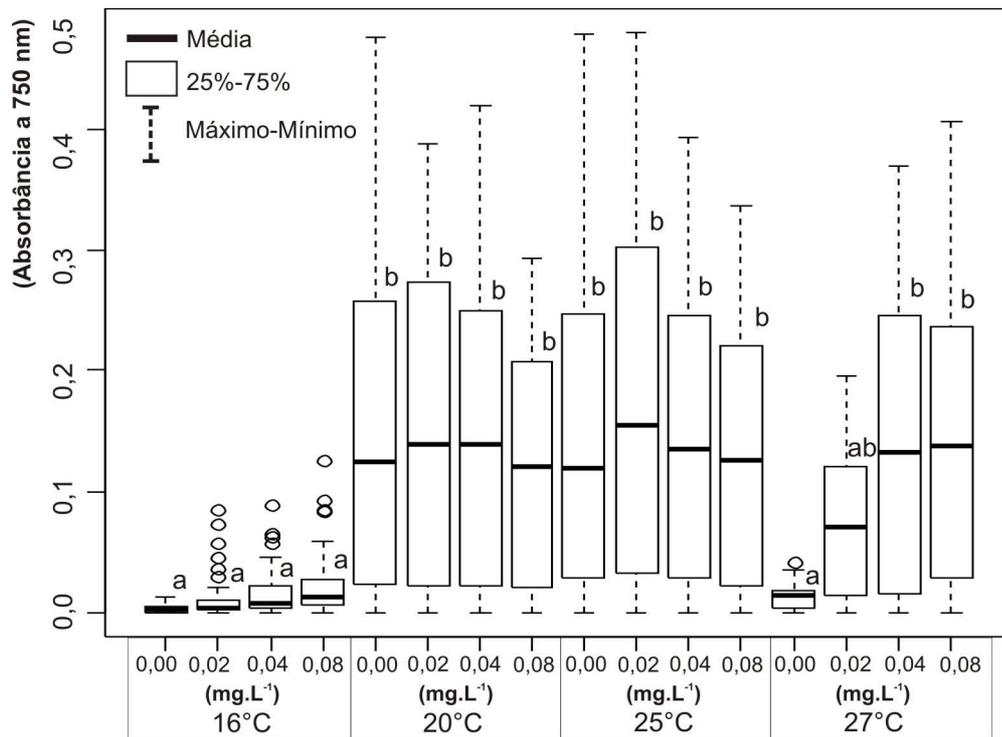


FIGURA 25 – CRESCIMENTO DA CEPA CYL04 MEDIDO A PARTIR DA DENSIDADE ÓPTICA (Absorbância a 750 nm) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO REATIVO.

As letras **a** e **b** indicam diferença estatística entre os tratamentos.

A taxa de crescimento ($\mu\text{.dia}^{-1}$) dos cultivos submetidos à temperatura de 16°C (T1) não ultrapassou $0,2 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 26, Tabela 9). Nas temperaturas de 20 e 25°C (T2 e T3), a taxa de crescimento da cepa CYL04 chegou a $0,3 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 26, Tabela 9). Os cultivos submetidos à temperatura de 27°C (T4) tiveram taxa de crescimento máxima próxima de $0,5 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 26, Tabela 9).

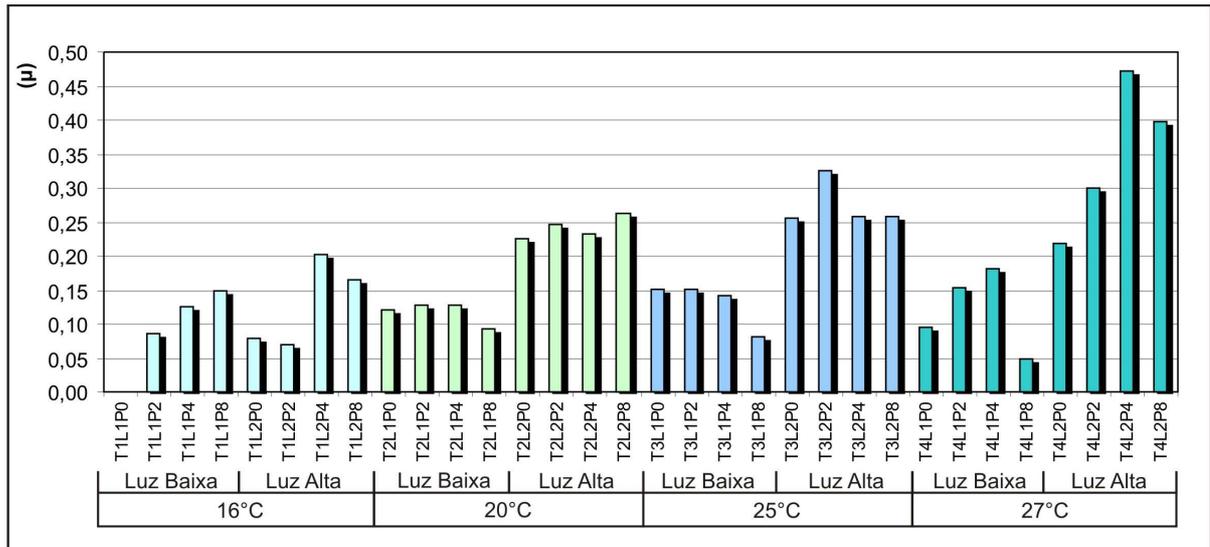


FIGURA 26 – TAXAS DE CRESCIMENTO ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) DA CEPA CYL04 SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

A média das réplicas foi utilizada ($n = 3$).

TABELA 9 – TAXA DE CRESCIMENTO ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) DOS CULTIVOS SUBMETIDOS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS ORGANIZADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO REATIVO.

TRATAMENTOS	0,00 mg.L ⁻¹	0,02 mg.L ⁻¹	0,04 mg.L ⁻¹	0,08 mg.L ⁻¹
16°C / 40 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,06	0,13 ± 0,07	0,15 ± 0,08
16°C / 250 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,08 ± 0,11	0,07 ± 0,06	0,20 ± 0,12	0,17 ± 0,08
20°C / 40 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,09 ± 0,01
20°C / 250 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,26 ± 0,01
25°C / 40 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01
25°C / 250 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,26 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,02
27°C / 40 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,09 ± 0,07	0,15 ± 0,04	0,18 ± 0,07	0,05 ± 0,01
27°C / 250 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0,22 ± 0,00	0,30 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,40 ± 0,03

Os dados foram apresentados na forma de taxa de crescimento ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) ± desvio padrão.

Os valores de $Q_{10(16-27^\circ\text{C})}$ calculados para a cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados foram maiores quando cultivada sob alta intensidade luminosa (Tabela 10).

TABELA 10 – COEFICIENTES DE TEMPERATURA ($Q_{10(16-27)}$) CALCULADOS PARA A CEPA DE *C. raciborskii* CYL04 CULTIVADA SOB DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS E CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO REATIVO.

TRATAMENTOS	0,00 mg.L ⁻¹	0,02 mg.L ⁻¹	0,04 mg.L ⁻¹	0,08 mg.L ⁻¹
40 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	-	1.59	1.34	0.37
250 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	2.51	3.75	2.17	2.18

Os tricomas submetidos a concentração de SRP equivalente a 0,08 mg.L⁻¹ apresentaram heterócitos durante a maior parte do período de experimento. A produção de heterócitos iniciou entre o quinto e sexto dia de experimento. Os

tricomos cultivados em menores concentrações de SRP também formaram heterócitos nas fases iniciais do experimento, mas perderam essas células especializadas após a fase de maior crescimento do cultivo (entre o décimo e décimo quinto dia).

4 DISCUSSÃO

A temperatura mostrou-se um importante fator regulador do crescimento da cepa de *C. raciborskii* CYL04. Apesar da temperatura ótima de crescimento da espécie, estabelecida em laboratório, ser relativamente alta (entre 25 e 35°C, e.g. SAKER; EAGLESHAM, 1999; BRIAND *et al.*, 2004), a cepa do reservatório de Alagados mostrou-se capaz de manter o crescimento também em temperatura reduzida (16°C). A taxa de divisão da cepa quando submetida a 16°C foi baixa ($\mu_{\text{máx}} = 0,2 \text{ dia}^{-1}$) quando comparada aos outros tratamentos. A tolerância da espécie a temperaturas tão baixas quanto 16°C já havia sido reportada em estudos de laboratório (BRIAND *et al.*, 2004; CHONUDOMKUL *et al.*, 2004; PICCINI *et al.*, 2011). Uma cepa uruguaia de *C. raciborskii* estudada por Piccini *et al.* (2011) é capaz de sobreviver, em laboratório, em 14°C, temperatura ainda mais baixa que a mínima utilizada durante o presente estudo.

A cepa CYL04 apresentou uma fase lag de 3-5 dias quando submetida a menor temperatura testada (16°C). Essa fase de adaptação metabólica antes de iniciar a divisão também foi observada por outros autores. Nos experimentos de Chonudomkul *et al.* (2004) cepas japonesas e tailandesas apresentaram crescimento bom ou moderado sob 15 e 17,5°C. Enquanto as cepas tailandesas apresentaram fase lag com duração semelhante a do presente estudo, cerca de três dias, as cepas japonesas iniciaram o crescimento logo após a inoculação. As cepas japonesas de Chonudomkul *et al.* (2004) parecem estar completamente adaptadas a baixas temperaturas (sem precisar de aclimação), devido a essa ser uma condição constante na região de onde foram isoladas. As cepas tailandesas de Chonudomkul *et al.* (2004), assim como a brasileira do presente estudo, são capazes de manter o crescimento em temperaturas baixas, ao redor de 15°C, mas necessitam de um período de aclimação. Isso se deve ao fato de essas temperaturas não serem

comuns em períodos de dominância de *C. raciborskii* nas regiões de onde foram isoladas.

A tolerância de *C. raciborskii* a temperaturas baixas vem sendo observada também em campo (DOKULIL; MAYER, 1996; WIEDNER *et al.*, 2007). Fabre *et al.* (2010) encontraram elevada biomassa de *C. raciborskii* em um lago subtropical uruguaio durante o inverno, em temperatura próxima a 11°C (FABRE *et al.*, 2010). Essa é a menor temperatura na qual a espécie já foi registrada dominando o fitoplâncton total (FABRE *et al.*, 2010) e, até agora, a menor temperatura que a espécie pode tolerar. Como uma evidência, deve-se citar o fato de que algumas cepas não foram capazes de sobreviver em laboratório sob temperaturas menores, como 10°C (CHONUDDOMKUL *et al.*, 2004).

Cylindrospermopsis raciborskii, de fato, é capaz de manter-se em alguns lagos subtropicais (e.g. CHONUDDOMKUL *et al.*, 2004; FIGUEREDO; GIANI, 2009; FABRE *et al.*, 2010; PICCINI *et al.*, 2011) durante a maior parte do ano. A implicação ecológica do crescimento da espécie, mesmo que reduzido, em temperaturas baixas é a manutenção do inóculo inicial para a floração no próximo período de crescimento. Essa característica, observada na cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados, pode ser responsável por sustentar um número limitado de tricomas no reservatório durante o inverno, que pode desencadear a próxima floração, em janeiro, quando as condições ambientais tornam-se novamente favoráveis.

Em climas frios, a produção de acinetos desempenha um papel fundamental no crescimento de *C. raciborskii* (BRIAND *et al.*, 2004). Cepas isoladas da região temperada comumente produzem essas células de resistência, normalmente, sob temperaturas baixas de inverno (HAANDE *et al.*, 2008). Já as cepas isoladas de ecossistemas localizados em regiões mais quentes, como a região tropical do globo, raramente produzem acinetos (SAKER; GRIFFITHS, 2001). Apesar de alguns autores sugerirem que as cepas subtropicais de *C. raciborskii* persistam apenas na forma vegetativa durante o inverno (e.g. SAKER; GRIFFITHS, 2001; PICCINI *et al.*, 2011), quando cultivada a 16°C, a cepa CYL04 apresentou produção de acinetos, mesmo que em pequena quantidade (em média 16 acinetos.mL⁻¹, dados não apresentados). Essas células de resistência aparecem nessa cepa de maneira isolada ou, mais comumente, em grupos de duas ou três dessas células dispostas em sequência entre as células vegetativas. A formação de acinetos está relacionada

à alta capacidade da espécie de tolerar condições estressantes (BICUDO; MENEZES, 2005), como temperatura baixa, nesse caso. No reservatório de Alagados, a produção de acinetos pode ser iniciada com a chegada do inverno, quando a temperatura da água da zona fótica cai drasticamente (SANEPAR, relatórios internos). Dessa maneira, a temperatura de germinação dessas células de resistência (entre 22 e 23°C para *C. raciborskii*, PÁDISAK, 1997; BRIAND *et al.*, 2004; MOORE, MCGREGOR; SHAW, 2004) poderia explicar a regularidade das florações no reservatório, que ocorrem a partir de janeiro, quando a temperatura da água do fundo do reservatório é maior que 22°C (IAP, 2009). Os acinetos em germinação podem ser carreados também, ainda mais cedo, de regiões mais rasas do reservatório, cuja água do fundo pode atingir a temperatura de germinação ainda mais cedo.

Em regiões subtropicais e temperadas há uma maior variação da temperatura anual, que influencia diretamente na temperatura da água. No reservatório de Alagados, localizado em uma região subtropical, *C. raciborskii* aparece com biomassa relativamente alta (entre 10.000 e 300.000 céls.mL⁻¹), usualmente, em janeiro (temperatura superficial da água muitas vezes superior a 25°C), e se mantém até julho-agosto (temperatura da água próxima a 15°C) (SANEPAR, relatórios internos). Apesar das características de *C. raciborskii* apresentadas anteriormente (capacidade de manter a população reduzida e produção de acinetos em temperatura baixa), eventos de quedas bruscas de temperatura parecem influenciar diretamente a abundância das florações nesse reservatório (ver Figura 4). Como especulado por Padisák (1997), essa espécie é incapaz de se adaptar rapidamente a uma grande variação de temperatura. Essa característica pode ser responsável pelo decaimento das florações durante o inverno em regiões subtropicais, como a que está localizado o reservatório de Alagados, e temperadas. Um evento de queda brusca para temperaturas menores que 16°C poderia ser um dos fatores limitantes da biomassa de *C. raciborskii* em meados de junho no reservatório de Alagados. Na zona fótica desse reservatório há uma amplitude térmica anual de 12°C (de temperaturas próximas a 27°C no verão para menores que 15°C no inverno). Entre maio e junho ocorre uma queda brusca de temperatura de, em média, 5°C (de 20°C em maio para 15°C em junho). Durante esses eventos, a floração da cianobactéria *C. raciborskii* é praticamente substituída pela elevada densidade celular da clorófito *Mougeotia* sp. (SANEPAR, relatórios internos). Esses extremos térmicos podem

limitar a distribuição dos organismos através da diminuição severa da sua capacidade de sobrevivência (RICKLEFS, 2003), principalmente de grupos com ciclo de vida curto como o das algas, e favorecer o crescimento de outras espécies melhor adaptadas ao conjunto de condições locais.

Mougeotia C. Agardh é um gênero de alga verde filamentosa que está entre as algas mais amplamente distribuídas em água doce (TRANSEAU, 1926), sendo frequentemente encontrada em lagos acidificados (KLUG; FISCHER, 2000). Em ecossistemas lênticos, *Mougeotia* pode ser encontrada no plâncton como células isoladas, como filamentos estreitos e curtos ou enrolados (TRANSEAU, 1926). Assim como *C. raciborskii*, espécies do gênero *Mougeotia* são capazes de produzir células vegetativas com paredes espessadas (TRANSEAU, 1926) que podem resistir a períodos com condições adversas. Esse fato poderia explicar a dominância dessas espécies ao longo dos anos monitorados. O aumento da abundância de *Mougeotia* sp., que ocorre em meados de julho, pode estar relacionado, além da redução da temperatura no inverno, como demonstrado em nossos experimentos e literatura, também ao pH da água do reservatório de Alagados. Em períodos em que *C. raciborskii* domina o fitoplâncton desse reservatório, o pH da água gira em torno de 9 (SANEPAR, relatórios internos). Entre junho e julho tende a ocorrer uma queda no pH da água do reservatório, que chega a 6,5, provavelmente decorrente da própria queda da floração e da decomposição da matéria orgânica resultante. Nesses períodos, o fitoplâncton do reservatório de Alagados passa a ser dominado por *Mougeotia* sp. Segundo Klug e Fischer (2000), fatores abióticos associados a alterações no pH desempenham um importante papel na regulação da dinâmica de espécies de *Mougeotia*. Esses autores realizaram experimentos de mesocosmos em reservatórios onde o gênero *Mougeotia* ocorre e observaram um extraordinário aumento na abundância das espécies após acidificação experimental. Em termos econômicos, essas elevadas abundâncias de *Mougeotia* sp. não são tão prejudiciais ao sistema de tratamento de água, já que essa clorófito não é capaz de produzir toxina, ao contrário da cianobactéria *C. raciborskii*.

A energia térmica acelera a maioria dos processos vitais, portanto, como o esperado, *C. raciborskii* cresceu mais rapidamente conforme se elevou a temperatura nos experimentos. Entre as temperaturas testadas durante o presente estudo, a cepa de *C. raciborskii* atingiu maior taxa de crescimento a 27°C. Essa foi a maior temperatura testada, considerando que é a temperatura máxima que ocorre no

reservatório de Alagados, local de onde a cepa foi isolada. Os cultivos submetidos a essa temperatura exibiram taxa de crescimento máxima próxima de $0,5 \text{ dia}^{-1}$. Por outro lado, a densidade óptica alcançada pela cepa a essa temperatura não superou a observada sob temperaturas medianas (20 e 25°C). Em cultivos não contínuos, como o utilizado durante esse estudo, quanto maior a taxa de crescimento do organismo mais rapidamente ocorrerá o colapso, por competição ou limitação por recurso. O que pode não ocorrer em campo, onde a disponibilidade de recurso é, teoricamente, contínua.

O ótimo de temperatura das enzimas (crescimento máximo) da cepa CYL04 pode não ter sido atingido sob as condições experimentadas nesse trabalho. Segundo Briand *et al.* (2004), a temperatura ótima de crescimento da espécie está entre 25 e 30°C , assim como demonstrado anteriormente por Shafik *et al.* (2001) para cepas húngaras e por Saker e Griffiths (2000) para australianas. Com o aumento da temperatura global, resultante do aceleração do efeito estufa, essa elevada temperatura ótima de crescimento de *C. raciborskii* pode levar a sérias implicações na produtividade e distribuição dessa microalga. Como uma evidência, a cepa de *C. raciborskii* CYL04 cresceu bem em laboratório sob as temperaturas médias que ocorrem no reservatório de onde foi isolada (20 e 25°C). Por outro lado, se, decorrente do aquecimento global, a temperatura média de verão aumentar de 25 para 27°C no reservatório de Alagados, a taxa de crescimento da cepa pode ir de 0,3 para $0,5 \text{ dia}^{-1}$. Esse aumento na taxa de crescimento pode favorecer ainda mais a dominância de *C. raciborskii* no reservatório e promover a manutenção da floração por períodos ainda mais longos durante o ano. A mudança para esse cenário poderia trazer sérias implicações para os órgãos responsáveis pelo abastecimento público.

Portanto, como observado em nossos dados e já reportado na literatura (BRIAND *et al.*, 2004), *Cylindrospermopsis raciborskii* é capaz de tolerar uma ampla faixa de temperatura, desde muito baixas (CHONUDOMKUL *et al.*, 2004; WIEDNER *et al.*, 2007; FABRE *et al.*, 2010; PICCINI *et al.*, 2011) até altas (SAKER; GRIFFITHS, 2000; SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004). A ampla tolerância térmica permite o crescimento dessa microalga em diferentes ambientes e pode ser considerada uma vantagem seletiva para espécies potencialmente invasoras (DOKULIL; MAYER, 1996; BRIAND *et al.*, 2002).

A taxa de crescimento exibida pela cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados foi mais baixa do que os valores encontrados na literatura (Tabela 11). De maneira geral, as cepas subtropicais exibem taxas de crescimento menores quando comparadas às cepas tropicais (Tabela 11). Entre as cepas brasileiras de *C. raciborskii*, por exemplo, as cepas isoladas de regiões subtropicais (Presente estudo; CARNEIRO *et al.*, 2009) exibem taxas de crescimento inferiores às de cepas isoladas da região tropical (BRIAND *et al.*, 2004). As cepas isoladas da região tropical da Austrália exibem as maiores taxas de crescimento (Tabela 11) entre cepas de *C. raciborskii* investigadas até agora. Na região tropical as temperaturas permanecem altas durante todo o ano, implicando em maior crescimento potencial da cepa nesses ambientes, enquanto em latitudes mais altas as temperaturas tendem a ser mais baixas, com crescimento relativamente menor das cepas de *C. raciborskii*. Além da adaptação das cepas, as diferenças entre as taxas de crescimento encontradas durante os estudos também podem estar relacionadas às metodologias utilizadas pelos autores, como diferentes meios de cultivos e fotoperíodos em que as cepas foram cultivadas. Medições e comparações entre taxas de crescimento representam uma importante forma de expressar o sucesso ecológico relativo de uma espécie ou cepa na adaptação ao seu ambiente natural ou ao ambiente experimental que lhe é imposto (CARNEIRO *et al.*, 2009).

TABELA 11 – TAXAS DE CRESCIMENTO MÁXIMO ($\mu_{\text{máx}}$) DE CEPAS DE *C. raciborskii* ISOLADAS DE DIFERENTES LOCAIS.

Origem da cepa	Taxa de crescimento ($\mu.\text{dia}^{-1}$)	Condições experimentais			Referência
		Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Luminosidade ($\mu\text{mol fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Fotoperíodo (horas)	
Brasil (PR)	0,5	27	150	12:12	Presente estudo
Brasil (SP)	0,3	24	150	12:12	Carneiro <i>et al.</i> , 2009
Alemanha	0,3	27,5	80	12:12	Mehnert <i>et al.</i> , 2010
Uruguai	0,6	25	135	16:8	Bonilla <i>et al.</i> , 2012
Uruguai	0,6	26	180	16:8	Piccini <i>et al.</i> , 2011
Austrália	0,6	25	50	12:12	Saker e Neilan, 2001
Austrália	0,7	25	150	16:8	Briand <i>et al.</i> , 2004
Hungria	0,7	25	100	16:8	Briand <i>et al.</i> , 2004
Senegal	0,7	25	200	16:8	Briand <i>et al.</i> , 2004
França	0,7	25	100	16:8	Briand <i>et al.</i> , 2004
Brasil (PE)	0,8	25	100	16:8	Briand <i>et al.</i> , 2004
Austrália	1,2	26	100	12:12	Saker <i>et al.</i> , 1999
Uruguai	1,3	26	180	16:8	Piccini <i>et al.</i> , 2011
Austrália	1,4	25	50	12:12	Saker e Neilan, 2001
Austrália	1,9	26	118	12:12	Saker <i>et al.</i> , 1999

Além da característica euritérmica da espécie, *C. raciborskii* tem a capacidade de crescer em condições de baixa intensidade luminosa (Capítulo 2 - Presente estudo, SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004). Essa habilidade, aliada a regulação da posição vertical na coluna de água, entre outras vantagens, permite acessar os nutrientes em camadas mais profundas da zona fótica (BRIAND *et al.*, 2004), onde espécies que necessitam de maiores intensidades luminosas para sustentar o crescimento não poderiam sobreviver. Durante o presente estudo, a interação da intensidade luminosa com a temperatura teve efeito positivo no crescimento da cepa de *C. raciborskii* CYL04. Exceto a 16 $^{\circ}\text{C}$ (temperatura sob a qual a cepa não apresentou crescimento intensivo), a intensidade luminosa mais alta (250 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi responsável por maiores crescimentos de *C. raciborskii*. Já sob intensidade luminosa mais baixa (40 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), maiores

temperaturas são necessárias para aumentar a taxa de crescimento da cepa. Como já mencionado, a temperatura ideal de crescimento de *C. raciborskii* está entre 25 e 30°C sob intensidade luminosa ideal ($> 80 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), mas aumenta para 31°C sob intensidade sub-ótima (SHAFIK *et al.*, 2001). Portanto, apesar de ser uma espécie tolerante ao sombreamento (PADISÁK; REYNOLDS, 1998; ISVÁNOVICS *et al.*, 2000; BRIAND *et al.*, 2002), *C. raciborskii* requer intensidades luminosas mais altas (entre 80 e 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) para atingir seu crescimento máximo (SHAFIK *et al.*, 2001; BRIAND *et al.*, 2004).

Os valores de Q_{10} (16 – 27°C) calculados para a cepa de *C. raciborskii* CYL04 foram maiores quando a cepa foi cultivada sob alta intensidade luminosa (250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) e concentração média anual de fósforo reativo (SRP) (0,02 mg.L^{-1}) que ocorre no reservatório de onde foi isolada ($Q_{10} = 3.75$). Essa diferença entre valores indica que, sob as condições de luz e concentração de SRP que ocorrem normalmente no reservatório, a taxa de crescimento desse organismo apresentou uma maior resposta ao aumento da temperatura a que foi submetido. Esses resultados reforçam a hipótese de favorecimento do crescimento de *C. raciborskii* no reservatório de Alagados em resposta às alterações climáticas, mesmo sem qualquer aumento na concentração de SRP no reservatório. As diferenças nos valores de Q_{10} entre os tratamentos podem ser atribuídas à plasticidade fenotípica e a alta capacidade de aclimação de *C. raciborskii*. Um exemplo disso são as adaptações morfofisiológicas de *C. raciborskii* para otimizar a absorção de luz como a mudança na composição/proporção de pigmentos (BONILLA *et al.*, 2012) e na forma/tamanho dos tricomas (Presente estudo, Capítulo 2).

Assim como a temperatura e intensidade luminosa ideais, os organismos aquáticos necessitam de concentrações adequadas de fósforo inorgânico dissolvido (PID) no ambiente para manter seu crescimento ativo (ESTEVES, 1998). Todavia, durante o presente estudo, mesmo crescendo em meio livre de fósforo durante 20 dias antes do início dos experimentos, a cepa CYL04 manteve a capacidade de crescimento, mesmo que reduzida (taxa de crescimento máxima de 0,2 dia^{-1}), quando cultivada sem adição de SRP (0,00 mg.L^{-1}). Quando submetida a esse tratamento a cepa não apresentou crescimento intensivo, mas foi capaz de manter a população. Nesse caso, os tricomas apresentaram citoplasma com aparência mais clara e com poucas granulações quando comparado a tricomas cultivados com adição de fósforo. Sabe-se que essa espécie é capaz de manter o crescimento

utilizando o suprimento de nutriente armazenado na forma de grânulos citoplasmáticos. Segundo Isvánovics (1997) a diferença entre a quota celular mínima e máxima de fósforo em *C. raciborskii* pode satisfazer a demanda desse nutriente por três divisões subsequentes em caso de completa falta de fósforo no meio extracelular. Dessa forma, concluímos que, apesar da característica hialina dos tricomas de *C. raciborskii* utilizados para iniciar os experimentos, o tempo de aclimação não foi suficiente para eliminar a reserva interna de fósforo.

Em laboratório, *C. raciborskii* é uma espécie capaz de regular suas respostas fisiológicas e se adaptar a baixas concentrações de fósforo inorgânico dissolvido no ambiente ($< 0,005 \text{ mg.L}^{-1}$) através da diminuição da taxa de crescimento e da atividade fotossintética e do aumento da atividade de enzimas antioxidantes e fosfatases extracelulares (WU *et al.*, 2012). *Cylindrospermopsis raciborskii* exibe a peculiar capacidade de utilizar formas de fósforo orgânico dissolvido, o que lhe confere uma vantagem em ambientes com baixas concentrações de fósforo inorgânico dissolvido (WU *et al.*, 2012). Quando o fósforo é escasso, a produção de fosfatase alcalina (enzima responsável pela hidrólise de fósforo orgânico) por *C. raciborskii* pode compensar a deficiência de fósforo no ambiente.

De maneira geral, a concentração de fósforo reativo (SRP) na barragem do reservatório de Alagados permanece abaixo da média ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$), variando de 0,00 (abaixo do limite de detecção = $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) a $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$. Essas concentrações podem ser consideradas baixas quando comparadas as de outros reservatórios da região (ver Tabela 3). Mesmo sob essas condições, as florações de *C. raciborskii* se mantêm em altas densidades. Segundo Burford e O'Donohue (2006) pequenas concentrações de fósforo em águas superficiais, mesmo menores que as que ocorrem em Alagados, já podem ser suficientes para promover o crescimento do fitoplâncton, tais como *C. raciborskii*. De fato, há um crescente domínio dessa espécie no fitoplâncton de lagos com concentrações de fósforo total abaixo de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (BONILLA *et al.*, 2012). Sabe-se que essa espécie domina também em outros lagos e reservatórios com concentrações de fósforo que permanecem muitas vezes abaixo do limite de detecção (BURFORD; O'DONOHUE, 2006; POSSELT; BURFORD; SHAW, 2009). Isso se deve ao fato de que alguns organismos, como *C. raciborskii*, evoluíram mecanismos ou adaptações para lidar com concentrações variáveis de fósforo no ambiente (DYHRMAN *et al.*, 2007; AUBRIOT *et al.*, 2011). Assim como várias outras espécies de cianobactérias, *C.*

raciborskii pode ser considerada uma eficiente especialista no que diz respeito ao armazenamento intracelular de fósforo (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000; PADISÁK; REYNOLDS, 1998).

Apesar da concentração de fósforo relativamente baixa, o reservatório de Alagados é polimítico, ou seja, ocorrem diversos eventos de circulação durante o ano (IAP, 2009). Essa dinâmica permite a liberação e ressuspensão de fósforo, garantindo conseqüente fornecimento contínuo desse elemento proveniente do sedimento do reservatório (WU *et al.*, 2012). Esse fornecimento pode ser suficiente para a utilização e o armazenamento por *C. raciborskii*, podendo sustentar a floração (PADISÁK, 1997). Segundo Isvánovics *et al.* (2000), a liberação de fósforo do sedimento podem fornecer um importante suprimento desse elemento para *C. raciborskii*, sendo que 0,01 mg.L⁻¹ durante 15 minutos é suficiente para manter uma floração. O domínio dessa cianobactéria é favorecido em sistemas com abastecimento flutuante de fósforo (BRIAND *et al.*, 2002; POSSELT; BURFORD; SHAW, 2009; AUBRIOT; BONILLA, 2012), como o reservatório de Alagados. Posselt, Burford e Shaw (2009) demonstraram que adições diárias de PID a bioensaios *in situ* causaram tanto um acréscimo na concentração de células de *C. raciborskii* quanto um aumento também na dominância dessa espécie. *C. raciborskii* apresenta superior capacidade de armazenamento de fósforo (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000). Portanto, as entradas desse elemento por pulsos podem fornecer uma vantagem sobre as entradas constantes. A resposta de crescimento pode, desse modo, ser mais dependente da capacidade da cianobactéria de aperfeiçoar a absorção de SRP durante um intervalo de tempo de flutuação de nutrientes do que da quantidade de nutriente absorvida em si (AUBRIOT; BONILLA, 2012).

Quando cultivada sob maiores concentrações de SRP a cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados, apresentou taxa de crescimento dependente da temperatura a qual foi submetida. Entre 20 e 25°C não houve diferença significativa no crescimento da cepa, independente da concentração de SRP na qual foi cultivada. Já a 27°C, maiores concentrações de SRP levaram a um aumento significativo no crescimento da cepa. Sob essa temperatura foi possível observar claramente o efeito de diferentes concentrações de SRP no crescimento da cepa CYL04. Apenas os tratamentos com concentração de SRP correspondente a 0,00 mg.L⁻¹ não apresentaram crescimento intensivo. Nessa temperatura, os tratamentos com concentração de SRP correspondentes a 0,02 mg.L⁻¹ e 0,04 mg.L⁻¹

apresentaram crescimento diretamente proporcional a concentração de fósforo adicionada ao meio de cultivo (concentração natural no reservatório do qual foi isolada e o dobro desse valor, respectivamente).

De maneira geral, quando cultivada sob concentração de SRP igual a 0,02 mg.L⁻¹ (média anual no reservatório de Alagados), a cepa apresentou maior crescimento em 20 e 25°C, temperaturas que ocorrem normalmente no ambiente de onde foi isolada. Esse fato pode sugerir uma adaptação da cepa às condições prevalentes no ambiente da qual foi isolada. O crescimento da cepa sob concentração de SRP equivalente a 0,04 mg.L⁻¹ (o dobro da média anual no reservatório) foi significativamente maior quando comparado às outras concentrações testadas. Sob essa concentração de SRP a cepa cresceu similarmente entre as diferentes temperaturas (exceto em 16°C onde não houve crescimento intensivo). Essa parece ser a concentração ótima de SRP para a cepa de *C. raciborskii* CYL04.

A concentração de SRP equivalente a 0,08 mg.L⁻¹ não promoveu aumento proporcional no crescimento da cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados. Estudando uma cepa uruguaia de *C. raciborskii*, Piccini *et al.* (2011) encontraram comportamento semelhante em relação a altas concentrações de SRP. Aparentemente a cepa uruguaia atingiu sua taxa de crescimento máxima a 1 µM de fósforo (equivalente a 0,03 mg.L⁻¹), sendo que concentrações maiores que essa não promoveram efeito positivo no crescimento. Segundo esses autores, e confirmado durante esse estudo, o comportamento da cepa pode refletir a concentração de fósforo que ocorre no corpo de água do qual foi isolada. Sabe-se também que *C. raciborskii* é uma oportunista com relação ao fósforo, no entanto, perde sua vantagem em níveis elevados desse nutriente (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000). Em campo, de fato há uma relação negativa entre o estado trófico e a contribuição dessa cianobactéria para o fitoplâncton total (BONILLA *et al.*, 2012).

Além disso, o menor crescimento da cepa em 0,08 mg.L⁻¹ de SRP, quando comparado ao crescimento em 0,04 mg.L⁻¹, também pode ser atribuído a um desbalanceamento na relação N:P do meio de cultivo utilizado nesse tratamento, já que a concentração de fósforo foi aumentada em quatro vezes, enquanto a de nitrogênio foi mantida como o recomendado para o preparo do meio ASM-1. Uma evidência foi a persistente presença de heterócitos. *C. raciborskii* é uma cianobactéria diazotrófica, ou seja, que possui a capacidade de fixar nitrogênio

atmosférico (N_2) através dos heterócitos em ocasiões em que o nitrogênio inorgânico dissolvido se torna escasso no ambiente (PADISÁK, 1997; BURFORD; DAVIS, 2011). A produção de heterócitos pela cepa CYL04 foi intensa quando submetida a concentração de SRP de $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ durante praticamente todo o experimento, enquanto os tricomas cultivados sob menores concentrações de fósforo formaram essas células especializadas apenas nas primeiras fases do crescimento. Similarmente, nos experimentos de Moisander *et al.* (2008) as taxas de crescimento de cianobactérias diazotróficas, incluindo *C. raciborskii*, foram mais lentas quando não houve adição de nitrogênio juntamente com o fósforo. Sabe-se que, de fato, *C. raciborskii* cresce mais rapidamente em culturas quando há uma fonte de nitrogênio fixado (SAKER *et al.*, 1999; HAWKINS *et al.*, 2001; SHAFIK *et al.*, 2001; MOISANDER *et al.*, 2008), sendo que a forma de assimilação preferencial por essa cianobactéria é a amônia (NH_4^+) (BOUVY *et al.*, 1999; BRIAND *et al.*, 2002). Sprober *et al.* (2003) sugerem que a fixação de N_2 depende do teor de nitrogênio interno nas células. Portanto, há uma relação negativa entre a concentração de NH_4^+ no meio e a fixação de N_2 . Por outro lado, a presença de nitrato (NO_3^-) (forma de nitrogênio adicionada aos meios de cultivo durante esse estudo) muitas vezes não inibe totalmente a atividade da nitrogenase (SPROBER *et al.*, 2003; MOISANDER *et al.*, 2012). Esse parece ser o caso em todos os nossos tratamentos em que houve fixação de N_2 nas fases iniciais do crescimento. Parece que a absorção de NO_3^- por *C. raciborskii* não foi suficiente, pelo menos no início da fase de maior crescimento (fase log). Porém, essa cianobactéria parece ser capaz de adaptar-se as condições do meio, adquirindo alto poder de competição tanto em condição de baixa quanto alta concentração de nitrogênio (MOISANDER *et al.*, 2012). A produção de heterócitos supriu a falta de nitrogênio (através da fixação de N_2), mas o alto gasto de energia deslocado para a formação de heterócitos (KENESI *et al.*, 2009) pode ter limitado a energia disponível para o crescimento e, conseqüentemente, causado uma diminuição da taxa de crescimento da cepa nesses tratamentos. Esses resultados suportam o argumento de que o crescimento de cianobactérias diazotróficas é mais lento do que a do fitoplâncton não diazotrófico, sob limitação por nitrogênio, devido ao gasto de energia desviada para a fixação de N_2 (MOISANDER *et al.*, 2012). Todavia, a relação entre a utilização de fósforo e nitrogênio e a dominância de *C. raciborskii* não é um mecanismo simples (BURFORD; DAVIS, 2011) e, para isso, são necessários experimentos mais específicos.

A cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados parece ser dependente da fixação de nitrogênio. Em cultivo, os heterócitos são formados antes do início da fase log, entre os processos fisiológicos de preparação para a reprodução. Esse poderia ser interpretado como um interessante comportamento antecipatório. Da mesma forma, em campo, grande parte da população de *C. raciborskii* apresenta heterócito (observações pessoais), provavelmente devido à baixa concentração de nitrogênio inorgânico disponível no ambiente (IAP, 2009). No caso do reservatório de Alagados, a fixação de nitrogênio atmosférico não deve ser descartada como um fator atuando na intensa proliferação de *C. raciborskii*. Moisander *et al.* (2008) demonstraram que *C. raciborskii* compete de forma mais eficiente que outras cianobactérias diazotróficas nativas de águas subtropicais da Florida (como *Dolichospermum* spp., por exemplo, outra cianobactéria que ocorre no reservatório de Alagados, mas não chega a formar florações) em condições em que uma fonte de nitrogênio inorgânico dissolvido esteve periodicamente presente. Segundo esses autores, *C. raciborskii* é uma cianobactéria diazotrófica facultativa, o que permite a utilização seletiva e eficaz de nitrogênio, seja a partir da fixação de N₂ ou da assimilação de nitrogênio inorgânico dissolvido, dependendo das condições ambientais. Essa estratégia é um dos fatores que podem explicar a recente expansão de *C. raciborskii* para águas eutrofizadas por todo o mundo (MOISANDER *et al.*, 2012). Enquanto cianobactérias diazotróficas, em princípio, nunca são limitadas por nitrogênio, as espécies não diazotróficas do fitoplâncton são frequentemente limitadas por nitrogênio ou fósforo em muitos sistemas de água doce (MOISANDER *et al.*, 2012).

Nossos resultados oferecem uma nova perspectiva sobre o que pode ser considerada uma estratégia efetiva de minimização das florações de *C. raciborskii* no reservatório de Alagados. A baixa concentração de nitrogênio nesse reservatório não deve limitar o crescimento de *C. raciborskii*, já que a concentração de fósforo parece suficiente tanto para o crescimento da cianobactéria quanto para suprir a falta de nitrogênio através da produção de heterócito. A predominância das florações deve ser mantida pelas flutuações de SRP que não são detectadas pelos programas de monitoramento, devido ao longo intervalo entre as coletas (entre 30 e 90 dias). Coletas mais frequentes, assim como a redução da carga de fósforo, poderiam ser utilizadas como medidas para melhorar a qualidade da água do reservatório.

Contudo, trabalhos futuros são necessários para determinar a fisiologia específica da utilização de fósforo em interação com nitrogênio por esta espécie.

O início de uma floração pode ser devido a um conjunto de fatores ambientais como temperatura, intensidade luminosa e duração do período iluminado, disponibilidade de nutrientes, competição com outras espécies, propriedades físicas da água (CHISWELL *et al.*, 1997), entre outros. Determinar os fatores que promovem as florações, bem como a maneira como influenciam o comportamento de diferentes cepas de *C. raciborskii*, são ferramentas extremamente importantes para o gerenciamento efetivo de corpos de água dominados por essa cianobactéria invasora. Se considerarmos que o crescimento de uma população de cianobactérias é contínuo, sem interferência do meio, podemos descrever esse crescimento através de uma curva, que nos permite modelar a taxa de crescimento da população e projetar o tamanho que ela pode atingir em um determinado espaço de tempo. A equação diferencial $dN/dt = r \times N$ nos dá a taxa de crescimento intrínseca da população. Por outro lado, se essa equação for integrada ($N_t = N_0 e^{rt}$) o resultado pode ser utilizado para projetar ou prever o tamanho dessa população.

Onde:

N = tamanho da população

N_0 = tamanho populacional inicial

t = tempo (dias)

t_0 = ponto de partida ou início do crescimento (dia)

N_t = tamanho da população no tempo t

e = constante de Euler, a base dos logaritmos naturais ($e \approx 2,717$)

r = taxa intrínseca de crescimento da população

Sabendo o tamanho inicial da população e sua taxa de crescimento (apresentada na Tabela 9 para cada condição experimental), pode-se usar a equação integrada para prever o tamanho da população em um tempo futuro.

Atenção especial deve ser dada ao fato de que as taxas de crescimento intrínseco atribuídas para cada uma das situações (Tabela 9) foram calculadas a partir de experimentos laboratoriais (com uma população única crescendo em um ambiente simples), que seguem pressupostos de um modelo matemático simples. Em laboratório a população é “fechada”, ou seja, as mudanças em seu tamanho dependem apenas de reprodução e morte celular. A taxa de crescimento é calculada para um período de tempo muito curto, a fim de eliminar a influência da falta de espaço ou escassez de recursos (nutrientes ou luz). A competição, predação ou

outras interações biológicas não são levadas em conta, já que as taxas de crescimento são calculadas para cultivos puros, unialgais. No ambiente natural, sabemos que as populações não crescem ilimitadamente, pois ocorre, principalmente, esgotamento de recursos, além de inúmeros outros fatores que alteram a taxa de crescimento da população ao longo do tempo. Os modelos matemáticos simplificam essa realidade levando em conta que os recursos podem ser temporariamente ilimitados, permitindo que algumas populações passem por fases de crescimento exponencial. Portanto, a previsão realizada a partir desse modelo matemático apresenta o pior cenário possível do tamanho da população para o tempo determinado.

O monitoramento tem alto custo, devido ao grande número de reservatórios no Paraná, elevado número de amostras para análise, assim como de coletas, que deve ser realizada por pessoal especializado. Por esse motivo, normalmente, as coletas ocorrem trimensalmente, que é uma escala de tempo muito longa para monitorar o fitoplâncton, composto por organismos com ciclo de vida curto. A modelagem do crescimento da população pode ser calibrada em campo e fornecer uma ferramenta útil para prever o comportamento do fitoplâncton numa curta escala de tempo. Essa ferramenta pode ser utilizada como uma forma de planejar e antecipar as ações a serem tomadas entre uma amostragem e outra.

5 CONCLUSÕES

Essas observações auxiliam na caracterização do quadro evolutivo da ecofisiologia da cianobactéria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii*, levando-se em conta a interação entre importantes fatores reguladores do seu crescimento (temperatura, intensidade luminosa e fósforo reativo).

Nossos resultados suportam a hipótese de Briand *et al.* (2004) de que a recente dispersão de *C. raciborskii* para maiores latitudes é devida a uma combinação de fatores, incluindo a sua tolerância a uma ampla gama de condições ambientais (testamos luz, temperatura e fósforo) e a existência de ecótipos que respondem de forma diversa às flutuações ambientais.

A cepa de *C. raciborskii* do reservatório de Alagados parece estar adaptada às condições do ambiente do qual foi isolada. Porém, o crescimento da cepa pode ser acelerado em condições de temperaturas mais elevadas (+2°C). Dessa forma, o aquecimento global poderia favorecer *C. raciborskii* em detrimento das outras espécies do fitoplâncton.

Esse estudo demonstrou que o fósforo pode desempenhar um importante papel na regulação do crescimento de *C. raciborskii* em temperatura elevada. Com um pequeno aumento da temperatura global (+2°C), um incremento na concentração de fósforo (+0,02 mg.L⁻¹) na água do reservatório pode praticamente dobrar a taxa de crescimento da cepa.

6 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, R. A.. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press: Oxford, UK, 2005.
- ANTENUCCI, J. P.; GHADOUANI, A.; BURFORD, M. A.; ROMERO, J. R.. The long-term effect of artificial destratification on phytoplankton species composition in a subtropical reservoir. **Freshwater Biology**, vol. 50, p. 1081-1093, 2005.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC, 1995.
- AUBRIOT, L.; BONILLA, S.. Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 67, p. 251-263, 2012.
- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M.. **Gêneros de Algas continentais do Brasil**. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Ed. Rima, 489 pp., 2005.
- BONILLA, S.; AUBRIOT, L.; SOARES, M. C. S.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; FABRE, A.; HUSZAR, V. L. M.; LÜRLING, M.; ANTONIADES, D.; PADISÁK, J.; KRUK, C.. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 79, p. 594-607, 2012.
- BOUVY M.; Molica, R.; De Oliveira, S.; Marinho, M.; Beker, B.. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 20, 1999, p. 285-297. Disponível em: <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_53-54/010020920.pdf> Acesso em: Out. 2010.
- BRIAND, J. F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, vol. 40, n. 2, 2004, p. 231-238.
- BRIAND, J. F.; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBERAS, C.; HUMBERT, J.F.; COUTÉ, A.; BERNARD, C.. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, vol. 36, p. 3183-92, 2002.
- BURFORD, M.A.; DAVIS, T. W.. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, vol. 29, 883-891, 2011.
- BURFORD, M. A.; O'DONOHUE, M. J.. A comparison of phytoplankton community assemblages in artificially and naturally mixed subtropical water reservoirs. **Freshwater Biology**, Oxford, vol. 51, p. 2143-2153, 2006.
- CARNEIRO, R. L.; SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins

production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, vol. 31, n. 5, p. 481-488, 2009.

CHISWELL, R.; SMITH, M.; NORRIS, R.; EAGLESHAM, G.; SHAW, G.; SEAWRIGHT, A.; MOORE, M.. The cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, and its related toxin, Cylindrospermopsin. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, vol. 3, p. 7-23, 1997.

CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; KAWACHI, M.; KASAI, M.; KAYA, K.; WATANABE, M. M.. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 48, p. 345-355, 2004.

COLES, J. F.; JONES, R. C.. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. **Journal of Phycology**, vol. 36, p. 7-16, 2000.

DOKULIL, M. T.; MAYER, J.. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnithrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna. **Algological Studies**, vol. 83, p. 179-95, 1996.

DYHRMAN, S.; AMMERMAN, J.; VAN MOOY, B.. Microbes and the marine phosphorus cycle. **Oceanography**, vol. 20, p. 110-116, 2007.

ESTEVEZ, F. A.. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FABRE, A.; CARBALLO, C.; HERNÁNDEZ, E.; PIRIZ, P.; BERGAMINO, L.; MELLO, L.; GONZÁLEZ, S.; PÉREZ, G.; LEÓN, J. G.; AUBRIOT, L.; BONILLA, S.; KRUK, C.. El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, vol. 5, n. 1, p. 112-125, 2010.

FERNANDES, L. F.; LAGOS, P. e. D.; WOSIACK, A. C.; PACHECO, C. V.; DOMINGUES, L.; ZENHDER-ALVES, L.; COQUEMALA, V.. Comunidades fitoplanctônicas em ambientes lênticos. IN: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C.. (Eds). **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. Curitiba: Sanepar-Finep, 500 pp., 2005a.

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

HAANDE, S., ROHRLACK, T., BALLOT, A., RÓBERG, K., SKULBERG, R., BECK, M., WIEDNER, C.. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, vol. 7, p. 692-701, 2008.

HAWKINS, P. R.; ELIZABETH, P.; FALCONER, I.; HUMPAGE, A.. Phenotypical Variation in a Toxic Strain of the Phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) During Batch Culture. **Environmental Toxicology**, vol. 16, n. 6, p. 460-7, 2001.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. **Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do Estado do Paraná, no período de 1999 a 2004**. Curitiba. www.iap.pr.gov.br. 13 pp., 2004.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. **Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do Estado do Paraná, no período de 2005 a 2008**. Curitiba. www.iap.pr.gov.br. 120 pp., 2009.

ISVÁNOVICS, V.; SHAFIK, H. M.; PRÉSING, M.; JUHOS, S.. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. **Freshwater Biology**, vol. 43, p. 257-275, 2000.

KENESI, G.; SHAFIK, H. M.; KOVÁCS, A. W.; HERODEK, S.; PRÉSING, M.. Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N₂ fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures. **Hydrobiologia**, vol. 623, p. 191-202, 2009.

KLUG, J. L.; FISCHER, J. M.. Factors influencing the growth of *Mougeotia* in experimentally acidified mesocosms. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, vol. 57, n. 3, p. 538-547, 2000.

LEWIS, W. M. Jr.. Basis for the protection and management of tropical lakes. **Lakes and Reservoirs: Research and Management**, vol. 5, p. 35-48, 2000.

MEHNERT, G.; LEUNERT, F.; CIRÉS, S.; JÖHNK, K. D.; RÜCKER, J.; NIXDORF, B.; WIEDNER, C.. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. **Journal of Plankton Research**, vol. 32, n. 7, p. 1009-1021, 2010.

MOISANDER, P. H.; PAERL, H. W.; ZEHR, J. P.. Effects of inorganic nitrogen on taxa-specific cyanobacterial growth and nifH expression in a subtropical estuary. **Limnological Oceanography**, vol. 53, p. 2519-32, 2008.

MOISANDER, P. H., CHESHIRE, L. A.; BRADDY, J.; CALANDRINO, E.; HOFFMAN, H.; PIEHLER, M. F.; PAERL, H. W.. Facultative diazotrophy increases *Cylindrospermopsis raciborskii* competitiveness under fluctuating nitrogen availability. **Federation of European Microbiological Societies**, vol. 79, p. 800-811, 2012.

MOORE, D.; MCGREGOR, G. B.; SHAW, G.. Morphological changes during akinete germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, vol. 40, p. 1098-1105, 2004.

PADISÁK, J.. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, and expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives Hydrobiology**, vol. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.

PADISÁK, J.; BÓRICS, G.; FEHER, G.; GRIGORSZKY, I.; OLDA, I.; SCHMIDT, A.; ZAMBONE-DOMA, Z. Dominant species, functional assemblages and frequency of equilibrium phases in late summer phytoplankton assemblages in Hungarian small shallow lakes. **Hydrobiologia**, vol. 502, p. 157-168, 2003.

PADISÁK, J.; REYNOLDS, C. S.. Selection of phytoplankton associations in lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokariotes. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 384, p. 41-53, 1998.

PICCINI, C.; AUBRIOT, L.; FABRE, A.; AMARAL, V.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; GIANNI, A.; FIGUEREDO, C. C.; VIDAL, L.; KRUK, C.; BONILLA, S.. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, vol. 10, p. 644-653, 2011.

POSSELT, A. J.. **Are nutrients the key driver in promoting dominance of toxic cyanobacterial blooms in a sub-tropical reservoir?** Griffith University, Queensland, Australia. 2010.

POSSELT, A. J.; BURFORD, M. A.; SHAW, G. Pulses of phosphate promote dominance of the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. **Journal of Phycology**, vol. 45, n. 3, p. 540-546, 2009.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 5 ed.. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 501 p., 2003.

RIGLER, F. H.. A tracer study of the phosphorus cycle in lake water. **Ecology**, vol. 37, p. 550-562, 1956.

SAKER, M. L.; THOMAS, A.D.; NORTON, J. H.. Cattle mortality attributed to the toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of the North Queensland. **Environmental Toxicology**, vol. 14, n. 1, p. 179-182, 1999.

SAKER, M. L.; EAGLESHAM, G. K.. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quandricarinatus*. **Toxicon**, vol. 37, n. 7, p. 1065-1077, 1999.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J.. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, vol. 39, n. 4, p. 349-354, 2000.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J.. Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. **Marine and Freshwater Research**, vol. 52, n. 6, p. 907-915, 2001.

SANEPAR, relatórios internos de 2006 a 2010. **Sanepar**: Curitiba.

SCHINDLER, D. W.. Evolution of Phosphorous Limitation in Lakes. **Science**, vol. 195, n. 21, p. 260-262, 1977.

SHAFIK, H. M.; HERODEK, M.; PRESSING, M.; VÖRÖS, L.. Factors effecting growth and cell composition of cyanoprokaryote *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju. Archiv fur Hydrobiologia supplement 140, **Algological Studies**, vol. 103, p. 75-94, 2001.

SPRÖBER, P.; SHAFIK, H. M.; PRÉSING, M.; KOVÁCS, A. W.; HERODEK, S.. Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* under different nitrogen conditions. **Hydrobiologia**, vol. 506-509, p. 169-174, 2003.

TALBOT, P.; THÉBAULT, J. M.; DAUTA, A.; DELANOÛE, J.. A comparative study and mathematical modeling of temperature, light and growth of three microalgae potentially useful for wastewater treatment. **Water Researchy**, vol. 25, p. 465-72, 1991.

TRANSEAU, Edgar Nelson. **The Genus Mougeotia**. Department of Botany, Ohio State University: The KnowledgeBank at OSU, 1926. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1811/2323>>, Acesso em: 2012.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M.. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de textos, 2008.

WHITTON, B. A. & POTTS, M.. **The Ecology of Cyanobacteria**: Their diversity in time and space. New York: Kluwer Academic Publishers, 669 pp., 2002.

WIEDNER, C.; RÜCKER, J.; BRÜGGEMANN, R.; NIXDORF, B.. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. **Oecologia**, vol. 152, p. 473-484, 2007.

WU, Z.; ZENG, B.; LI, R.; SONG, L.. Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. **Harmful Algae**, vol. 15, p. 53-58, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Testes preliminares para a realização das curvas de crescimento

Os cultivos para a realização das curvas de crescimento padrão da cepa do reservatório de Alagados foram mantidos em frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 200 mL de meio ASM-1 modificado. Os frascos foram dispostos aleatoriamente em uma prateleira da incubadora Eletrolab EL202 (conforme esquema na Figura 27 A), sob intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoper\u00edodo de 12:12 (claro-escuro), sem aera\u00e7\u00e3o (Figura 27 B). Os frascos foram agitados manualmente e aleatorizados quanto \u00e0 posi\u00e7\u00e3o na prateleira da incubadora uma vez por dia.

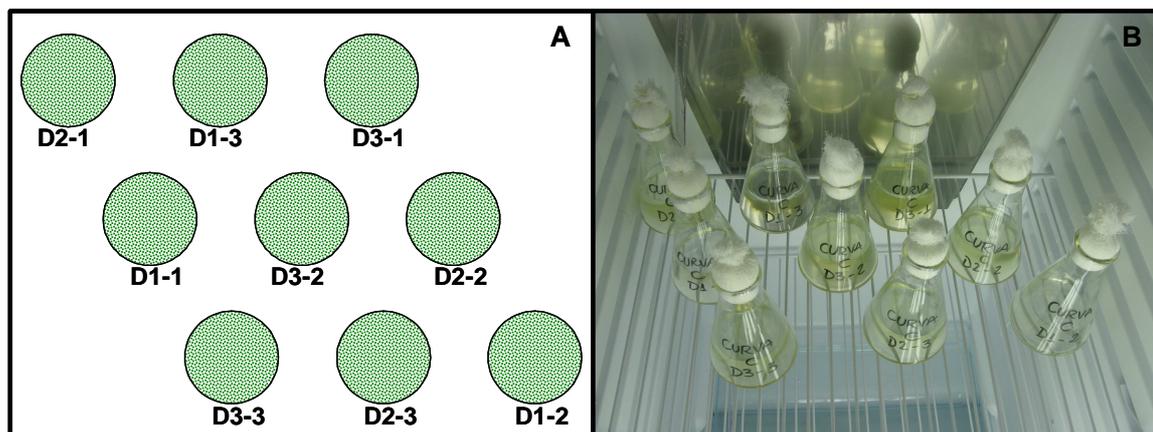


FIGURA 27 – ALEATORIZA\u00c7\u00c3O DA POSI\u00c7\u00c3O DOS FRASCOS NA INCUBADORA.

A) Esquema mostrando a aleatoriza\u00e7\u00e3o da posi\u00e7\u00e3o dos frascos com diferentes dilui\u00e7\u00f5es na prateleira da incubadora; B) Vista superior da prateleira da incubadora com frascos Erlenmeyers contendo os cultivos utilizados para a constru\u00e7\u00e3o das curvas de crescimento.

Cultivos com tr\u00eas in\u00f3culos iniciais foram testados para verificar se a taxa de crescimento da cepa do reservat\u00f3rio de Alagados assemelha-se ao registrado na literatura e para estimar-se a densidade celular ideal do in\u00f3culo. Tr\u00eas tratamentos foram utilizados. O primeiro tratamento (dilui\u00e7\u00e3o 1 – D1) teve in\u00edcio com a inocula\u00e7\u00e3o de 1 mL do cultivo estoque, com densidade de 7.10^5 c\u00e9lulas.mL⁻¹ (in\u00f3culo inicial da dilui\u00e7\u00e3o 1 = 7.10^5 c\u00e9lulas), em 200 mL de meio de cultivo ASM-1 modificado. No segundo tratamento (dilui\u00e7\u00e3o 2 – D2) foi inoculado 2 mL da cultura estoque em 200 mL de meio de cultivo ASM-1 modificado, sendo o in\u00f3culo inicial equivalente a 13.10^5 c\u00e9lulas (2 x D1). No terceiro tratamento (dilui\u00e7\u00e3o 3 – D3) foram adicionados 3 mL da cultura estoque em 200 mL de meio de cultivo ASM-1 modificado, o

equivalente a $20 \cdot 10^5$ células (3 x D1). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

As curvas de crescimento foram construídas utilizando-se quatro técnicas de acompanhamento do crescimento das culturas: abundância de células (células.mL⁻¹); abundância de tricomas (tricomas.mL⁻¹); biovolume (mm³.L) e densidade óptica (absorbância a 750 nm), em função do tempo (dias).

A abundância de células (células.mL⁻¹) e de tricomas (tricomas.mL⁻¹) foram obtidas a partir de contagem em câmara Sedgewick Rafter sob microscópio invertido Olympus IX70 a partir de alíquotas retiradas periodicamente (intervalos de 2 a 3 dias) dos cultivos, sob condições estéreis. O número de tricomas foi contado em campos aleatórios até no mínimo 1000 indivíduos. O erro de contagem foi aferido em aproximadamente 10% (VENRICK, 1979). Para calcular a abundância de células, o número de tricomas foi multiplicado por 12,6, número médio de células por tricoma definido previamente pela medição de 30 tricomas e contagem do número de células de 100 indivíduos em aumento de 1000 vezes.

O biovolume (mm³.L) foi calculado a partir da densidade celular, da medida de 30 indivíduos de cada uma das amostras (densidade de tricomas x volume médio dos tricomas) e da adaptação da forma do tricoma a figura geométrica de um cilindro ($v_c = c \pi r^2$) de acordo com Hillebrand *et al.* (1999).

Como forma alternativa a contagem, para acompanhar a taxa de crescimento das culturas, foi testada a leitura da densidade óptica (absorbância a 750 nm) (SHAFIK *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004) de amostras de 3 mL coletadas diretamente dos cultivos em espectrofotômetro Hitachi U-2001.

As taxas de crescimento das culturas foram calculadas na forma de velocidade de crescimento específico ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) conforme descrito por Andersen (2005). A fórmula utilizada para o cálculo da velocidade de crescimento específico foi:

$$\mu = (\text{Ln}(N_t) - \text{Ln}(N_0)) / (t - t_0)$$

Onde:

N_0 = número de organismos, biomassa ou densidade óptica no tempo inicial (t_0)

N_t = número de organismos, biomassa ou densidade óptica no tempo final (t)

t_0 = tempo inicial

t = tempo final

Uma reta foi ajustada aos dados das curvas de crescimento de cada uma das réplicas dos tratamentos (densidade óptica em escala logarítmica x tempo) (dados não apresentados), a fim de encontrar a taxa de crescimento do tratamento (μ) dada pela inclinação da curva (a). Sendo a equação geral da reta: $y = a.x + b$.

1 Curvas de crescimento

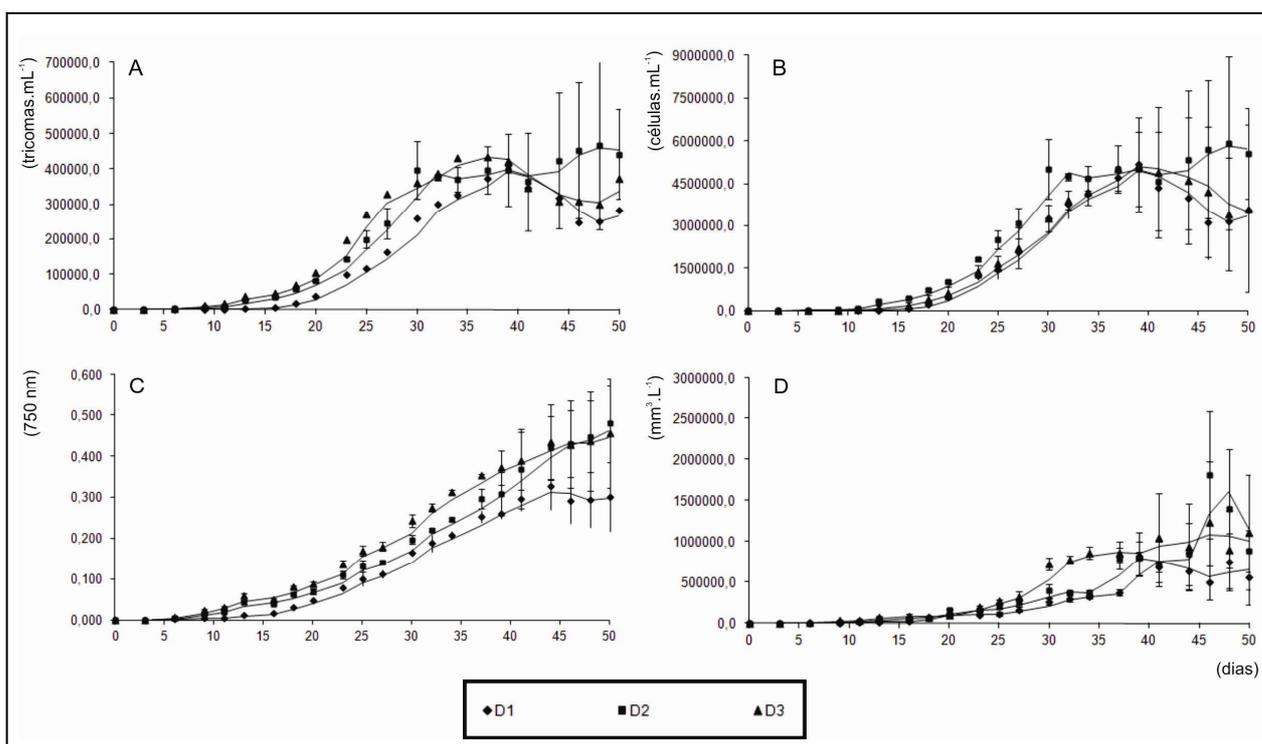


FIGURA 28 – CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM BASE EM DIFERENTES METODOLOGIAS DE ACOMPANHAMENTO.

A) Abundância de tricomas (tricomas.mL^{-1}); B) Abundância de células (células.mL^{-1}); C) Densidade óptica (absorbância a 750 nm); D) Biovolume celular ($\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$).

A média das réplicas foi utilizada ($n = 3$).

As barras correspondem aos máximos e mínimos a partir das médias.

Na figura 28 são apresentadas as curvas de crescimento padrão construídas para a cepa CYL04 com base nas diferentes metodologias testadas. A média da abundância de tricomas (tricomas.mL^{-1}) das três réplicas de cada um dos tratamentos iniciados com três inóculos iniciais (D1, D2 e D3) foram plotadas em função do tempo (dias) na figura 28 A. Esse gráfico é muito semelhante à curva da abundância de células (células.mL^{-1}) em função dos dias de experimento (Figura 28 B), já que o número de células foi estimado através do número de tricomas contados. A densidade óptica (absorbância a 750 nm) foi plotada em função do

tempo (Figura 28 C) e o mesmo foi feito para o biovolume celular ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) (Figura 28 D).

Todas as curvas, independente da diluição do inóculo inicial (D1, D2 e D3), apresentaram crescimento intenso entre os 5 e 10 primeiros dias, mantiveram o crescimento até um máximo de densidade e, então, caíram rapidamente. O início da fase exponencial, a estabilização e a desaceleração do crescimento das culturas ocorreram em sincronia entre as réplicas das diluições. Por outro lado, essas fases ocorreram em tempos distintos entre as diferentes diluições.

Durante os 50 dias em que os cultivos foram acompanhados, a diluição D1 chegou a abundância máxima de aproximadamente $6.000.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, próximo ao dia 40, enquanto as diluições D2 e D3 chegaram a aproximadamente $8.000.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, aos 45 e 35 dias, respectivamente (Figura 28 B). As diluições D2 e D3 foram iniciadas com inóculo respectivamente 2 e 3 vezes maior que a diluição D1, mas alcançaram abundância máxima de células apenas 0,75 vezes maior durante o período acompanhado. Mesmo assim, não houve diferença significativa entre as abundâncias de células ($F = 0,80$, $p = 0,46$) e tricomas ($F = 0,87$, $p = 0,42$) nas diferentes diluições durante o período acompanhado.

O desvio padrão a partir da média foi maior a cada contagem, a medida que o número de tricomas aumentou, independente da forma de acompanhamento do crescimento dos cultivos (seja através da abundância de células, de tricomas, densidade óptica ou biovolume) (Figura 28).

A fase exponencial (fase log) da diluição D1 teve início próximo ao 10° dia a partir da inoculação inicial e manteve-se até aproximadamente o 30° dia da curva, ou seja, durou cerca de 20 dias. A taxa de crescimento (μ) dessa cultura, calculada a partir da densidade óptica (750 nm) foi $0,21 \pm 0,02$. Na diluição D2, a fase exponencial de crescimento iniciou também próximo ao 10° dia e durou até próximo do 25°, com duração de 15 dias, relativamente menor que a da diluição D1. A taxa de crescimento (μ) dessa cultura, calculada a partir da densidade óptica (750 nm) durante a fase log foi $0,23 \pm 0,04$. Uma réplica dessa diluição (D2-2) cresceu muito rápido, em maior proporção que as outras até o 30° dia e depois caiu abruptamente. A fase de maior crescimento na diluição D3 foi ainda mais curta, iniciando no 10° dia e perdurando até o 20° dia, com total de duração de apenas 10 dias. A taxa de crescimento (μ) dessa cultura, calculada a partir da densidade óptica (750 nm) durante a fase log foi $0,18 \pm 0,02$. Não houve diferença significativa entre as taxas de

crescimento da cepa em culturas iniciadas com diferentes diluições do inóculo inicial ($F = 4,115$, $p = 0,075$).

A densidade óptica (750 nm) apresentou boa correlação tanto com a estimativa microscópica do número de células utilizando câmara de Sedgwick-Rafter (Correlação de Pearson, $r = 0,93$ para D1, $r = 0,94$ para D2 e $r = 0,94$ para D3, com $p = 0,000$) quanto do número de tricomas ($r = 0,93$ para D1, $r = 0,94$ para D2 e $r = 0,88$ para D3, $p = 0,000$). Por esse motivo, essa forma de acompanhamento do crescimento do cultivo foi selecionada para ser utilizada durante os experimentos posteriores. Uma curva de calibração foi construída a partir das contagens do número de células por mL e a densidade óptica (Figura 29). Uma comparação entre os valores dos dois sistemas de medição foi realizada através de regressão, a fim de prever a abundância de células de uma amostra desconhecida. A inferência desses valores não descartou a checagem periódica de contagens sob microscópio invertido.

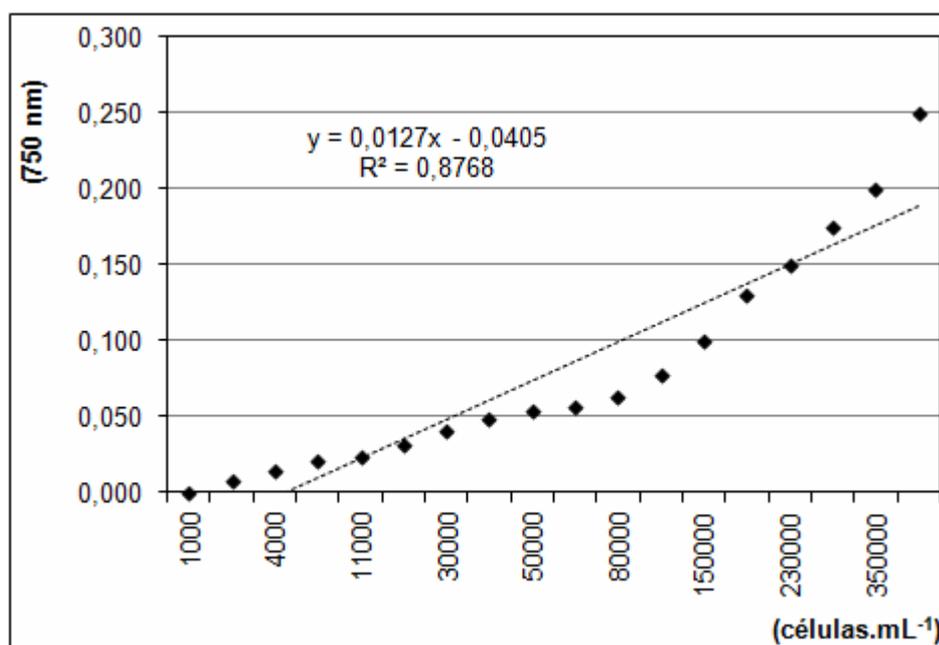


FIGURA 29 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ABUNDÂNCIA CELULAR (células.mL⁻¹) A PARTIR DA LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA (ABSORBÂNCIA A 750 nm).

2 Considerações finais

Os cultivos com diferentes diluições de inóculo inicial apresentaram a mesma taxa de crescimento durante a realização da curva de crescimento padrão da cepa de *C. raciborskii* CYL04, diferindo apenas na duração das fases de crescimento. De maneira geral, a duração da fase log dos cultivos foi inversamente proporcional ao número inicial de tricomas. Por outro lado, a abundância máxima de tricomas foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo inicial, até pelo menos a diluição D2. As diluições D2 e D3 foram iniciadas com inóculo respectivamente 2 e 3 vezes maior que a diluição D1 e alcançaram maior abundância de tricomas durante o período acompanhado, mas apenas 0,75 vezes maior. As diferenças entre as médias das abundâncias de tricomas obtidas das diferentes diluições não foram estatisticamente significativas. Da mesma maneira, a taxa de crescimento (μ) dessas culturas foi muito similar ($0,2 \pm 0,04 \text{ dia}^{-1}$), independente do inóculo inicial utilizado. Os dados indicam que o inóculo inicial não tem interferência direta no crescimento da cepa, apenas pode limitar antecipadamente o crescimento máximo do cultivo, provavelmente devido ao aumento do autossombreamento e da competição por nutrientes. Apesar disso, a taxa de crescimento da cepa não é ser alterada. Essa variável é calculada a partir de um curto espaço de tempo a partir do início do cultivo, justamente para minimizar os efeitos do aumento populacional.

Quanto às metodologias de acompanhamento do crescimento dos cultivos, a densidade óptica (absorbância a 750 nm) apresentou boa correlação tanto com a estimativa microscópica do número de células quanto do número de tricomas. Esse método pode ser usado como forma preferencial de acompanhamento do crescimento dos cultivos durante experimentos de curta duração. Porém, recomenda-se o monitoramento utilizando técnicas de estimativa microscópica do número de células em experimentos mais longos, pois a sensibilidade do método diminui nesses casos (> desvio padrão).

A cepa de *C. raciborskii* CYL04 apresentou curva e taxa de crescimento similares ao observado por outros autores. A taxa de crescimento ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) da cepa, a 20°C, ficou em torno de $0,2 \text{ dia}^{-1}$, semelhante à encontrada por Briand *et al.* (2004) para cepas brasileiras de *C. raciborskii* (entre $0,1$ e $0,3 \text{ dia}^{-1}$). De maneira geral, a cepa entrou em fase log de crescimento entre o quinto e décimo dia a partir da inoculação inicial. Essa fase de maior crescimento durou em torno de 10-15 dias.

Entre 45-50 dias os cultivos entram em fase de decaimento. Houve uma diminuição no comprimento dos tricomas no início da fase log de cada uma das diluições, coincidindo com a taxa de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de cada uma delas. Nessa fase do crescimento os tricomas sofrem divisão múltipla, dando origem a um maior número de novos tricomas menores. Esses tricomas crescem novamente até atingir o tamanho original (KOMÁREK, 2002).

Diferente de algumas cepas subtropicais que nunca produzem acinetos (PICCINI *et al.*, 2011), a cepa de *C. raciborskii* CYL04 apresentou produção dessas células de resistência primeiramente na diluição D3 e tardiamente na D1. Esse é um mecanismo desencadeado em condições adversas que, como esperado, surgiram primeiramente no tratamento com maior inóculo inicial (e.g., autossombreamento e competição por recurso/espço). Os acinetos regrediram ao longo da curva e não puderam mais ser observados a partir do 30° dia em qualquer uma das diluições.